

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES  
MESTRADO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE

CARLOS ALBERTO DAS NEVES DE ANDRADE

PERFIL DE SENSIBILIDADE E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS  
CLÍNICOS DE *Staphylococcus spp.* ORIUNDOS DE PACIENTES INTERNADOS  
EM HOSPITAL TERCIÁRIO DO RECIFE – PE

RECIFE  
2018

**CARLOS ALBERTO DAS NEVES DE ANDRADE**

**PERFIL DE SENSIBILIDADE E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS  
CLÍNICOS DE *Staphylococcus* spp. ORIUNDOS DE PACIENTES INTERNADOS  
EM HOSPITAL TERCIÁRIO DO RECIFE – PE**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área: Biologia Celular e Molecular Básica e Aplicada.

**Orientadora:** Dr<sup>a</sup>. Nilma Cintra Leal

**Coorientador:** Dr. Danilo Elias Xavier

**Recife**

**2018**

**Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães**

---

- A553p     Andrade, Carlos Alberto das Neves de.  
            Perfil de sensibilidade e caracterização molecular de isolados clínicos de Staphylococcus spp. oriundos de pacientes internados em hospital terciário do Recife – PE / Carlos Alberto das Neves de Andrade. - Recife: [s.n.], 2018.  
            101 p.: ilus., tab.
- Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2018.  
            Orientadora: Nilma Cintra Leal; coorientador: Danilo Elias Xavier.
1. Farmacorresistência Bacteriana - genética. 2. Staphylococcus - isolamento & purificação. 3. Anti-Infeciosos. 4. Sensibilidade e Especificidade. 5. Reação em Cadeia da Polimerase - métodos. 6. Proteínas de bactérias. I. Leal, Nilma Cintra. II. Xavier, Danilo Elias. III. Título

**CARLOS ALBERTO DAS NEVES DE ANDRADE**

**PERFIL DE SENSIBILIDADE E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS CLÍNICOS DE *Staphylococcus* spp. ORIUNDOS DE PACIENTES INTERNADOS EM HOSPITAL TERCIÁRIO DO RECIFE – PE**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: 29/06/2018

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dra. Nilma Cintra Leal  
Instituto Aggeu Magalhães/FIOCRUZ-PE

---

Dra. Milena de Paiva Cavalcanti  
Instituto Aggeu Magalhães/FIOCRUZ-PE

---

Dra. Cláudia Fernanda de Lacerda Vidal  
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE

*“Aos meus familiares, por todo apoio incondicional”.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que me permitiu realizar este trabalho e por ter esforçado as minhas mãos para concluí-lo.

Aos meus pais, Luiz Carlos e Joanita Esteliano, por todo apoio, carinho e compreensão.

À minha linda esposa, por ter dividido comigo as alegrias e as dificuldades ao longo desta jornada.

À minha orientadora, Dr<sup>a</sup> Nilma Leal, pela confiança e por todo conhecimento compartilhado. Foi uma honra poder aprender com uma pesquisadora excepcional, que, antes de tudo, é uma pessoa admirável.

Ao meu co-orientador, Dr. Danilo Xavier, pela paciência, apoio, atenção e broncas merecidas. Pelo caráter determinado, conhecimento fascinante e pela maneira espontânea de ser.

Aos membros da banca examinadora, por aceitarem o convite para participar da avaliação deste trabalho.

Aos meus colegas de trabalho, Dr<sup>a</sup> Maria do Carmo, Dr<sup>a</sup> Mirian Oliveira e Dr<sup>a</sup> Rosário de Fátima, pelo carinho, apoio e compreensão. Pela valiosa ajuda na obtenção dos isolados clínicos para a realização deste trabalho.

Aos meus amigos do Departamento de microbiologia, Bia Toscano, Lilian Amorim, Gabriela Maranhão, pelo companheirismo e momentos únicos de convívio.

Ao mestre Igor (Oh, mestre!), pela amizade, companheirismo e grande ajuda nos experimentos e na adaptação inicial ao centro de pesquisa.

Aos meus amigos, Gisele Jucá (Gija), Geórgia Cruz, Rafael Moura e Patrícia Neves, pela amizade, companheirismo e grande incentivo.

Ao Instituto Aggeu Magalhães, pelo suporte científico e tecnológico para a realização desta pesquisa.

ANDRADE, Carlos Alberto das Neves de. **Perfil de sensibilidade e caracterização molecular de isolados clínicos de *Staphylococcus spp.* oriundos de pacientes internados em hospital terciário do Recife – PE.** 2018. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2018.

## RESUMO

Os *Staphylococcus* são bactérias do grupo dos cocos Gram positivos que fazem parte da microbiota, mas que podem provocar doenças. O aumento das condições que induzem à internação de indivíduos cada vez mais graves e imunocomprometidos, somado ao surgimento da resistência a antimicrobianos, faz com que o uso de antimicrobianos de última linha seja cada vez mais recorrente. O objetivo desse estudo foi identificar os mecanismos de resistência antimicrobiana em bactérias do gênero *Staphylococcus* associados à infecções clínicas em pacientes assistido em hospital terciário do Recife/PE. A identificação dos isolados foi feita por MALDI TOF. O perfil de sensibilidade aos antimicrobianos foi determinado pela técnica de microdiluição em caldo. Os principais genes de resistência aos antimicrobianos foram identificados por PCR e pelo sequenciamento de DNA. Os determinantes genéticos pesquisados incluíram os cassetes *SCCmec* tipo I, II, III, IV, V e os genes *mecA*, que conferem resistência à oxacilina, os genes *vanA*, *vanB*, que conferem resistência à vancomicina e os genes *cfr* e *mprF*, responsáveis por conferir resistência à linezolida e daptomicina, respectivamente. Foram coletados 36 isolados de *Staphylococcus aureus* e 34 de *Staphylococcus coagulase negativa* (CoNS), resultando em um total de 70 amostras bacterianas. A resistência à oxacilina em *S. aureus* foi de 75%, com predominância dos cassetes *SCCmec* tipo II (37%). Entre os CoNS, o índice de isolados resistentes foi de 85,2%, com predominância dos cassetes *SCCmec* IV (29%). A frequência do gene *mecA* nos isolados avaliados foi de 88,2% das amostras. Não foram detectados elementos genéticos de resistência à vancomicina, linezolida e daptomicina. Entretanto, 4,2% das amostras apresentaram baixa susceptibilidade à vancomicina e linezolida. A presença desses isolados reforça a necessidade do desenvolvimento de novas estratégias para combater a ameaça da resistência antimicrobiana aos antibióticos de última linha.

**Palavras-chave:** Infecções relacionadas à assistência à saúde. Resistência Antimicrobiana. *Staphylococcus spp.*

ANDRADE, Carlos Alberto das Neves de. **Antimicrobial Susceptibility Profile and Molecular Characterization of *Staphylococcus* spp. Clinical Isolates from a Tertiary Hospital of Recife-PE.** 2018. Dissertation (Master of Bioscience and Biotechnology for Health) –Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, 2017.

## ABSTRACT

*Staphylococci* are Gram-positive bacteria that are part of the microbiota but can cause disease. The increase in the conditions that induce the hospitalization of increasingly severe and immunocompromised individuals, together with the emergence of antimicrobial resistance, makes the use of antimicrobial drugs of the last line more and more recurrent. The aim of this study was to identify mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria of the genus *Staphylococcus* associated with clinical infections in patients assisted at a tertiary hospital in Recife / PE. The identification of the isolates was done by MALDI TOF. The antimicrobial susceptibility profile was determined by broth microdilution technique. The major antimicrobial resistance genes were identified by PCR and DNA sequencing. The genetic determinants studied included SCCmec cassettes type I, II, III, IV, V and the *mecA* genes conferring resistance to oxacillin, *vanA*, *vanB*, vancomycin resistance genes and the *cfr* and *mprF* genes responsible for conferring resistance to linezolid and daptomycin, respectively. Thirty-six isolates of *Staphylococcus aureus* and 34 Coagulase-negative *Staphylococcus* (CoNS) were collected, resulting in a total of 70 bacterial samples. The resistance to oxacillin in *S. aureus* was 75%, with predominance of SCCmec type II cassettes (37%). Among the CoNS, the resistant isolates index was 85.2%, with SCCmec IV cassettes predominating (29%). The frequency of the *mecA* gene in the isolates evaluated was 88.2% of the samples. No genetic elements of resistance to vancomycin, linezolid and daptomycin were detected. However, 4.2% of the samples presented low susceptibility to vancomycin and linezolid. The presence of these isolates reinforces the need to develop new strategies to combat the threat of antimicrobial resistance to the last-line antibiotics.

**Key words:** Health Care Associated Infections. Antimicrobial resistance. *Staphylococcus* spp.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Principais espécies do gênero <i>Staphylococcus</i> . spp.....	20
Figura 2 - Características genéticas dos SCCmec I-XIII. ....	31
Figura 3 - Estrutura química do anel $\beta$ -Lactâmico.....	35
Figura 4 - Mecanismo de resistência à meticilina/oxacilina por produção de uma PBP anômala (PBP2a). ....	38
Figura 5 - Representação estrutural do antibiótico glicopeptídico vancomicina, destacando os cinco anéis aromáticos A, B, C, D, E e os sete aminoácidos (AA1 - AA7) presentes.....	39
Figura 6 - Mecanismo de ação antimicrobiano proposto para a daptomicina em <i>S. aureus</i> . ....	43

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 - Distribuição por sexo biológico e idade em anos dos 65 pacientes acometidos por IRAS associadas à *Staphylococcus spp.* .....47
- Gráfico 2 - Distribuição dos valores das CIMs de oxacilina entre os isolados de *Staphylococcus aureus* e CoNS oriundos dos pacientes assistidos entre janeiro de 2016 e fevereiro de 2017. ....58
- Gráfico 3 - Distribuição dos cassetes *SCCmec* em relação aos perfis de restrição genômicos por PFGE dos isolados de *Staphylococcus aureus*. ....65
- Gráfico 4 - Distribuição dos cassetes *SCCmec* em relação aos perfis de restrição genômicos por PFGE dos isolados de *Staphylococcus coagulase negativa* (CoNS).  
.....65

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação dos <i>SCCmec</i> em <i>Staphylococcus</i> spp. ....	52
Tabela 2 - Frequência de amostras de <i>Staphylococcus</i> spp. por sítio de isolamento primário. ....	56
Tabela 3 - Distribuição dos isolados entre os pacientes assistidos por unidade de tratamento. ....	57
Tabela 4 - Perfil de sensibilidade à oxacilina e cefoxitina das 36 amostras clínicas de <i>Staphylococcus aureus</i> isoladas de pacientes hospitalizados entre janeiro de 2016 e fevereiro de 2017. ....	58
Tabela 5 - Perfil de sensibilidade à oxacilina das 34 amostras clínicas de <i>Staphylococcus</i> coagulase negativo (CoNS) isoladas de pacientes hospitalizados entre janeiro de 2016 e fevereiro de 2017. ....	59
Tabela 6 - Distribuição dos 36 isolados de <i>S. aureus</i> quanto às CIMs para a oxacilina e cefoxitina. A região sombreada destaca os isolados que apresentaram sensibilidade à oxacilina e resistência à cefoxitina. ....	60
Tabela 7 - Fenótipos de sensibilidade em relação à oxacilina, presença do gene <i>mecA</i> , presença do gene PVL e perfil clonal observados nos 36 isolados de <i>S. aureus</i> . ....	61
Tabela 8 - Cassetes <i>SCCmec</i> identificados nos isolados de <i>S. aureus</i> MRSA. ....	62
Tabela 9 - Fenótipos de sensibilidade em relação à oxacilina, presença do gene <i>mecA</i> e perfil clonal observados nos 34 isolados de CoNS. ....	63
Tabela 10 - Cassetes <i>SCCmec</i> identificados nos isolados de CoNS. Distribuição de acordo com o fenótipo de resistência à oxacilina. ....	63

Tabela 11 - Distribuição dos isolados de <i>Staphylococcus</i> spp. quanto à sensibilidade à oxacilina e ao sítio de isolamento primário.....	64
Tabela 12 - Perfil de sensibilidade à vancomicina, linezolida e daptomicina das 36 amostras clínicas de <i>Staphylococcus aureus</i> isoladas de pacientes hospitalizados entre janeiro de 2016 e fevereiro de 2017.....	66
Tabela 13 - Perfil de sensibilidade à vancomicina, linezolida e daptomicina das 34 amostras clínicas de <i>Staphylococcus</i> coagulase negativo (CoNS) isoladas de pacientes hospitalizados entre janeiro de 2016 e fevereiro de 2017.....	67
Tabela 14 - Distribuição por número de amostras de <i>S.aureus</i> em relação ao CIM de vancomicina ( $\mu\text{g/mL}$ ).....	67
Tabela 15 - Distribuição por número de amostras de CoNS em relação ao CIM de vancomicina ( $\mu\text{g/mL}$ ).....	68

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL	-	Microlitros
AMK	-	Amicacina
AMP/SUB	-	Ampicilina/Sulbactam
AmpC	-	β-lactamase classe C
ASCES	-	Associação Caruaruense de Ensino Superior e Técnico
ATCC	-	<i>American Type Culture Collection</i>
BGNF	-	Bacilos Gram negativos não-fermentadores
BHI	-	<i>Brain Heart Infusion</i>
BKC	-	<i>Brazilian Klebsiella carbapenemase</i>
BLAD	-	β-lactamase <i>Data Base</i>
BLAST	-	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CA-MHB	-	<i>Cation-adjusted Mueller-Hinton broth</i>
CAZ	-	Ceftazidima
CEP	-	Comitê de Ética em Pesquisa
CIP	-	Ciprofloxacina
IAM	-	Instituto Aggeu Magalhães
CRO	-	Ceftriaxona
DNA	-	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	-	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
EDTA	-	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ESBL	-	β-lactamase de Espectro Estendido
EUA	-	Estados Unidos da América
FEP	-	Cefepime
FIOCRUZ	-	Fundação Oswaldo Cruz
ICS	-	Infecções da corrente sanguínea
IRAS	-	Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
IS	-	Elemento de inserção
LB	-	Caldo Luria-Bertani

mA	- Mili Ampere
MALDI-TOF	- <i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight</i>
MH	- Müeller-Hinton
mL	- Mililitros
MLST	- <i>Multi Locus Sequencing Typing</i>
MRSA	- <i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>
OD	<i>Optical density</i>
pb	- Pares de bases
PBP	- Proteína Ligadora de Penicilina
PCR	- Reação em cadeia da polimerase
PE	- Pernambuco
PFGE	- Eletroforese em campo pulsátil
pH	- Potencial hidrogeniônico
rpm	- Rotações por minuto
rRNA	- Ácido ribonucleico ribossomal
TSA	- Teste de sensibilidade aos antimicrobianos
TSB	- Caldo triptona de soja
UA	Unidade de absorbância
UTI	- Unidade de Terapia Intensiva

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>19</b>
<b>2.1 Gênero <i>Staphylococcus</i></b> .....	<b>19</b>
<b>2.2 Importância clínica dos <i>Staphylococcus sp.</i></b> .....	<b>22</b>
<b>2.3 Epidemiologia</b> .....	<b>25</b>
<b>2.4 Disseminação clonal de isolados de <i>Staphylococcus sp.</i></b> .....	<b>27</b>
2.4.1 <i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i> (PFGE) .....	29
2.4.2 Classificação do cassete gênico <i>SCCmec</i> de <i>Staphylococcus spp.</i> .....	29
<b>2.5 Opções terapêuticas para tratamento das infecções causadas por <i>Staphylococcus spp.</i></b> .....	<b>32</b>
<b>2.6 Antimicrobianos de última linha para o tratamento de infecções causadas por <i>Staphylococcus</i>: histórico, mecanismos de ação e de resistência bacteriana</b> .....	<b>33</b>
2.6.1 $\beta$ - lactâmicos .....	35
2.6.2 Vancomicina.....	38
2.6.3 Oxazolidinonas .....	41
2.6.4 Daptomicina .....	42
<b>3 OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>45</b>
<b>3.1 Objetivos específicos</b> .....	<b>45</b>
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	<b>46</b>
<b>4.1 Isolados bacterianos</b> .....	<b>46</b>
<b>4.2 Considerações éticas</b> .....	<b>47</b>
<b>4.3 Identificação dos isolados bacterianos por MALDI-TOF</b> .....	<b>48</b>
<b>4.4 Teste de susceptibilidade antimicrobiana</b> .....	<b>49</b>
<b>4.5 Estudo genético dos determinantes de resistência aos antimicrobianos</b> ...	<b>50</b>
<b>4.6 Extração de DNA genômico bacteriano</b> .....	<b>50</b>
<b>4.7 Identificação do cassete <i>SCCmec</i></b> .....	<b>51</b>
<b>4.8 Estudo genético dos determinantes de resistência à vancomicina</b> .....	<b>52</b>
<b>4.9 Estudo dos determinantes genéticos de resistência à daptomicina e linezolidina</b> .....	<b>53</b>

4.10 Determinação da relação genética entre os isolados pelo padrão de restrição genômico em eletroforese em campo pulsátil ( <i>Pulsed-Field Gel Electrophoresis</i> - PFGE) .....	54
4.11 Análises dos dados.....	55
5 RESULTADOS.....	56
5.1 Distribuição dos isolados de <i>Staphylococcus</i> spp.....	56
5.2 <i>Staphylococcus</i> spp. e a resistência à oxacilina e ceftioxina .....	57
5.3 <i>Staphylococcus</i> e resistência à vancomicina, linezolida e daptomicina .....	66
5.4 Distribuição clonal dos isolados de <i>Staphylococcus</i> spp.....	68
6 DISCUSSÃO .....	73
7 CONCLUSÕES .....	81
REFERÊNCIAS.....	82
APÊNDICE A- ISOLADOS CLÍNICOS DE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> ORIUNDOS DE AMOSTRAS CLÍNICAS DE PACIENTES ASSISTIDOS EM HOSPITAL TERCIÁRIO DO RECIFE/PE ENTRE 2016 E 2017.....	99
APÊNDICE B- ISOLADOS CLÍNICOS ORIUNDOS DE AMOSTRAS CLÍNICAS DE PACIENTES ASSISTIDOS EM HOSPITAL TERCIÁRIO DO RECIFE/PE ENTRE 2016 E 2017.....	100
ANEXO A - PARECER 1.190.837 DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	101

## 1 INTRODUÇÃO

A terapia antimicrobiana é um dos componentes essenciais para a prática médica e o pilar para a intervenção clínica em pacientes acometidos por infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS). O crescente problema da resistência antimicrobiana é agora reconhecido como uma grande ameaça para a Saúde Pública, comprometendo o controle de milhares de casos de infecções em pacientes no mundo, inclusive no Brasil (CHENG et al., 2016).

Dentre os mais variados grupos de patógenos, os *Staphylococcus* estão entre um dos mais prevalentes patógenos bacterianos entre as IRAS (GALES et al., 2009), sendo responsáveis por milhares de mortes todos os anos. *Staphylococcus* spp. exibem notória capacidade para se adaptar às condições adversas e desenvolver resistência antimicrobiana mediante pressão seletiva exercida pelos antimicrobianos utilizados na clínica, até mesmo aqueles utilizados como últimas opções para tratar infecções causadas por bactérias Gram positivas multirresistentes aos antimicrobianos (MDR). O uso excessivo dos antibióticos tem sido considerado um dos principais fatores que contribuem para o aumento da resistência bacteriana (LIVERMORE, 2005), que surge como uma resposta evolutiva mediada por um imenso repertório genético, muitas vezes transferível (WONG, 2017). Assim, a resistência antimicrobiana deve ser encarada como um fenômeno evolutivo que exige vigilância constante e esforços contínuos para identificar mecanismos de resistência emergentes, a fim de otimizar o uso de antibióticos e criar estratégias para contornar esse problema de Saúde Pública (STEFANI; AGODI, 2000).

Considerando o impacto negativo da resistência antimicrobiana e a sua crescente ameaça para a saúde da população, resultando em consequências clínicas e econômicas desfavoráveis, como: dificuldade na escolha de tratamentos eficazes, aumentando a mortalidade dos pacientes, prolongamento da hospitalização e elevação dos custos diretos e indiretos aos cuidados à saúde (O'BRIEN; STELLING; WEERASURIYA, 2010; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2016); e tendo em vista a importância de *Staphylococcus* spp. como patógenos relacionados às IRAS; a limitada terapêutica antimicrobiana, a potencial transferência de determinantes

genéticos de resistência para outros patógenos, sua elevada capacidade de disseminação por contato direto e indireto, os crescentes gastos com internações hospitalares para tratamento de infecções graves causadas por esses microrganismos, desenvolvemos este estudo visando caracterizar a distribuição, frequência, bases genéticas dos mecanismos moleculares de resistência às drogas de última linha entre isolados clínicos de *Staphylococcus* spp. oriundos de hospital terciário do Recife-PE.

As bases genéticas e bioquímicas dos mecanismos de resistência destes patógenos aos antimicrobianos empregados na terapêutica atual são imensas e variam de espécie para espécie e as estatísticas quanto à prevalência desses isolados resistentes às drogas de última linha ainda permanecem desconhecidas. A implantação de medidas de barreira e otimização do uso de antimicrobianos depende de estudos epidemiológicos que caracterizam os agentes causadores de IRAS, e em curto prazo, pode-se assim ajudar na orientação do uso racional de antibióticos de maneira que aumente a eficiência da terapia antimicrobiana empírica e reduza a prevalência de clones resistentes e o tempo de internação para o tratamento de infecções mais graves. Além disso, a obtenção de informações sobre esses mecanismos genéticos de resistência permitem a construção de uma base de dados que poderá ser utilizada para orientar futuras pesquisas para o aprofundamento do conhecimento destes mecanismos.

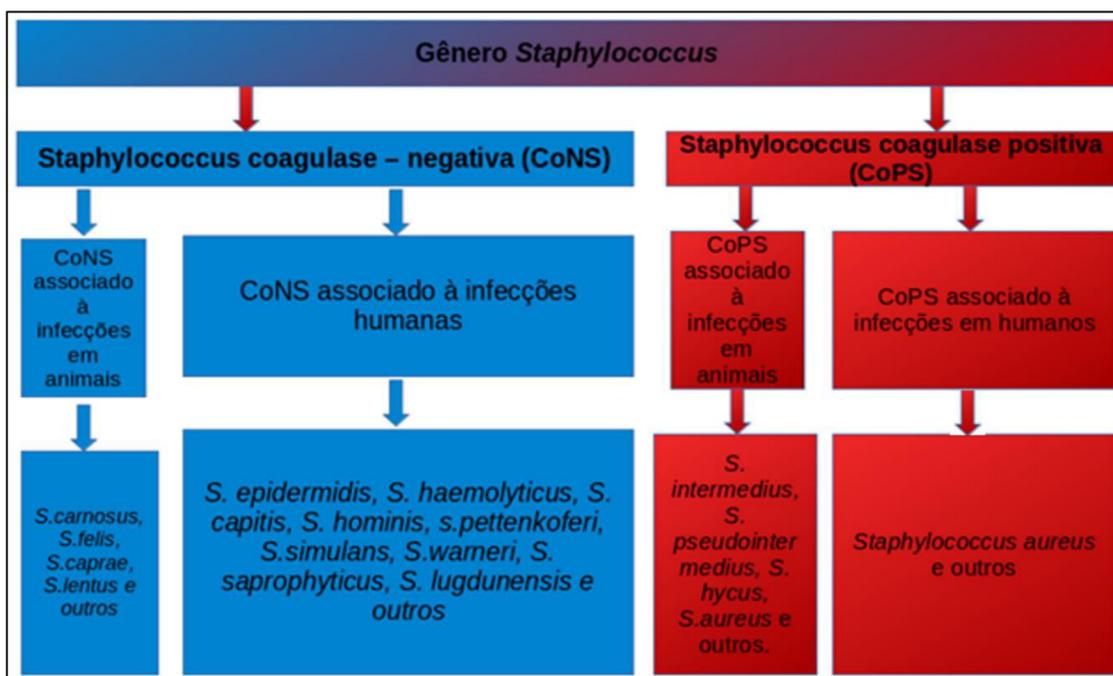
## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Gênero *Staphylococcus*

Membros do gênero *Staphylococcus* são bactérias Gram positivas, imóveis, podendo ser aeróbios ou anaeróbios facultativos, com metabolismo respiratório fermentativo. A coloração de suas colônias pode apresentar-se variada (branca, creme, amarela e laranja), a maioria é catalase positiva e oxidase negativa (SÁNCHEZ et al., 2017). Apresentam a capacidade de reduzir nitrato a nitrito. Susceptíveis a lise por lisostafina, mas não a lisozima (BERA et al., 2005), geralmente são halotolerantes e apresentam crescimento ótimo entre 35°C e 37°C (BRIAN, 2014).

Algumas espécies de *Staphylococcus* produzem uma adesina denominada coagulase, que cataliza a conversão do fibrinogênio em fibrina e formação de coagulo. Sua detecção é usada em laboratório para a identificação das espécies desse gênero e, assim, o gênero *Staphylococcus* é dividido em dois grandes grupos: i) *Staphylococcus* coagulase positiva, representado principalmente pelo *Staphylococcus aureus*; ii) *Staphylococcus* coagulase negativa (CoNS), compreendido por várias espécies como: *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*, *S. simulans*, *S. hominis*, *S. warneri*, *S. capitis*, *S. caprae* e *S. xylosus* e *S. epidermidis* (BECKER; HEILMANN; PETERS, 2014) (Figura 1).

**Figura 1** - Principais espécies do gênero *Staphylococcus*. spp.



Fonte: O autor a partir de Becker (2014).

Das 47 espécies pertencentes ao gênero *Staphylococcus*, 38 são classificadas como CoNS (LAMERS et al., 2012). Entre os CoNS, o *Staphylococcus epidermidis* tem sido o mais frequentemente isolado de amostras clínicas (BECKER; HEILMANN; PETERS, 2014) e superfícies corporais, sendo isolado de axilas, regiões inguinais, mucosas, conjuntiva (OTTO, 2009). Outras espécies como *S. haemolyticus* e *S. hominis* são preferencialmente isolados de axilas e glândulas apócrinas (PIETTE; VERSCHRAEGEN, 2009); *S. capitis* é encontrado em glândulas sebáceas e no couro cabeludo; *S. auricularis* é encontrado como colonizante exclusivo da parte externa do ouvido. *S. saprophyticus* coloniza o reto e o trato genitourinário (PIETTE; VERSCHRAEGEN, 2009).

Muitos fatores de virulência podem ser encontrados em *Staphylococcus* (Quadro 1). Esses fatores podem ser secretados ou permanecerem associados à superfície da bactéria, possibilitando a esses microrganismos escaparem da resposta imune, instalarem-se e multiplicarem-se contribuindo para o estabelecimento e progressão da infecção (GÖTZ; ROSENSTEIN, 2013).

**Quadro 1** - Fatores de virulência em *Staphylococcus* spp.

Fatores de virulência	Comentários	Referências
Enzimas	<p><b>a) Fibrinolisinases:</b> Degradam o coágulo e facilitam a infecção de tecidos adjacentes;</p> <p><b>b) Hialuronidase:</b> Hidrolisam a matriz celular do tecido do hospedeiro, facilitando os processos de invasão e disseminação;</p> <p><b>c) Nucleases:</b> atuam como endonucleases e exonucleases;</p> <p><b>d) Lipases:</b> Disseminam o microrganismo nos tecidos cutâneos e subcutâneos;</p>	(BOKAREWA; JIN; TARKOWSKI, 2006; IBBERSON et al., 2014)
Hemolisinas	<p><b>a) <math>\alpha</math>-hemolisina:</b> provoca a lise de eritrócitos e polimorfonucleares;</p> <p><b>b) <math>\beta</math> – hemolisina:</b> É uma esfingomielinase secretada durante a fase de crescimento (fase Log). Atua junto com o fator CAMP de <i>Streptococcus</i> spp. produzindo hemólise sinérgica;</p> <p><b>c) <math>\delta</math> - hemolisina:</b> Presente em mais de 97% das cepas de <i>S.aureus</i> e 50-70% dos CoNS, a <math>\delta</math>- hemolisina interage com membranas celulares formando canais e extravasando o conteúdo celular.</p>	(ELEK; LEVY, 1950)
Toxinas	<p><b>a) Toxinas esfoliativas:</b> produzida por algumas cepas de <i>Staphylococcus</i> spp., consistem em duas proteínas distintas: ET-A e ET-B. Atuam degradando a matriz mucopolissacarídica da epiderme.</p> <p><b>b) Enterotoxinas A, E, H e I:</b> moléculas termoestáveis e responsáveis pelas manifestações clínicas das intoxicações alimentares Estafilocócicas.</p>	(DINGES; ORWIN; SCHLIEVERT, 2000)
Superantígenos	<p><b>a) Toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1):</b> Pirogênica, superantigênica e apresenta a capacidade em aumentar cerca de 1000 vezes os efeitos letais de endotoxinas em coelhos.</p>	

**Fonte:** o autor.

## 2.2 Importância clínica dos *Staphylococcus* sp.

Constituintes do microbioma do corpo humano, os *Staphylococcus* são encontrados na pele, garganta, fossas nasais, uretra e vagina, podendo ocasionar infecção quando há rompimento da barreira cutânea ou comprometimento da imunidade do hospedeiro (GELATTI et al., 2009). Como patógenos, são importantes agentes etiológicos de infecções hospitalares e comunitárias (LIMA et al., 2015).

O *Staphylococcus aureus* é um dos membros mais patogênicos do grupo dos *Staphylococcus* sp. Apesar de constituir parte da microbiota normal, sendo encontrado nas narinas externas de 20-40% dos adultos (MCLOUGHLIN MULCAHY, MCLOUGHLIN; 2016), esse microrganismo pode causar infecções oportunistas em condições apropriadas como: lesões cutâneas (queimaduras, incisões cirúrgicas, eczema), uso de linhas intravenosas e próteses, infecções por outros agentes (vírus influenza), doenças crônicas, neoplasias e cardiopatias (MOREILLON; QUE, 2014). Nessas circunstâncias, o *S. aureus* pode causar uma variedade de processos infecciosos, que incluem desde infecções cutâneas benignas até doenças sistêmicas potencialmente fatais (LIMA et al., 2015).

As infecções cutâneas incluem foliculite simples e impetigo, furúnculos e carbúnculos, que afetam os tecidos subcutâneos e produzem sintomas sistêmicos como febre (JATON et al., 2016). Com frequência, *S. aureus* é isolado de infecções pós-cirúrgicas de feridas, que podem atuar como foco primário para infecções sistêmicas (ALEXIOU et al., 2017). A broncopneumonia estafilocócica adquirida na comunidade é habitualmente observada em indivíduos idosos e está associada à pneumonia viral como fator predisponente (DE LA CALLE et al., 2016). A pneumonia hospitalar ocorre no contexto de doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), intubação e aspiração (MALLIA et al., 2018). A bacteremia por *S. aureus* pode propiciar a disseminação deste microrganismo para locais distantes do foco primário de infecção, resultando em endocardite, osteomielite, piartrite e formação de abscessos metastáticos, particularmente nos pulmões, cérebro e rins (ALMEIDA et al., 2016; CHESSA; GANAU; MAZZARELLO, 2015; LIMA et al., 2015).

A meningite causada por *S. aureus* é observada em pacientes com anormalidades no sistema nervoso central associada a traumatismo, cirurgias e neoplasias (OORDT-SPEETS et al., 2018). As toxinas produzidas por *S. aureus* são responsáveis pela necrose epidérmica tóxica (síndrome da pele escaldada) e pela síndrome do choque tóxico (MISHRA; YADAV; MISHRA, 2016; SHARMA et al., 2018). Esses microrganismos também podem causar intoxicações alimentares devido à liberação de exotoxinas durante o seu crescimento em alimentos contaminados (HAIT et al., 2014).

A maior parte das espécies do gênero *Staphylococcus* pertencem ao grupo dos *Staphylococcus* coagulase negativa (CoNS), que é o mais diversificado grupo que habita a pele e a mucosa de humanos e animais. A importância clínica desse grupo vem sendo destacada vem há cerca de duas décadas (KLOOS; BANNERMAN, 1994). Como típicos patógenos oportunistas, representam o maior grupo de agentes etiológicos de infecções hospitalares, tendo um substancial impacto sobre a saúde humana (BECKER; HEILMANN; PETERS, 2014).

Os CoNS, assim como o *S. aureus* estão frequentemente associados à contaminação de equipamentos hospitalares indispensáveis na medicina moderna tais como: catéteres intravasculares, próteses valvares, estetoscópios, *stents* coronários e próteses articulares (BECKER; HEILMANN; PETERS, 2014) e como colonizadores de diferentes partes da pele e mucosas do hospedeiro, sendo essas uma importante fonte para infecções endógenas por CoNS (BECKER; HEILMANN; PETERS, 2014).

Quanto aos achados clínicos relacionados aos CoNS, *S. epidermidis* é, sem dúvida, o microrganismo mais isolado. Esse microrganismo pode causar infecções de trato urinário, infecções de feridas cirúrgicas, dispositivos de prótese, infecções de derivações do líquido cefalorraquidiano (LCR), acesso venoso e próteses valvares (CHESSA; GANAU; MAZZARELLO, 2015). Outro CoNS que também tem sido isolado com frequência é o *S. saprophyticus*, visto que essa espécie é um patógeno que causa primariamente infecções de trato urinário em mulheres jovens e sexualmente ativas (VASUDEVAN, 2014). Na atualidade, várias outras espécies desse grupo tem sido descritas como causadoras de infecções em humanos, principalmente em feridas

operatórias, trato urinário, bacteremia, osteomielite, sepse relacionada ao uso de catéteres, infecções de derivação ventriculoperitoneal e endocardite associada ao implante de próteses valvares. As espécies mais comumente implicadas nesses processos incluem: *S. haemolyticus*, *S. lugdunensis*, *S. schleiferi*, *S. warneri*, *S. hominis*, *S. simulans*, *S. saccharolyticus* (BECKER; HEILMANN; PETERS, 2014; HELDT MANICA; COHEN, 2017; SUEN et al., 2017).

Atualmente, os *Staphylococcus* spp. assumem destacado papel no contexto das Infecções Relacionadas à Saúde Assistencial (IRAS). A portaria 2.616 do Ministério da Saúde considera as Infecções Relacionadas à Saúde (IRAS) como risco significativo à saúde dos usuários dos serviços hospitalares definindo-as como infecções adquiridas durante o processo de cuidado em um hospital ou outra unidade prestadora de assistência à saúde, que não estavam presentes ou em incubação na admissão do paciente. Sua origem se dá a partir da interação com os profissionais de saúde, como internação, cirurgias, procedimentos feitos em ambulatório, cuidados domiciliares, podendo manifestar-se inclusive após a alta. Além disso, incluem as infecções ocupacionais adquiridas pelos profissionais de saúde (BRASIL, 1998). O termo IRAS vem substituindo a expressão infecção hospitalar, pois engloba tanto infecções relacionadas à assistência, quanto aquelas relacionadas à falha na assistência, prevenção, diagnóstico e tratamento. (HORAN; ANDRUS; DUDECK, 2008).

Estima-se que, pelo menos 10% dos pacientes em países em desenvolvimento e 7% dos pacientes em países desenvolvidos adquiram IRAS durante o período de hospitalização. Na Europa, 37.000 mortes provocadas por essas infecções causam um impacto financeiro de 07 bilhões de euros por ano (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2014) Nos Estados Unidos, os custos hospitalares podem chegar a 45 bilhões de dólares por ano (SCOTT, 2009). O Brasil, apesar de não haver uma sistematização dos dados (ROSSI, 2011), estima-se que aproximadamente de 5% a 15% dos pacientes hospitalizados e que 25% a 35% dos pacientes admitidos em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) adquiram algum tipo de IRAS, sendo esta, em geral, a quarta causa de mortalidade (OLIVEIRA et al., 2012). No Brasil, os *Staphylococcus* spp. representam o grupo de patógenos mais isolados

em IRAS, representando cerca de 28% das notificações (BOLETIM DE SEGURANÇA DO PACIENTE E QUALIDADE EM SERVIÇOS DE SAÚDE, 2017). A taxa de mortalidade por IRAS causadas por *Staphylococcus* sp. é de 100.000 pacientes por ano (LIMA et al., 2015).

Dados levantados por estudos multicêntricos realizados nos Estados Unidos revelaram que as infecções por *Staphylococcus* resistente à meticilina em sítio cirúrgico elevam o tempo de internação e os custos hospitalares em até 105%. Quando associados a infecções de corrente sanguínea (ICS), os custos aumentam em até 51% (ZIMLICHMAN et al., 2013). Outro estudo realizado por análise de dados de hospitalização nos Estados Unidos entre 2010 e 2014 revelou que os custos por paciente para tratamento de pneumonias causadas por MSSA podem chegar a US\$ 40.725. Quanto às infecções de corrente sanguínea (ICS) provocadas por esse microrganismo, os custos chegam a US\$ 34.536 por paciente (ALMEIDA et al., 2016; KLEIN et al., 2018). No Brasil, ainda não existem dados oficiais mais amplos sobre o tema. Entretanto, algumas pesquisas realizadas dão a dimensão do problema. Por exemplo, uma pesquisa realizada em 2012 no Hospital Santa Casa de Minas Gerais identificou que o gasto diário por pacientes com IRAS provocadas por *Staphylococcus* sp. pode chegar a R\$ 1.502,18 (NANGINO et al., 2012).

## 2.3 Epidemiologia

Os estudos epidemiológicos das infecções por *S. aureus* têm focado na distribuição de isolados resistente à meticilina (MRSA). Entretanto, no século passado o *S. aureus* meticilina sensível (MSSA) foi um importante causador de surtos hospitalares e, até hoje, permanece como o principal patógeno associado a IRAS (MONACO et al., 2016). Um exemplo desse passado é representado pela cepa de *S. aureus* denominada de *phage type* 80/81 que foi prevalente na metade do século passado, causando infecções e levando à morte neonatos de diversos hospitais dos Estados Unidos, Reino Unido e Canadá (UHLEMANN et al., 2014), tornando-se o primeiro clone de *S. aureus* pandêmico a ser identificado (CHAMBERS; DELEO, 2009). As cepas *phage type* 80/81, resistente à penicilina e altamente virulenta,

possuíam os genes para a leucocidina de *Panton–Valentine* (PVL), uma importante leucotoxina que, mais tarde tornou-se um marcador para a identificação de cepas relacionadas à infecções de indivíduos da comunidade (CA-MRSA) (MONACO et al., 2016).

Após a introdução da metilina na prática clínica, esse clone desapareceu do ambiente hospitalar. Entretanto, o *S. aureus* permaneceu como o principal patógeno associado à IRAS em função do aumento no número de pacientes imunocomprometidos, uso cada vez mais frequente de instrumentos invasivos como catéteres intravasculares e o aparecimento de isolados com fenótipo MRSA (LOWY, 1998; UHLEMANN et al., 2014). A frequência de isolados MRSA aumentou consideravelmente na década de 70 na Europa e nos Estados Unidos e, mais tarde, mundialmente, permanecendo o *S. aureus*, até o momento, como um dos patógenos líderes como causadores de IRAS em diferentes países (DELEO; CHAMBERS, 2009; HOLMLOM et al., 2016).

Nos Estados Unidos, o *S. aureus* foi o mais prevalente patógeno associado à pneumonia em pacientes sob ventilação mecânica e infecções em sítios cirúrgicos. Cerca de 58% dos isolados foram MRSA (SIEVERT et al., 2013). Na Europa, um recente estudo realizado pelo *European Center for Disease Control and Prevention* (ECDC), revelou que o *S. aureus* é o segundo microrganismo mais isolado depois da *Escherichia coli* e o primeiro em infecções de sítios cirúrgicos (EUROSURVEILLANCE EDITORIAL TEAM, 2015). Dados do projeto *Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiologic Importance* (SCOPE), que monitorou infecções de corrente sanguínea em 16 hospitais das cinco regiões brasileiras entre 2007 e 2010, indicaram que 33,7% das infecções em pacientes hospitalizados foram causadas por bactérias Gram positivas (GP). *Staphylococcus aureus* foram responsáveis por 15,4% das infecções de corrente sanguínea, seguidos pelos CoNS (13,8%). O mesmo estudo também mostrou que o índice de mortalidade dos pacientes foi de 31 % e 32 % para aqueles acometidos por infecções causadas por CoNS e *S. aureus*, respectivamente (MARRA et al., 2011). Em 2015, no Brasil, esse patógeno foi o terceiro microrganismo mais isolado de IRAS em UTI adulto com uma frequência de 13,2% e o quarto em UTI

pediátrica, sendo responsável por 11,7% das notificações (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2016).

No Brasil, os CoNS foram os patógenos Gram positivos mais notificados em unidade de terapia intensiva (UTI) em 2016. Das 22.499 notificações de microrganismos causadores de IRAS, os CoNS foram responsáveis por 16,5% dessas infecções, sendo o segundo patógeno mais frequente. Aproximadamente 75% dos isolados de CoNS apresentavam resistência à oxacilina, um antibiótico análogo à meticilina que, atualmente é utilizado para caracterizar os MRSA (BRASIL, 2016). Nos Estados Unidos, os CoNS foram responsáveis por 15,5% das IRAS de 2010 a 2015 (MENDES et al., 2016).

Na Europa, os CoNS foram o segundo patógeno mais isolado em infecções associadas a procedimentos cirúrgicos, representando cerca de 12% dos isolados entre 2013 e 2014. Em infecções de corrente sanguínea, os CoNS foram os mais prevalentes, sendo isolados em 22% dos casos (EUROSURVEILLANCE EDITORIAL TEAM, 2015). Esses dados demonstram a necessidade e a importância de medidas de controle cada vez mais eficazes para prevenir as IRAS causadas pelos CoNS. Os programas de vigilância epidemiológica assumem papel central nesse processo. E, nesse contexto, a utilização de técnicas moleculares tem mostrado perspectivas totalmente inovadoras, possibilitando, com maior resolutividade, a elucidação de surtos e de mecanismos de resistência, evidenciando assim, aspectos que não são perceptíveis através dos métodos fenotípicos tradicionais.

#### **2.4 Disseminação clonal de isolados de *Staphylococcus* sp.**

Clones bacterianos são células geneticamente idênticas que descendem de um mesmo ancestral comum (SEAS et al., 2010). Membros de um mesmo clone podem diferenciar-se por meio de mutações pontuais, recombinações e pela aquisição ou deleção de elementos genéticos móveis (ZURITA et al., 2016). Essa diferenciação resulta em meios adicionais para a aquisição de características patogênicas, como a

resistência a antibióticos. Como resultado dessa variação genética, surge uma extensa diversidade genômica e fenotípica (SEAS et al., 2010).

Estratégias terapêuticas locais adequadas podem ser traçadas a partir da caracterização clonal de isolados bacterianos (MOLTON et al., 2013). Exemplificando, pode-se utilizar um conhecimento mais completo dos clones circulantes em determinada região para avaliar a relação entre tipos clonais, sintomas da doença, escolha dos antibióticos e resultados clínicos (MARTIN et al., 2017).

A disseminação de clones de *Staphylococcus* aconteceu de maneira muito rápida por todo o mundo, com uma evolução do fenótipo sensível para metilina para o fenótipo resistente à metilina (SEAS et al., 2010). A maior parte das infecções por MRSA em todo o mundo são derivadas de uma entre cinco linhagens importantes, conhecidas como complexos clonais (CC): 5, 8, 22, 30 e 45 (CAMPBELL et al., 2015; JONES et al., 2015; ZURITA et al., 2016). Entre 1994 e 2000, dados de vigilância coletados em um estudo multicêntrico identificaram cinco clones pandêmicos predominantes (Brasileiro, Ibérico, Húngaro, Pediátrico e Nova Iorque/Japão [NYJ]) dentro desses complexos clonais, e esses clones representavam praticamente 70% dos isolados de MRSA em todo o mundo (OLIVEIRA; TOMASZ; DE LENCASTRE, 2002).

Nesse contexto, a tipagem molecular representa uma importante ferramenta de controle de infecção para monitorar a prevalência de certas cepas dentro de uma instituição de saúde ou para investigar surtos hospitalares (SABAT et al., 2013). A eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) é o atual padrão ouro na subtipagem microbiana e oferece considerável poder discriminatório, com alto grau de reprodutibilidade (STEFANI; AGODI, 2000). Outras técnicas empregadas incluem metodologias baseadas em PCR como: tipagem do Cassete Cromossomal Estafilocócico (*SCCmec*), *Multi-Locus sequence typing* (MLST), genes regulatórios acessórios (*agr*) e proteína Estafilocócica A (*spa*). Alguns métodos são descritos a seguir:

#### 2.4.1 Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)

Esta metodologia tem demonstrado ser um dos mais discriminatórios métodos de tipagem para estudos de surtos hospitalares e transmissão de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA). O DNA cromossomal é cuidadosamente extraído e acondicionado em blocos de agarose *low melting (plugs)* e digerido com a enzima de restrição *SmaI* seguido por eletroforese, fixação e visualização. A separação adequada dos diversos fragmentos gerados pela macrorrestrição é feita em campo pulsado (eletroforese que emprega pulsos alternados em um campo elétrico orientado perpendicularmente (SCHWARTZ; CANTOR, 1984). O padrão de bandas gerado pode ser analisado visualmente ou através de softwares que identificam semelhanças e diferenças entre os perfis de restrição. O mais comum método para a construção da árvore de similaridade é o Método de grupo de pares não ponderados usando médias aritméticas” (UPGMA) (TENOVER et al., 1995). Diferenças interlaboratoriais quanto aos resultados obtidos, equipamentos caros e protocolos laboriosos são as maiores desvantagens dessa técnica (STRUELENS et al., 2009). Entretanto, esse método permanece como padrão ouro para estudos epidemiológico moleculares.

#### 2.4.2 Classificação do cassete gênico *SCCmec* de *Staphylococcus* spp.

O cassete gênico *Staphylococcal Cassette Chromosome mec* (SCCmec) é um elemento genético móvel presente em espécies bacterianas do grupo dos *Staphylococcus*. Esses elementos carregam genes de virulência, como os responsáveis pela produção de biofilme e genes de resistência, como os genes *mec* que conferem resistência à meticilina/oxacilina (SABER et al., 2017). Além disso, esses elementos podem carrear plasmídeos e transposons responsáveis por conferir resistência a antimicrobianos como: sulfametoxazol, tetraciclina, macrolídeos, lincosaminas e fluorquinolonas (SABER et al., 2017). São caracterizados pela presença de repetições terminais invertidas, além de dois componentes genéticos (o complexo do gene *mec* e do gene *ccr*) e as regiões *junkyard* (J) (ITO et al., 2001). O

complexo *mec* gênico é composto de *IS431mec*, *mecA* e os conjuntos de genes reguladores, *mecR1* e *mecI*. O complexo *ccr* codifica as recombinases que medeiam a integração de *SCCmec* ao cromossomo e também a sua excisão, sendo, portanto, responsáveis por sua mobilidade. O restante do elemento *SCCmec* é composto por regiões J (J1, J2 e J3) próximas ao complexo *mec* e regiões *ccr*. Essa região pode conter vários genes ou pseudogenes que não parecem ser essenciais para a bactéria, embora exceções notáveis incluam mediação plasmidial ou transposônica de genes de resistência para antibióticos não- $\beta$ -lactâmicos ou metais pesados (ITO et al., 2001). Até o momento, existem três classes (A, B e C) do complexo *mec* e quatro alótipos (tipos 1, 2, 3 e 5) do complexo *ccr*. Diferentes combinações destes complexos classes e alótipos geram vários tipos *SCCmec* (Figura 2). Os elementos *SCCmec* são atualmente classificados com base na natureza do gene *mec* e complexo *ccr*, e são ainda classificados em subtipos de acordo com diferenças no DNA da região J (ITO et al., 2001). Atualmente existem 13 subtipos de cassetes *SCCmec* (BAIG et al., 2018) (Figura 2).



2002). Devido a elevada similaridade de sequências nucleotídicas entre as regiões J de alguns cassetes *SCCmec*, métodos de tipagem baseados no complexo de genes *ccr* e *mec* passaram a ser utilizados (ZHANG et al., 2005). Os métodos baseados em PCR em tempo real também foram desenvolvidos (CHEN et al., 2009). Eles são rápidos, menos trabalhosos e fáceis de interpretar.

## **2.5 Opções terapêuticas para tratamento das infecções causadas por *Staphylococcus* spp.**

A maioria dos isolados de *Staphylococcus* é resistente à penicilina e os MRSA são comuns nos hospitais e em infecções comunitárias (ARIAS et al., 2017). As penicilinas resistentes às penicilinases (flucloxacilina, dicloxacilina e oxacilina) permanecem como os antibióticos de escolha para o tratamento de infecções Estafilocócicas graves sensíveis à meticilina. Cefalosporinas de primeira geração (cefazolina, cefalotina e cefalexina), clindamicina, lincomicina e eritromicina tem importante papel terapêutico contra infecções não complicadas provocadas por MSSA em pele e tecidos moles. Esses antimicrobianos também são indicados para pacientes com hipersensibilidade à penicilina (CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2018).

Infecções causadas por *Staphylococcus* resistentes à meticilina/oxacilina são tratadas através de infusões intravenosas de vancomicina ou teicoplanina (este antibiótico é usado principalmente quando o paciente é alérgico à vancomicina). Combinações de antibióticos também podem ser empregadas nessas situações, como rifampicina e ácido fusídico, por exemplo (CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2018).

Novos antibióticos como a daptomicina, linezolida, quinupristina/dalfopristina e cefalosporinas de 5ª geração (cefbiprole e ceftarolime) são indicados quando para o tratamento de infecções causadas por Gram positivos resistentes à vancomicina. Esses antimicrobianos são conhecidos como drogas de última linha, representando a

última esperança para o tratamento de infecções causadas por *Staphylococcus* multirresistentes (MDR).

## **2.6 Antimicrobianos de última linha para o tratamento de infecções causadas por *Staphylococcus*: histórico, mecanismos de ação e de resistência bacteriana**

A era moderna dos antibióticos começou com a descoberta da penicilina por Sir. Alexander Fleming em 1928. Desde então, os antibióticos transformaram a medicina e salvaram milhares de pessoas, passando a serem prescritos para o tratamento de infecções graves no ano de 1940, principalmente durante a segunda guerra mundial (SENGUPTA; CHATTOPADHYAY; GROSSART, 2013), contribuindo para aumentar a expectativa de vida da população, principalmente em países onde os serviços de vigilância sanitária eram bastante precários (VENTOLA, 2015). No entanto, pouco tempo depois, a resistência a penicilina tornou-se um problema clínico substancial, de modo que, os avanços alcançados naquele ano foram ameaçados (SPELLBERG; GILBERT, 2014). Em resposta, novos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos foram descobertos e implantados na prática clínica, como a meticilina, uma penicilina de segunda geração resistente a ação das  $\beta$ -lactamases. Todavia, na mesma década foram identificados os primeiros casos de *Staphylococcus spp.* resistentes à meticilina no Reino Unido em 1962 e nos Estados Unidos em 1968 (SENGUPTA; CHATTOPADHYAY; GROSSART, 2013).

A vancomicina foi introduzida na prática clínica em 1972 para o tratamento de infecções causadas por MRSA (VENTOLA, 2015). Entretanto, casos de resistência à vancomicina foram registrados em CoNS em 1979 e 1983 (SRINIVASAN; DICK; PERL, 2002).

Desde o final dos anos 1980 até o início dos anos 1990, a indústria farmacêutica introduziu novos antibióticos para o tratamento desses isolados resistentes à vancomicina como a daptomicina e linezolida (READ; WOODS, 2014). Essas drogas, conhecidas como drogas de última linha, representam a última estratégia de combate

aos *Staphylococcus spp.* resistentes a todos os outros antibióticos disponíveis. Esses antimicrobianos ainda apresentam elevada eficácia no tratamento de infecções por *Staphylococcus*, apesar de casos de resistência na prática clínica serem reportados (DE ALMEIDA et al., 2013; HUMPHRIES; POLLETT; SAKOULAS, 2013). Entretanto, essas drogas são mais caras e apresentam graves efeitos colaterais (RAYNER; MUNCKHOF, 2005). Um estudo realizado no Canadá mostrou que a utilização de linezolida, daptomicina e vancomicina para o tratamento de infecções graves de pele causadas por *S. aureus* podem gerar um custo direto total por paciente de US\$18,057, US\$20,698 e US\$23,671, respectivamente (STEPHENS et al., 2013).

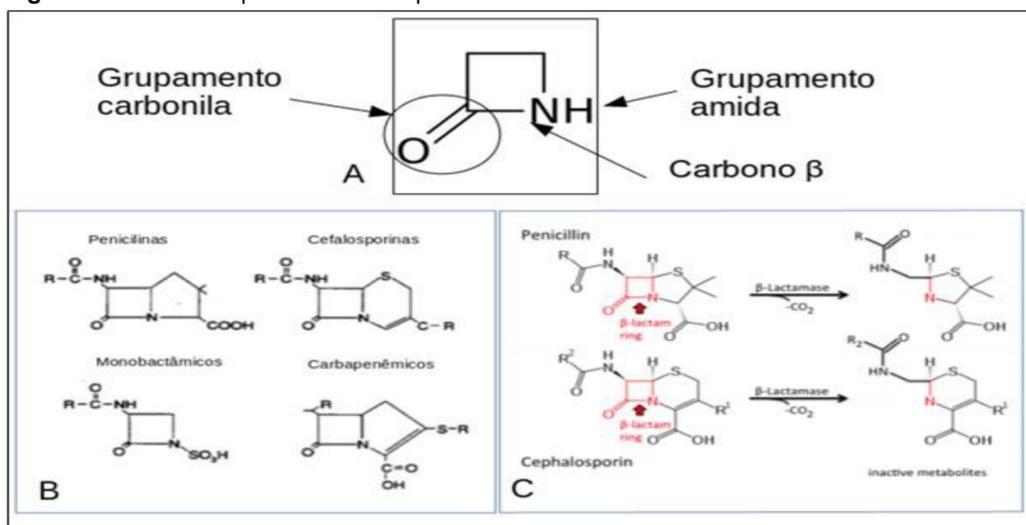
Os antibióticos de reserva ou de última linha, em determinadas situações de tempo crítico como circunstâncias de mortalidade elevadas, podem ser utilizadas como primeira escolha para o tratamento (DEAN, 2016). Esses agentes apresentam alta eficácia terapêutica. Devido à possibilidade de potenciais efeitos colaterais severos como: mialgia, supressão medular e elevação da função hepática (VAZQUEZ-GUILLAMET; KOLLEF, 2014), essas drogas são administradas combinadas com outros antimicrobianos para reduzir as chances de desenvolvimento de resistência durante o tratamento. Após o isolamento, identificação e caracterização do perfil de sensibilidade antimicrobiana do patógeno, o tratamento é modificado (VAZQUEZ-GUILLAMET; KOLLEF, 2014).

A disseminação de microrganismos resistentes resulta da combinação de múltiplos fatores, tais como: mutações dos genes de resistência que aumentam seu espectro de atividade; troca de informações genéticas nas quais os genes de resistência são transferidos para novos microrganismos; pressão seletiva exercida pelas condições do meio que favorece a emergência e disseminação de microrganismos resistentes; proliferação e disseminação de clones multirresistentes as quais podem ocorrer em nível global (STRAUSS et al., 2017). Os principais mecanismos de resistência aos antimicrobianos encontrados em *Staphylococcus sp.* são descritos a seguir:

### 2.6.1 $\beta$ - lactâmicos

Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos representam uma classe de antibióticos de amplo espectro que apresentam em sua estrutura o anel  $\beta$ -lactâmico, que consiste em uma amida cíclica cujo grupamento azoto está ligado ao átomo de carbono  $\beta$  da cadeia principal em relação ao grupamento carbonila (Figura 3A). Essa classe inclui os derivados das penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos (Figura 3B). Os antibióticos  $\beta$ -Lactâmicos inibem a síntese da parede celular por bloquear a atividade transpeptidase das proteínas ligadoras de penicilina (PBPs), enzimas que realizam o *cross link* do peptidoglicano nascente (MUNITA; BAYER; ARIAS, 2015). Todavia, a introdução de cada novo  $\beta$ - lactâmico na prática clínica tem sido consistentemente seguida pelo aparecimento de mecanismos de resistência antimicrobiana. Em *Staphylococcus spp.* existem dois mecanismos de resistência aos  $\beta$ - lactâmicos: degradação enzimática do anel  $\beta$ - lactâmico (Figura 3C) ou pela expressão de PBP's de baixa afinidade pelos  $\beta$ - lactâmicos (MUNITA; BAYER; ARIAS, 2015).

**Figura 3** - Estrutura química do anel  $\beta$ -Lactâmico.



**Fonte:** Adaptado de Livmore (1995).

**Nota:** A- A característica básica dessa estrutura é o arranjo cíclico com o grupamento amida ligado ao carbono  $\beta$  em relação a um grupamento carbonila;  
 B- Antibióticos representantes da classe dos  $\beta$ -Lactâmicos;  
 C- Mecanismo de degradação enzimática pela ação das  $\beta$ -Lactamases.

A disseminação da resistência entre os *Staphylococcus* spp. aos  $\beta$ -lactâmicos aconteceu em várias “ondas epidêmicas”: Em um primeiro momento, foi caracterizado pela aquisição de plasmídeos codificadores de penicilinas aconteceu em 1950, após a introdução da penicilina na prática clínica, seguido por um segundo após a introdução da meticilina em 1959, caracterizado pela rápida disseminação de clones resistentes entre os hospitais europeus até a década de 1970 (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2014; VENTOLA, 2015). A terceira fase inicia-se com a disseminação de isolados MRSA pelo mundo (CORNICK; BENTLEY, 2012). A quarta fase foi marcada pela disseminação dos MRSA entre isolados relacionados às infecções comunitárias nos anos 1990 (CHAMBERS; DELEO, 2009).

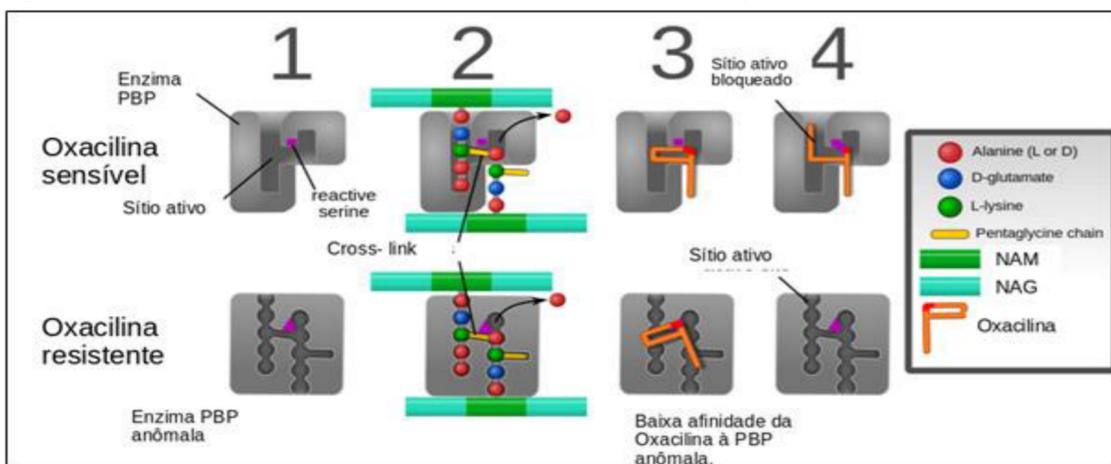
A resistência à meticilina/oxacilina (Figura 04) é conferida pela aquisição do cassete cromossomal *mec* (SCC*mec*) contendo o gene *mecA*, que codifica uma PBP2a anômala, uma transpeptidase com baixa afinidade por todos os  $\beta$ -lactâmicos (exceto as cefalosporinas de 5ª geração). A expressão do gene *mecA* é altamente regulada e requer a presença do antibiótico  $\beta$ -lactâmico como indutor (DELEO; CHAMBERS, 2009). Baseado na sequência do SCC*mec*, os MRSA podem ser classificados nos tipos de I a V, sendo que os cassetes SCC*mec* tipo IV e V estão presentes em *Staphylococcus aureus* associados à infecções comunitárias (CA-MRSA), enquanto que os SCC*mec* tipo I, II e III estão mais associados à infecções hospitalares (HA-MRSA) (UHLEMANN et al., 2014; MITSUMOTO-KASEIDA et al., 2016). Dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2017) demonstraram que 54% dos *Staphylococcus aureus* e 75% dos CoNS isolados de corrente sanguínea foram resistentes à meticilina.

Desde 2004, o CLSI passou a recomendar o teste com este antimicrobiano para a detecção de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina, pois este é um forte indutor do sistema regulatório do gene *mecA* que apresenta elevada acurácia e reprodutibilidade. A avaliação da sensibilidade a este microbiano pode ser feita por microdiluição em caldo ou ágar difusão. Os isolados de *S. aureus* são classificados como resistentes à oxacilina (MRSA) quando apresentam CIM para a cefoxitina  $\geq 8$   $\mu\text{g/mL}$  e/ou PCR positivo para o gene *mecA*, independente do CIM para a oxacilina. Por sua vez, isolados que apresentem CIM para oxacilina  $\leq 2$   $\mu\text{g/mL}$ , CIM para a

cefotina  $\leq 4$   $\mu\text{g/mL}$  e ausência do gene *mecA*, são classificados como MSSA. Quando sensíveis à cefotina e a oxacilina (CIM  $\leq 2$   $\mu\text{g/mL}$ ) e com presença do gene *mecA*, esses isolados são denominados como OS-MRSA (*Staphylococcus aureus* oxacilina sensível – metilina resistente).

Diferente do mecanismo de produção de PBP2a pelo gene *mecA*, a resistência à metilina/oxacilina pode ser determinada por outros mecanismos. Um exemplo são os BORSA (*Borderline oxacillin-resistant S. aureus*), que são definidos como isolados que podem apresentar concentração inibitória mínima (CIM) para a oxacilina entre 4 e 16  $\mu\text{g/mL}$  sem a presença do gene *mecA* (LEAHY et al., 2011). A resistência *boderline* em *S. aureus* pode ser determinada por vários mecanismos. O primeiro documentado foi a hiperprodução de beta-lactamases. McDougal e Thornsberry (1986) demonstraram que isolados de *S. aureus* podem superexpressar genes que codificam enzimas que degradam penicilinas rapidamente, mas inativam outros beta-lactâmicos lentamente, incluindo a oxacilina. A identificação de isolados BORSA pode ser facilmente realizada pela utilização de inibidores de beta-lactamase, onde os isolados *borderlines* reverterem a resistência à penicilina, enquanto que os MRSA não (HRYNIEWICZ; GARBACZ, 2017). O fenótipo *borderline* é observado principalmente em pacientes que fazem uso de cefalexinas e aminoglicosídeos (LEAHY et al., 2011). A taxa de mortalidade entre pacientes portadores de IRAS causadas por BORSA pode chegar a 24,6%, significativamente mais baixa que em isolados MRSA (38,5%) (HUANG et al., 2018). A incidência desse fenótipo é certamente subestimada, dado que muitos laboratórios de microbiologia clínica usam apenas o teste da cefotina para a detecção da resistência à oxacilina em *Staphylococcus* spp. De fato, o teste de cefotina é um marcador de resistência à oxacilina pela aquisição do gene *mecA* e é incapaz de detectar cepas de BORSA (SWENSON et al., 2007). Um terceiro mecanismo menos frequente é mediado pelo gene *mecC*. Identificado em 2011, esse gene confere o mesmo fenótipo que o *mecA*. Entretanto, a similaridade entre esses genes é de 70% e o *mecC* não necessita de uma PBP2 nativa para ser funcional (PATERSON; HARRISON; HOLMES, 2014).

**Figura 4** - Mecanismo de resistência à metilicina/oxacilina por produção de uma PBP anômala (PBP2a).



**Fonte:** Wikimidia (PBP..., 2018; tradução nossa).

**Nota:** A) Em microrganismos sensíveis, a metilicina bloqueia o sítio ativo da PBP, impedindo a estruturação do peptidoglicano;  
 B) Em microrganismos resistentes, a metilicina apresenta baixa afinidade pelo sítio ativo da PBP anômala, que apresenta mudanças estruturais no sítio ativo enzimático.

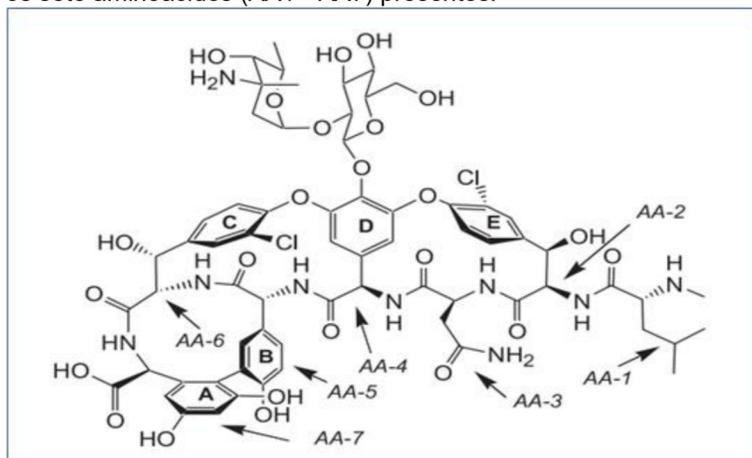
Outra importante classe de  $\beta$ -lactâmicos são as cefalosporinas de 5ª geração (ceftarolina e cefbiprole). Introduzidas na prática clínica para o tratamento de MRSA, uma vez que apresentam afinidade pela PBP codificada pelo gene *mecA*. Resistência à ceftarolina (CIM  $\geq 4 \mu\text{g/mL}$ ) entre isolados clínicos MRSA é bastante incomum. No entanto, isolados resistentes (CIM  $\geq 32\mu\text{g/mL}$ ) tem sido relatados (BROBERG; PALACIOS; MILLER, 2014; KELLEY et al., 2015; MENDES et al., 2012). Os mecanismos que levam a esse fenótipo de resistência são desconhecidos, porém, acredita-se que o mecanismo possa estar associado duas substituições (Y446N and E447K) encontradas no domínio ativo da PBP2a codificada pelo *mecA* (KELLEY et al., 2015; LONG et al., 2014).

### 2.6.2 Vancomicina

A vancomicina é antibiótico glicopeptídeo (Figura 5) de última linha que atua ligando-se ao motivo D-alanil-D-alanina do pentapeptídeo N-acetil-muramyl-L-Ala- $\gamma$ -Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala, bloqueando a participação deste importante precursor na síntese do peptideoglicano (PÉRICHON; COURVALIN, 2012). Produzida pelo

*Amycolaptoses orientalis*, a vancomicina foi descoberta em 1952 e utilizada nesse período para tratar os *Staphylococcus spp.* resistentes às penicilinas. Com o advento da metilina (1958) e, posteriormente das cefalosporinas (1960), a vancomicina caiu em desuso até a década de 80, quando começaram a surgir os primeiros surtos de infecções causadas por *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina (MRSA) e *Streptococcus pneumoniae* resistente à penicilina (PEACOCK; MARSIK; WENZEL, 1980). Desde então, a vancomicina foi reformulada para apresentar menor toxicidade e maior eficácia, passando a ser a droga de escolha para o tratamento de IRAS causadas por esses patógenos. A partir da década de 80, o uso da vancomicina aumentou mais de 100 vezes nas duas décadas seguintes (KIRST; THOMPSON; NICAS, 1998).

**Figura 5** - Representação estrutural do antibiótico glicopeptídico vancomicina, destacando os cinco anéis aromáticos A, B, C, D, E e os sete aminoácidos (AA1 - AA7) presentes.



Fonte: Silveira et al (2006).

Com a crescente utilização da vancomicina, os mecanismos de resistência evoluíram paralelamente. O primeiro caso de resistência em *Staphylococcus spp.* (VRS) foi descrito em *Staphylococcus aureus* em Michigan (2002) por aquisição de um operon *vanA* (CHANG et al., 2003). Do mesmo sítio de infecção foi isolado um *Enterococcus spp.* também resistente à vancomicina (VRE). A transferência de *vanA* cluster entre VRE e *Staphylococcus spp.* foi demonstrada *in vitro* sugerindo que o fenômeno possa ter acontecido *in vivo* (NOBLE; VIRANI; CREE, 1992). A resistência mediada pelo operon *vanA* atua modificando os aminoácidos terminais do

pentapetídeo precursor do peptidoglicano de D-Alanil-D-Alanina para D-Alanil-D-lactato (D-Ala-D-Lac) ou D-Alanil-D-Serina (D-Ala-D-Ser), reduzindo a afinidade da vancomicina pelo sítio alvo em até mil vezes (REYNOLDS; COURVALIN, 2005). Inicialmente estudados em espécies de *Enterococcus* spp., nove tipos de genes *van* foram descritos até o momento. Esses genes são *vanA*, *vanB*, *vanD*, e *vanM*, que causam resistência através da formação de (D-Ala-D-Lac) e *vanC*, *vanE*, *vanG*, *vanL*, e *vanN* que catalisam a formação de (D-Ala-D-Ser) (BOYD et al., 2008; COURVALIN, 2006; LEBRETON et al., 2011; PÉRICHON; COURVALIN, 2009; XU et al., 2010). Os operons *van* mais identificados e clinicamente relevantes envolvidos nesse processo de resistência são os *vanA* e *vanB*, tendo sido descritos em elementos genéticos móveis em *S. aureus* (SAADAT et al., 2014). Até o momento, 36 isolados de *Staphylococcus aureus* resistentes à vancomicina associada ao operon *vanA* tem sido registrados em todo o mundo (HU; PENG; RAO, 2016). A transferência do cluster *vanA* é determinada por elementos genéticos móveis como o transposon Tn1546 que pode ser carregado por plasmídios do grupo de incompatibilidade Inc18 e, ocasionalmente, por cromossomos hospedeiros como parte de largos elementos conjugativos (ZHU et al., 2008)

A transferência do cluster *vanB* está relacionada aos transposons Tn5382 de 27 kb e Tn1549 de 34 kb, que tem sido identificados na Europa e nos Estados Unidos entre isolados de *S. aureus* (CARIAS et al., 1998; GARNIER et al., 2000).

Em CoNS, o mecanismo de resistência parece ser endógeno, não associado a plasmídios ou transposons (SILVEIRA et al., 2015). Nestes microrganismos, mecanismos adaptativos levam a espessamento da parede celular, aumento na produção de muropeptídeos (SIERADZKI; TOMASZ, 2003), superexpressão de PBP2 (HANAKI et al., 1998), crescimento celular defectivo, o que leva ao aparecimento de colônias de tamanho reduzido (DAUM et al., 1992), principalmente depois da exposição à vancomicina (BOYLE-VAVRA et al., 2001), o que reforça a necessidade do uso racional dos antibióticos.

Esses mecanismos endógenos de resistência, também identificados em *Staphylococcus aureus*, reduzem a sensibilidade à vancomicina, originando isolados heterorresistentes (hVISA) que estão presentes em maior frequência do que os VRS,

podendo chegar a 50% entre os *Staphylococcus aureus* resistentes à metilicina (HOWDEN et al., 2010) e entre 88% dos *Staphylococcus epidermidis* (SILVEIRA et al., 2015). A heterorresistência à vancomicina consiste na identificação de subpopulações com sensibilidade intermediária à vancomicina dentre os isolados clínicos. Esse fenótipo de resistência também pode ser encontrado em *Staphylococcus* spp. sensível à metilicina (MSSA) (ALÓS et al., 2008; BOBIN-DUBREUX et al., 2001). Uma vez que a vancomicina é considerada uma das últimas escolhas para o tratamento de MRSA, a resistência a esse antimicrobiano representa uma questão importante a ser estudada e identificada entre isolados clínicos.

### 2.6.3 Oxazolidinonas

Atualmente, duas oxazolidinonas estão disponíveis para tratamento de infecções por bactérias Gram positivas: linezolida e tedizolida. Ambas atuam inibindo a síntese protéica interagindo com o sítio A da subunidade ribossomal 50S. Mecanismos de resistência às oxazolidinonas em *Staphylococcus* spp. incluem: a) mutações nos genes que codificam o RNA ribossomal 23S; b) mudanças em proteínas ribossomais L3/L4; c) metilação do RNA ribossomal (RINCÓN et al., 2014).

Inicialmente descrito em *Staphylococcus sciuri*, o gene *cfr* (*chloramphenicol florfenicol resistance*) codifica uma metiltransferase cujo alvo é a posição A2503 do rRNA 23S. Esse gene foi primeiro descrito em amostras clínicas em 2005 em *S. aureus* isolado de um paciente da Colômbia (TOH et al., 2007). Desde então, foram identificados em várias espécies (MENDES; DESHPANDE; JONES, 2014). O *cfr* é co-transferido com outros elementos de resistência de baixo custo para a bactéria (LAMARRE et al., 2011). Vale salientar que o *cfr* não confere resistência à tedizolida, uma oxazolidinona aprovada para uso clínico pela *Food and Drug Administration* (FDA) desde 2004 (LOCKE et al., 2014).

As mutações no domínio central do rRNA 23S são as mais frequentes causas de resistência à linezolida. Dados do programa SENTRY de vigilância dos EUA, indicam que < 1% dos *S. aureus* e 2% dos CoNS são resistentes à linezolida nos

isolados clínicos coletados nos EUA (JONES et al., 2008) . No entanto, surtos multifocais de resistência à linezolida tem sido registrados envolvendo elementos genéticos móveis que podem ser transferidos horizontalmente (MENDES et al., 2010; MORALES et al., 2010; PEER et al., 2011; TSIODRAS et al., 2001). No Brasil, a ocorrência de isolados de *Staphylococcus aureus* resistentes a linezolida (LNZ-R) tem sido documentada. Um estudo apontou uma frequência de cerca de 8% (49/613) isolados de *Staphylococcus* coagulase negativa apresentando resistência à linezolida, oriundos de pacientes sob cuidados médicos em um hospital brasileiro (DE ALMEIDA et al., 2013).

Dados de estudos recentes sugerem que o potencial de disseminação desse fenótipo de resistência é alto e vale ressaltar que os mecanismos mutacionais de resistência a linezolida são dose dependentes, acontecendo com maior frequência quando altas doses desse antibiótico são administradas (DIAZ et al., 2013; RINCÓN et al., 2014).

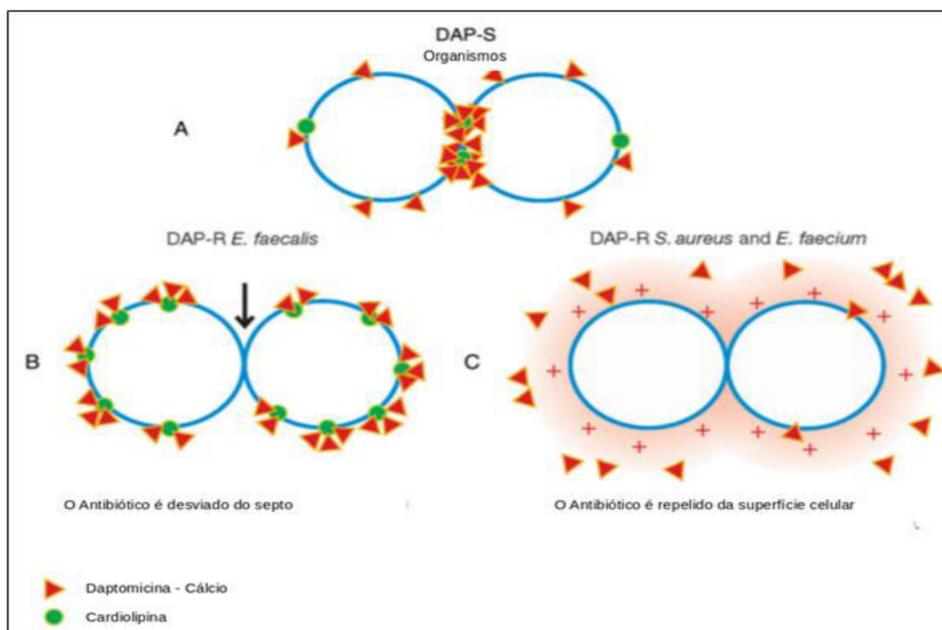
#### 2.6.4 Daptomicina

A daptomicina é um antibiótico lipopeptídeo produzida pelo *Streptomyces roseosporus* com atividade contra uma extensa variedade de patógenos Gram positivos. Foi aprovada em 2003 para uso clínico pela *Food and Drug Administration* (FDA). Ele danifica a membrana celular em um processo dependente de cálcio, principalmente nas células em divisão. A presença de fosfolípidos de membrana específicos é essencial para a atividade da daptomicina (fosfatidilglicerol, por exemplo) (BAYER; SCHNEIDER; SAHL, 2013; MURAIH et al., 2011).

A resistência durante a terapia tem sido observada, representando um importante problema que afeta a eficácia desse antibiótico. O mecanismo exato de resistência permanece incerto. Porém, estudos sugerem que esse mecanismo é complexo, diversificado e multifatorial, surgindo a partir de mutações específicas (MUNITA; BAYER; ARIAS, 2015; RINCÓN et al., 2014).

A maioria dos isolados de *S. aureus* permanecem sensíveis à daptomicina, mas estudos tem relatado o surgimento cada vez mais frequente de isolados de *S. aureus* resistentes, principalmente em pacientes que fazem uso de vacomicina (FOWLER et al., 2006; HUMPHRIES; POLLETT; SAKOULAS, 2013). Postula-se que o mecanismo de resistência em *S. aureus* seja mediado por repulsão eletrostática do complexo daptomicina– cálcio da superfície da célula, principalmente quando há aumento da carga positiva de superfície (BAYER; SCHNEIDER; SAHL, 2013). (Figura 6).

**Figura 6** - Mecanismo de ação antimicrobiano proposto para a daptomicina em *S. aureus*.



**Fonte:** Adaptado de Munita, Bayer e Arias (2015).

**Nota:** A) a daptomicina complexada com o cálcio interage com a membrana celular, principalmente na área do septo de divisão celular;  
 B) Em *Enterococcus faecalis*, o antibiótico é desviado da região do septo através da redistribuição da cardiolipina para regiões distantes do septo;  
 C) Em *S. aureus* e *Enterococcus faecium*, o complexo daptomicina–cálcio é repelido por aumento da carga positiva de superfície.

**Legenda:** DAP-R – daptomicina resistente; DAP -S: daptomicina sensível.

O gene mais comum implicado no fenótipo de resistência à daptomicina é o *mprF* (*multipeptide resistance factor*), que codifica uma enzima bifuncional (MprF), que incorpora o aminoácido lisina (carga positiva) ao fosfatidilglicerol e transloca esse fosfolípido positivamente carregado do folheto interno da membrana celular para o

folheto externo (ERNST et al., 2015). Várias mutações no gene *mprF* tem sido associadas com a resistência à daptomicina, frequentemente aumentando a expressão desse gene.

A teoria da repulsão à daptomicina também tem sido relacionada a superexpressão do operon *dlt*, responsável pela incorporação de alanina (aminoácido de carga positiva) na parede celular (YANG et al., 2009). Todavia, a repulsão não é a única explicação para a resistência à daptomicina em *Staphylococcus spp.*, uma vez que nem todos os isolados com mutações em *mprF* apresentam significantes mudanças na carga de superfície. Outra teoria para explicar esse mecanismo de resistência, inclui genes que codificam enzimas envolvidas no metabolismo dos fosfolipídios como as fosfatidilglicerol e cardiolipina codificadas pelos genes *pgsA* (diacilglicerol – 3 – fosfato – 3 fosfatidiltransferase) e *cls* (cardiolipina sintase), respectivamente (PELEG et al., 2012).

Isolados de *Staphylococcus spp.* resistentes à daptomicina demonstram importantes mudanças na síntese da parede celular, semelhantes às aquelas observadas em isolados com sensibilidade intermediária à vancomicina (VISA). Os operons *VraSR* e *WalkR*, que atuam no espessamento e mudança de cargas da parede celular, são particularmente importantes nesse processo (HUMPHRIES; POLLETT; SAKOULAS, 2013). Um estudo demonstrou que 80% dos isolados VISA também apresentavam resistência à daptomicina (PATEL et al., 2006).

O uso de antimicrobianos na prática clínica é um desenvolvimento recente na história em comparação com o surgimento de organismos bacterianos em nosso planeta. Portanto, o desenvolvimento de resistência aos antibióticos deve ser visto como uma resposta adaptativa "normal" e uma clara manifestação dos princípios de evolução de Darwin (MUNITA; BAYER; ARIAS, 2015). Para sobreviver, as bactérias, num processo provavelmente pressionado pelo aumento do uso de antimicrobianos na prática clínica, desenvolveram estratégias complexas e criativas para contornar o ataque antibiótico (CHAMBERS; DELEO, 2009; DELEO; CHAMBERS, 2009). Uma compreensão completa dos mecanismos pelos quais as bactérias se tornam resistentes aos antibióticos é de suma importância para o projeto de novas estratégias para combater a ameaça de resistência.

### 3 OBJETIVO GERAL

Avaliar os aspectos sobre a epidemiologia molecular e a susceptibilidade antimicrobiana às drogas de última linha em isolados de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* coagulase-negativa (CoNS) identificados a partir de amostras clínicas oriundas de pacientes assistidos em hospital terciário do Recife/PE.

#### 3.1 Objetivos específicos

- a) Determinar o perfil de susceptibilidade antimicrobiana dos isolados de *Staphylococcus* à metilina/oxacilina, cefoxitina, vancomicina, linezolida e daptomicina;
- b) Identificar o cassete *SCCmec* e o gene *mec* mais frequentes entre os isolados de *Staphylococcus* resistentes à oxacilina (MRSA);
- c) Identificar a presença de genes *vanA* e *vanB* nos isolados resistentes à vancomicina;
- d) Identificar as possíveis mutações nos genes *mprF* e *crf* envolvidas na redução da susceptibilidade à daptomicina e linezolida, respectivamente;
- e) Descrever a relação genética entre os isolados das espécies de *Staphylococcus* predominantes.

## 4 METODOLOGIA

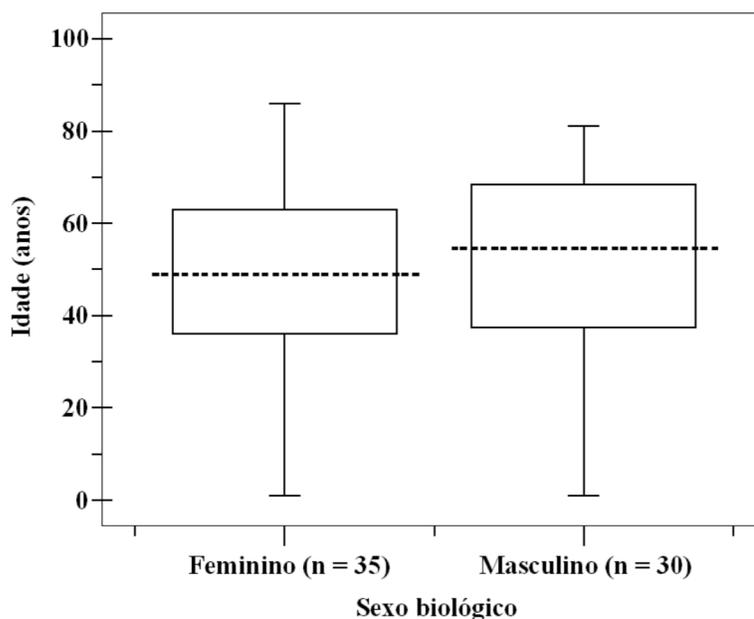
### 4.1 Isolados bacterianos

Foram incluídos nesse estudo um total de 70 amostras clínicas de *Staphylococcus* spp. obtidos por amostragem simples e de conveniência, sendo desses isolados 36 identificados como *Staphylococcus* coagulase positiva pertencentes à espécie *Staphylococcus aureus* (Apêndice A) e 34 como *Staphylococcus* coagulase negativa (33 isolados bacterianos de *Staphylococcus epidermidis* e apenas 01 (um) identificado como *Staphylococcus warneri*) (Apêndice B), oriundos de diversos sítios anatômicos de 65 pacientes assistidos em hospital terciário do Recife/PE no período de janeiro de 2016 a fevereiro de 2017. A identificação das espécies bacterianas e o perfil de susceptibilidade antimicrobiana foram primariamente determinados no laboratório de Microbiologia Clínica do próprio hospital, através de provas bioquímicas fenotípicas de rotina (p.ex. catalase, coagulase) e por meio de metodologia automatizada, Vitek® 2 (bioMérieux, Marcy L'Étoile, France).

Do total de 65 pacientes, 35 (53,9%) foram do sexo feminino e 30 (46,1%) do sexo masculino. A idade do total de pacientes variou de no mínimo 01 (um) ano até o máximo de 86 anos, sendo a sua idade média de 49 anos. Aproximadamente 91% (59/65) dos pacientes eram adultos maiores de 18 anos de idade e cerca de 34% (22/65) dos pacientes possuíam idade igual ou superior a 60 anos. A distribuição da idade por sexo biológico dos pacientes é demonstrada no Gráfico 1.

Os isolados clínicos foram coletados da rotina do laboratório e Microbiologia Clínica do hospital e armazenados em meio LB suplementado com 15% de glicerol a temperatura de 80 °C negativos no Departamento de Microbiologia do IAM/FIOCRUZ. As culturas foram realizadas em meio de cultura LB (Luria-Bertani) ou *Brain Heart Infusion* (BHI) e incubadas a  $35 \pm 2$  °C por 24 horas.

**Gráfico 1** - Distribuição por sexo biológico e idade em anos dos 65 pacientes acometidos por IRAS associadas à *Staphylococcus spp.*



Fonte: O autor

## 4.2 Considerações éticas

O presente estudo denominado “Perfil de sensibilidade e caracterização molecular de isolados clínicos de *Staphylococcus spp.* associados à IRAS (Infecções Relacionadas à Saúde Assistencial) em hospital terciário do Recife – PE” está vinculado ao Programa de Vigilância e Estudo da Resistência Bacteriana aos Antimicrobianos em andamento com a participação do Departamento de Microbiologia do IAM/Fiocruz-PE e do Serviço de Controle de Infecção Hospitalar do Hospital das Clínicas (SCIH/HC/UFPE) para o estudo da epidemiologia local da resistência bacteriana entre amostras de espécies de importância clínica. Essa proposta apreciada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do IAM, com o título “Acervo Microbiológico para Implantação de Programa de Vigilância e Estudo da Resistência Bacteriana aos Antimicrobianos: Estudo genético dos Determinantes de Resistência Antimicrobiana entre Isolados Clínicos Bacterianos” sendo sua execução aprovada (número CAAE 45080915.0.0000.5190; parecer número: 1.190.837) (Anexo A).

As amostras foram coletadas pelo Laboratório de Bacteriologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, não ocorrendo, durante a execução do presente estudo, contato dos participantes com os pacientes, mesmo assim, foram respeitados todos os preceitos éticos determinados pela Resolução 466/12, do Conselho Nacional de Saúde (BRASIL, 2012).

#### **4.3 Identificação dos isolados bacterianos por MALDI-TOF**

A identificação bacteriana foi confirmada por *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight* (MALDI-TOF) pelo sistema Biotyper MALDI (Bruker Daltonics). Essa técnica realiza a identificação de espécies bacterianas a partir dos espectros gerados pelo tempo de voo de suas proteínas ionizadas, de acordo com as suas razões massa/carga ( $m/z$ ) (CHERKAOUI et al., 2010). O método de colônia direta foi utilizado, onde duas colônias de cada isolado foram transferidas diretamente de placas de petri contendo meio de cultura *Brain Heart Infusion* (BHI) (Himedia, Mumbai, Índia) e aplicadas de forma a compor uma fina película de células nos respectivos *spots* da placa *384 polished steel* (Bruker Daltonics). Ao esfregaço de células foi adicionado 1 $\mu$ L de ácido fórmico (70%) e posteriormente, depois de secar a temperatura ambiente, foi aplicado 1 $\mu$ L de matrix (solução saturada de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico, acetonitrila 50% e ácido trifluoroacético 2,5%) e deixada à temperatura ambiente por 30 minutos para completa secagem da matriz até o instante da obtenção dos espectros proteicos. Como calibrador espectral, foi utilizado o *Protein Calibration Standard I* (Bruker Daltonics), aplicado nas mesmas condições dos isolados bacterianos. Os espectros foram obtidos manualmente para cada *spot* no Bruker Daltonics Autoflex III Smartbeam (Bruker Daltonics) utilizando os parâmetros originais previamente definidos como *MBT\_FC.par flexControl* pelo fabricante (Bruker Daltonics). Os espectros de massa foram gerados a partir dos dados provenientes de vários disparos de laser (*300-shots*) em diferentes posições de cada *spot* contendo as amostras (ALATOOM et al., 2011). Os espectros obtidos foram comparados com os espectros depositados no banco de dados do software Biotyper MALDI 2.0 (Bruker Daltonics) para a identificação do gênero e/ou espécie bacteriana. Conforme

orientações do fabricante, utilizou-se a análise das pontuações obtidas para análise da confiabilidade da identificação do gênero e/ou espécie bacteriana. Pontuações  $\geq 2.300$  foram consideradas altamente confiáveis para o gênero e espécie bacteriana, pontuações entre 2.000 e 2.299 foram consideradas confiáveis para o gênero e provável para a espécie bacteriana, pontuações entre 1.700 e 1.999 foram consideradas como identificação confiável apenas para o gênero bacteriano (+) e, por fim, pontuações  $\leq 1.699$  foram consideradas como não confiáveis (-).

#### 4.4 Teste de susceptibilidade antimicrobiana

A concentração inibitória mínima (CIM) para agentes antimicrobianos de última geração para tratamento de IRAS causadas por *Staphylococcus* spp. foi avaliada por microdiluição em caldo de acordo com as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLINICAL STANDARDS LABORATORY INSTITUTE,, 2015). A CIM de oxacilina (OXA), cefoxitina (FOX), vancomicina (VAN), daptomicina (DAP) e linezolida (LNZ) foram determinadas para os isolados e os mesmos classificados quanto a sua sensibilidade, como sensíveis, intermediários ou resistentes a cada droga testada, de acordo com os critérios estabelecidos pelo documento M100-S28 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLINICAL STANDARDS LABORATORY INSTITUTE, 2018) e BrCAST (BRAZILIAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING, 2018).

Para o teste de sensibilidade aos antimicrobianos, foram confeccionadas placas de microdiluição de 96 poços contendo uma diluição seriada de cada antimicrobiano a uma concentração correspondente ao dobro das concentrações desejadas em cada coluna em um volume de 50  $\mu\text{L}$  de CA-MHB (*Cation-adjusted Müller-Hinton broth*, Fluka – Sigma-Aldrich). O inóculo bacteriano foi preparado pela técnica de suspensão direta de colônias crescidas em placas contendo ágar Müller-Hinton (Himedia) em 1 mL de CA-MHB estéril até uma densidade  $\text{OD}_{625\text{nm}}$  de 0,08 – 0,13 UA, determinada em espectrofotômetro *UV 1101 Biotech Photometer* (WPA), correspondente a 0,5 da escala de McFarland ou  $1-5 \times 10^8$  UFC/mL. Essa suspensão foi subsequentemente diluída 1:1000 em CA-MHB em volume suficiente para inoculação dos poços da placa

de microdiluição. Um volume de 50 µL desta última diluição foi inoculado simultaneamente com o auxílio de pipetador automático multicanal em cada poço da placa previamente confeccionada, de modo que, ao final dessa etapa, cada poço contivesse um volume final de 100 µL, contendo a concentração final desejada para cada antimicrobiano e uma densidade celular bacteriana de cerca de  $1-5 \times 10^5$  UFC/mL. Como controle positivo do crescimento bacteriano foram inoculados poços contendo CA-MHB livre de antimicrobianos e, como controle negativo de crescimento foram reservados poços contendo apenas CA-MHB, sem inoculação.

As placas foram confeccionadas e inoculadas seguindo recomendações de boas práticas de laboratório em capela de fluxo laminar. Após inoculação, as mesmas foram incubadas por 18-24 horas, a  $35 \pm 2$  °C e após esse período, inspecionadas visualmente para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM), que é considerada a menor concentração de cada antimicrobiano capaz de inibir o crescimento bacteriano.

Como controle de qualidade, foram utilizadas cepas da *American Type Culture Collection* (ATCC) de *S. aureus* ATCC® 29213. A microdiluição em caldo é a metodologia considerada padrão ouro para avaliação de susceptibilidade antimicrobiana. As soluções concentradas de cada antimicrobiano foram preparadas numa concentração 200 vezes superior à desejada e diluída 1:10 (v/v) em caldo Mueller-Hinton (Difco) para a obtenção da maior concentração de cada antimicrobiano

#### **4.5 Estudo genético dos determinantes de resistência aos antimicrobianos**

A pesquisa dos determinantes de resistência aos antimicrobianos testados foi realizada pela pesquisa dos seus genes codificantes por PCR e sequenciamento de acordo com metodologia abaixo descrita.

#### **4.6 Extração de DNA genômico bacteriano**

A extração do DNA genômico foi feita a partir da utilização do *DNeasy Blood & Tissue Kit* conforme recomendações do fabricante, (Quiagen, Hilden, Germany). Uma colônia de cada isolado previamente cultivada em meio LB foi transferida para 3 mL de caldo BHI. A cultura foi incubada a  $35 \pm 0,5$  °C *overnight*. Um volume de 1 mL da suspensão de células bacterianas foi utilizado para a extração de DNA genômico, conforme recomendado pelo *DNeasy Blood & Tissue Handbook* (Quiagen, Hilden, Germany). A concentração da solução de DNA foi determinada em espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000 UV-Vis (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, EUA) e armazenadas a -20 °C até seu uso.

#### 4.7 Identificação do cassete *SCCmec*

Para caracterização do cassete cromossomal envolvido no processo de resistência à meticilina/oxacilina (*SCCmec*), utilizou-se a tipagem por PCR multiplex (M-PCR) conforme metodologia previamente descrita (ZHANG et al., 2005), que identifica os cassetes do tipo I a V e os subtipos IV<sub>a</sub>, IV<sub>b</sub>, IV<sub>c</sub>, IV<sub>d</sub>, mais comumente encontrado em isolados associados à infecções Estafilocócicas resistentes à meticilina/oxacilina, além da presença do gene *mecA*, que codifica para transpeptidase PBP2a de baixa afinidade pelos β-lactâmicos. Como controles para as reações de PCR foram utilizados os isolados 119a (*SCCmec* tipo I), 843a (*SCCmec* tipo II), 63a (*SCCmec* tipo III), 1008a (*SCCmec* tipo IV) (CABLOCO, 2013; TEIXEIRA, 2012; VIVARI, 2006).

Aproximadamente 50 ng de DNA foram adicionados a 25µL de reação de M-PCR contendo: 50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada deoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dTTP, dGTP, and dCTP) (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA), 1,2 U de *Platinum Taq DNA polymerase* (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA). Os oligonucleotídeos utilizados e as respectivas concentrações empregadas nas reações de M-PCR encontram-se listados na Tabela 01. A amplificação foi realizada no termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia) iniciando com uma etapa de denaturação do DNA a 94 °C por 5 minutos, seguida por 10 ciclos de 94 °C por 45 segundos, 65 °C por 45 segundos e 72 °C por

90 segundos e adicionais 25 ciclos de 94 °C por 45 segundos, 55 °C por 45 segundos e 72 °C por 90 segundos e uma etapa de extensão final de 10 minutos a 72 °C. Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose e visualizados após revelação com SYBR Safe DNA Gel Stain (Sigma–Aldrich, USA). Para a pesquisa do gene PVL (Leucocidina Panton-Valentine) foi realizada reação de PCR conforme metodologia estabelecida por Campbell e colaboradores (2008). As sequências de *primers* para a pesquisa desse gene de virulência encontram-se descritas na Tabela 1.

**Tabela 1** - Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação dos *SCCmec* em *Staphylococcus* spp.

<i>Primer</i>	Sequencia (5'-3')	Conc. (µM)	Tamanho do produto (pb)	Especificidade
Type I-F	GCTTTAAAGAGTGTCTGTTACAGG	0,048	613	SCC <i>mec</i> I
Type I-R	GTTCTCTCATAGTATGACGTCC			
Type II-F	CGTTGAAGATGATGAAGCG	0.032	398	SCC <i>mec</i> II
Type II-R	CGAAATCAATGGTTAATGGACC			
Type III-F	CCATATTGTGTACGATGCG	0,04	280	SCC <i>mec</i> III
Type III-R	CCTTAGTTGTCGTAACAGATCG			
Type IVa-F	GCCTTATTCGAAGAAACCG	0.104	776	SCC <i>mec</i> IVa
Type IVa-R	CTACTCTTCTGAAAAGCGTGC			
Type IVb-F	TCTGGAATTACTTCAGCTGC	0.092	493	SCC <i>mec</i> IVb
Type IVb-R	AAACAATATTGCTCTCCCTC			
Type IVc-F	ACAATATTTGTATTATCGGAGAGC	0.078	200	SCC <i>mec</i> IVc
Type IVc-R	TTGGTATGAGGTATTGCTGG			
Type IVd-F	CTCAAATACGGACCCCAATACA	0.28	881	SCC <i>mec</i> IVd
Type IVd- R	TGCTCCAGTAATTGCTAAAAG			
Type V-F	GAACATTGTTACTTAAATGAGCG	0.06	325	SCC <i>mec</i> V
Type V-R	TGAAAGTTGTACCCTTGACACC			
MecA147-F	GTGAAGATATACCAA GTG ATT	0.046	147	<i>mecA</i>
MecA147-R	ATGCGCTATAGATTGAAAGGAT			
PVL-F	TGCCAGACAATGAATTACCCCAT	0.08	846	PVL
PVL-R	TCTGCCATATGGTCCCCAACCA			

Fonte: O autor.

#### 4.8 Estudo genético dos determinantes de resistência à vancomicina

Os genes que codificam determinantes de resistência à vancomicina, *vanA* e *vanB*, foram investigados através da reação de M-PCR utilizando pares oligonucleotídeos iniciadores específicos para *vanA* (*vanA<sub>F</sub>*: 5'-ATGAATAGAATAAAAGTTGC-3' e *vanA<sub>R</sub>*: TCACCCCTTTAACGCTAATA) e *vanB* (*vanB<sub>F</sub>*: 5'-GTGACAAACCGGAGGCGAGGA e *vanB<sub>R</sub>*: 5'-

CCGCCATCCTCCTGCAAAAAA-3'), segundo protocolo adaptado de Clark et al (1993). A amplificação por PCR foi realizada em reação de PCR com volume final de 20 µl contendo: 1x PCR *buffer* [16 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 67 mM Tris-HCl (pH 8.8)], 0,2 µM de cada desoxinucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Promega Corp., Madison, Wis.), 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µM de cada primer e 1U de *Platinum* Taq DNA polimerase (Invitrogen). Para reação de amplificação por PCR, as reações foram submetidas a condições de denaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, seguidos por 30 ciclos: denaturação inicial a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 60 °C por 30 segundos, extensão a 72 °C por 30 segundos e uma extensão final a 72 °C por 7 minutos. Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose e visualizados após revelação com SYBR Safe DNA Gel Stain (Sigma–Aldrich, USA).

#### **4.9 Estudo dos determinantes genéticos de resistência à daptomicina e linezolida**

Os determinantes de resistência à daptomicina e linezolida, *mprF* (YANG et al., 2009) e *crf* (RAJAN; KUMAR; GOPAL, 2014), foram avaliados nesse estudo por da reação de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) seguidas por sequenciamento do produto de PCR, conforme metodologia previamente descrita (RAJAN; KUMAR; GOPAL, 2014; YANG et al., 2009). Após a amplificação, os produtos da PCR foram purificados com o com o *ExoSAP-IT PCR Product Cleanup kit* (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) e quantificados em *NanoDrop 2000c* (Thermo Fisher Scientific Inc. Hampton, EUA). O sequenciamento foi realizado pela técnica de Método dideoxi ou de terminalização (Sanger) com o *BigDye Terminator Sequencing Kit*, conforme recomendação do fabricante (Thermo Fisher Scientific). Os produtos da PCR foram submetidos a reações feitas individualmente contendo apenas um dos oligonucleotídeos *forward* ou *reverse* para cada gene alvo em condições de termociclagem com etapa de desnaturação inicial de 2 minutos a 94 °C, seguida por 40 ciclos de 94 °C por 10 segundos, 55 °C por 10 segundos e 60 °C por 4 minutos cada, realizada em termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems). Os produtos das reações de sequenciamento foram precipitados e ressuspendidos

em 10 µL de Hi-Di Formamida (Applied Biosystems) e posteriormente aplicados no sequenciador *3500 xL Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) no Núcleo de Plataformas Tecnológicas do Instituto Aggeu Magalhães (IAM/Fiocruz-PE). Os cromatogramas foram analisados com o *software* Chromas Lite 2.1.1 (Technelysium) e os *contigs* montados com o *software* *BioEdit Sequence Alignment Editor* (Tom Hall), sendo posteriormente comparados com as sequências gênicas de DNA disponíveis no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) com a ferramenta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).

#### **4.10 Determinação da relação genética entre os isolados pelo padrão de restrição genômico em eletroforese em campo pulsátil (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis* - PFGE)**

A técnica de PFGE é a mais aplicada para estudos epidemiológicos moleculares de diferentes patógenos devido a sua alta resolutividade, reprodutibilidade e poder discriminatório. A técnica baseia-se na clivagem e análise de grandes fragmentos de DNA cromossomal bacteriano gerados após clivagem com enzima de restrição de corte raro, posteriormente resolvido por eletroforese em campo pulsado com mudanças periódicas da orientação do campo elétrico através do gel.

Os isolados foram plaqueados em ágar sangue e, após uma incubação a 37°C *overnight*, uma colônia foi transferida para 5 mL de meio LB (Luria Bertani). A suspensão novamente foi incubada a 37°C *overnight*. No dia seguinte, as suspensões foram centrifugadas (12000 rpm por 5 minutos), o sobrenadante foi descartado e os *pellets* foram pesados em balança analítica. O sedimento bacteriano obtido foi ressuspensionado em salina (0,85% m/v) na proporção 1:1 (volume diluente/peso do material centrifugado) e homogeneizados. Dessa ressuspensão, cerca de 10µL foram adicionados a 300µL de tampão de lise EC (Tris 6mM, ph 6.5; NaCl 1M; EDTA 0.01M, Sarcosil 0.5%; Brij 58 0.5% e Deoxiglicolato 0.2%) e 340µL de agarose *low melting*. A solução resultante foi imediatamente aplicada em moldes para a confecção dos *plugs* (blocos de gel contendo células bacterianas).

Após a solidificação, os blocos de agarose foram incubados a 37°C *overnight* em 2mL de tampão de lise EC e 15µL de lisostafina (1mg/mL) (Sigma-Aldrich, US). No dia seguinte, os blocos de agarose foram lavados a cada 1h durante 2h com o tampão CHEF-TE (Tris 0.1M; pH 7.5 e EDTA 0.1M). Após essa etapa, adicionou-se 2mL de tampão ES (EDTA tetrassódico 1M, pH 8,0; sarcosil 5%) e 100µL de proteinase K (20mg/mL). A placa novamente foi incubada a 37°C *overnight*. Posteriormente, os blocos de agarose foram lavados a cada 1h durante 4h com tampão CHEF-TE para remover o excesso de proteinase K. Em seguida, os *plugs* foram lavados a cada 30 minutos por 2h com tampão DNS (0.1 M Tris PH8.0, 5 mM MgCl<sub>2</sub>). Então, a digestão do DNA foi realizada utilizando-se 20U de *Sma*I (New England Biolabs, Frankfurt, Germany) para um volume de reação de 50µL por 18h a 25°C. Os fragmentos de DNA foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) diluída em tampão Tris/Borato/EDTA (TBE 0.5x) utilizando um aparelho de campo elétrico homogêneo com fixação de contorno [sistema CHEF-DRIII (BioRad Laboratories, Califórnia, EUA)]. Os parâmetros de corrida foram os seguintes: pulso inicial de 5 segundos, pulso final de 60 segundos, 6V/cm de força, tempo de corrida de 23h, temperatura a 14°C e TBE 0,5X como tamão de corrida. Depois da eletroforese, o gel foi fixado em brometo de etídio (0,5µg/mL) durante 1h, seguido por descoloração em água destilada por igual período. Finalmente, o gel foi fotografado em transiluminador UV. O software BioNumerics 7.5 (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica) foi utilizado para análise do perfil de restrição e clusterização de acordo com os critérios estabelecidos por Tenover et al. (1995).

#### **4.11 Análises dos dados**

Os resultados foram avaliados qualitativamente pela análise estatística descritiva dos dados coletados e armazenados em banco de dados pelo software SPSS 13.0 (*Statistical Product and Service Solutions*®) e apresentados na forma de gráficos e tabelas.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Distribuição dos isolados de *Staphylococcus* spp.

As amostras clínicas de *Staphylococcus* analisadas neste estudo tiveram sua identificação confirmada por MALDI-TOF. Da maioria dos pacientes (92,3%; 60/65) foram incluídas somente um único isolado, com exceção de 05 (cinco) deles, dos quais, 02 (dois) apresentaram 02 (duas) amostras de *S. aureus* oriundas de sítios anatômicos distintos e isolados com pelo menos 01 (um) mês de intervalo entre eles [paciente P13 (isolados *S. aureus* C113 e C282) e P19 (C162 e C250)] e 03 (três) pacientes (P37, P45 e P55) que apresentaram cada um simultaneamente amostras de *S. aureus* e *S. epidermidis* [(C292 e C329), (C305 e C434), (C447 e C413)], respectivamente.

Os sítios anatômicos dos quais as espécies foram isoladas foram: sangue (hemoculturas), abscesso, secreção de ferida operatória (pele e partes moles), ponta de cateter, fragmento de osso, líquidos cavitários (líquido ascítico, líquido pleural), culturas de vigilância (*swab* nasal e *swab* retal) (Tabela 2). Em sua maioria, 71% (50/70) dos isolados foram provenientes de hemocultura (infecção da corrente sanguínea), das quais 50% (25/50) foi positiva para *S. aureus* e 50% para CoNS (24 *S. epidermidis* e 01 *S. warneri*).

**Tabela 2** - Frequência de amostras de *Staphylococcus* spp. por sítio de isolamento primário.

Sítio	<i>S. aureus</i> (%)	CoNS (%)	Total (%)
Sangue (hemoculturas)	25 (69,4)	25 (73,5)	50 (71,4)
Pele e partes moles <sup>a</sup>	5 (14,3)	0 (0)	5 (7,14)
Ponta de cateter	3 (8,3)	1 (2,9)	4 (5,7)
Outros <sup>b</sup>	3 (8,3)	4 (11,4)	7 (10)
Culturas de vigilância <sup>c</sup>	0 (0)	4 (11,4)	4 (5,7)
Total	36 (100)	34 (100)	70 (100)

**Fonte:** O autor.

**Nota:** <sup>a</sup> partes moles (ferida operatória e abscesso); <sup>b</sup> líquidos cavitários (líquido ascítico, líquido pleural, fragmento ósseo, lavado broncoalveolar); <sup>c</sup> *swab* retal e *swab* nasal.

Cerca de 18,5% (12/65) dos pacientes dos quais foram recuperadas as amostras clínicas de *Staphylococcus* spp. analisadas neste estudo estavam sabidamente sendo assistidos em unidade de terapia intensiva (UTI), e seu restante (53/65; 81,5%) estavam hospitalizados nas enfermarias (nefrologia, oncologia, ortopedia, clínica médica, cirurgia vascular), designados aqui como sendo não oriundos de UTI (Tabela 3).

Das amostras identificadas como sendo provenientes de pacientes em UTI, aproximadamente 92% (11/12) foram de espécie CoNS, enquanto que entre os pacientes atendidos fora da UTI foram isolados com maior frequência a espécie *S. aureus* (46%, 30/65).

**Tabela 3** - Distribuição dos isolados entre os pacientes assistidos por unidade de tratamento.

<b>Espécie</b>	<b>UTI (%)</b>	<b>Não-UTI (%)</b>	<b>Total (%)</b>
<i>Staphylococcus aureus</i>	01 (8,3)	30 (46,1)	31 (47,7)
CoNS	11 (91,7)	23 (35,4)	34 (52,3)
<b>Total</b>	<b>12 (18,5)</b>	<b>53 (81,5)</b>	<b>65 (100,0)</b>

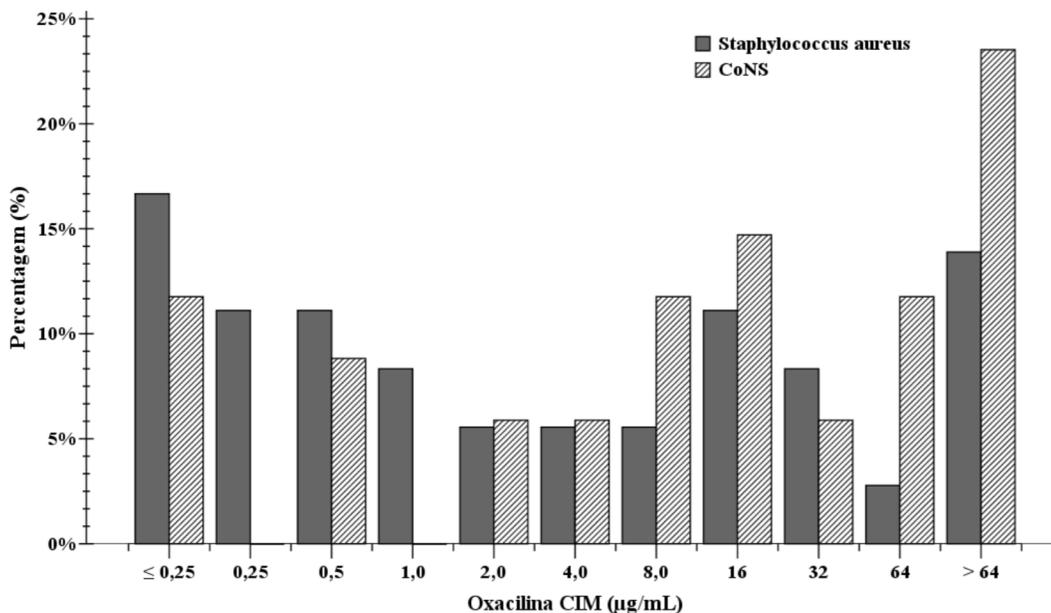
**Fonte:** O Autor.

**Nota:** UTI, Unidade de Terapia Intensiva; CoNS, *Staphylococcus* coagulase-negativo.

## 5.2 *Staphylococcus* spp. e a resistência à oxacilina e cefoxitina

O Gráfico 2 apresenta a distribuição das CIMs de oxacilina entre os 70 isolados de *Staphylococcus* avaliados neste estudo. Entre os 36 isolados de *S. aureus*, 52,7% (19/36) apresentaram CIM para oxacilina  $\leq 2$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  e 47,2% (17/36) apresentaram CIM  $\geq 4$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ . 75% (27/36) dessas amostras foram classificadas como MRSA (*Staphylococcus aureus* meticilina/oxacilina resistente) e 25% (09/36) como MSSA (*Staphylococcus aureus* meticilina/oxacilina sensível). Em relação aos CoNS, o percentual de amostras com CIM  $< 0,5$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  foi de 11,8% (4/34), enquanto que 88,2% (30/34) apresentaram CIM  $\geq 0,5$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ , sendo estes classificados como MRS (*Staphylococcus* sp. resistente à meticilina/oxacilina).

**Gráfico 2** - Distribuição dos valores das CIMs de oxacilina entre os isolados de *Staphylococcus aureus* e CoNS oriundos dos pacientes assistidos entre janeiro de 2016 e fevereiro de 2017.



**Fonte:** O autor.

**Nota:** CIM: Concentração inibitória mínima, CoNS: *Staphylococcus coagulase negativa*.

A oxacilina apresentou menor atividade contra os isolados de CoNS (CIM<sub>50</sub> = 16 µg/mL), sendo oito vezes mais potente contra os isolados de *S. aureus* (CIM<sub>50</sub> = 2 µg/mL), observando-se neste grupo menor frequência de isolados resistentes (75%) (27/36) em relação à frequência observada nas amostras de CoNS (88,2%) (30/34) (Tabelas 4 e 5). A cefoxitina apresentou baixa eficácia contra os isolados de *S. aureus* (CIM<sub>50</sub> = 8 µg/mL), tendo sido observado nesse grupo um percentual de resistência a este antimicrobiano de 58,3% (21/36).

**Tabela 4** - Perfil de sensibilidade à oxacilina e cefoxitina das 36 amostras clínicas de *Staphylococcus aureus* isoladas de pacientes hospitalizados entre janeiro de 2016 e fevereiro de 2017.

Antimicrobiano	<i>Staphylococcus aureus</i> (n = 36)				
	CIM (µg/mL):			% por categoria	
	CIM <sub>50</sub>	CIM <sub>90</sub>	Variação	S	R
Oxacilina	2	> 64	≤ 0,25 - > 64	25 (09)	75 (27)
Cefoxitina	8	32	≤ 0,5 - >64	41,7 (15)	58,3 (21)

**Fonte:** O Autor.

**Nota:** CoNS: *Staphylococcus coagulase negativa*, CIM: Concentração inibitória mínima.

**Tabela 5** - Perfil de sensibilidade à oxacilina das 34 amostras clínicas de *Staphylococcus* coagulase negativo (CoNS) isoladas de pacientes hospitalizados entre janeiro de 2016 e fevereiro de 2017.

Antimicrobiano	CoNS (n = 34)				
	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ):			% por categoria	
	CIM <sub>50</sub>	CIM <sub>90</sub>	Variação	S	R
Oxacilina	16	> 64	$\leq 0,25$ - > 64	11,8 (4)	88,2 (30)
Cefoxitina	16	> 64	0,5 - > 64	NA	NA

**Fonte:** O Autor.

**Nota:** CoNS: *Staphylococcus* coagulase negativa, CIM: Concentração inibitória mínima. NA: não aplicável interpretação para CIM de cefoxitina.

Para confirmar o perfil de resistência à metilicina/oxacilina em *S. aureus*, realizou-se a avaliação da sensibilidade à cefoxitina. A Tabela 6 apresenta a distribuição das CIM de cefoxitina e oxacilina observadas entre os isolados de *S. aureus* selecionados para este estudo. Quatro amostras de *S. aureus* (11,1%) (4/36) apresentaram sensibilidade à oxacilina (CIM  $\leq 2$   $\mu\text{g/mL}$ ) e resistência à cefoxitina (CIM  $\geq 8$   $\mu\text{g/mL}$ ). Aproximadamente 47% (17/36) dos isolados de *S. aureus* foram resistentes aos dois antimicrobianos, enquanto que 41,6% (15/36) foram sensíveis a ambos. Quanto aos CoNS, os critérios da CLSI e BrCAST estabelecem que isolados com CIM para a oxacilina  $\geq 0,5$   $\mu\text{g/mL}$  e/ou positivos para o gene *mecA* são caracterizados como resistentes (MRS).

**Tabela 6** - Distribuição dos 36 isolados de *S. aureus* quanto às CIMs para a oxacilina e cefoxitina. A região sombreada destaca os isolados que apresentaram sensibilidade à oxacilina e resistência à cefoxitina.

CIM cefoxitina (µg/mL)	CIM de oxacilina (µg/mL)								Total
	≤0,5	1,0	2,0	4,0	8,0	16	32	64	
≤0,5	02								02
1	01								01
2	05		01						06
4	04	02							06
8	02	01		01	02	01	01		08
16			01	01		02	01	02	07
32						01	01	01	03
64								03	03
<b>Total</b>	<b>14</b>	<b>03</b>	<b>02</b>	<b>02</b>	<b>02</b>	<b>04</b>	<b>03</b>	<b>06</b>	<b>36</b>

**Fonte:** O Autor.

**Nota:** CIM: Concentração inibitória mínima.

Quanto aos isolados MRSA, observou-se que em 85,2% (23/27) foram positivos para a investigação do gene *mecA* por PCR (Tabela 07), sendo este elemento, carregado principalmente pelo *SCCmec* II (37%) (10/27) (Figura 07). O fenótipo MRSA foi observado em cinco clones diferentes (A, B, C, D e E), sendo o clone A o mais frequente (48,1%, 13/27), seguido dos clones D e C com 22,2% (6/27) e 18,5% (n = 05), respectivamente.

Cerca de 11% (3/27) dos MRSA foram *mecA* negativos, indicando a presença de outros determinantes genéticos de resistência, sendo que um desses isolados apresentou o cassete *SCCmec* tipo IVc. Entre as amostras que apresentaram resistência à cefoxitina (FOX-R) e sensibilidade à oxacilina (OXA-S), três amostras foram positivas para o gene *mecA* e pertencentes aos clones A e D. 22,2% (6/27) dos MRSA foram sensíveis à oxacilina e cefoxitina, porém *mecA* positivos, sendo classificados como OS-MRSA-*mecA*+. Nesses isolados, observou-se que duas amostras carregavam o cassete *SCCmec* III e outras duas eram portadoras do *SCCmec* IVa. 25% (9/36) das amostras de *S. aureus* foram classificadas como MSSA-*mecA*<sup>(-)</sup>, sendo estes isolados não tipáveis para o *SCCmec* e pertencentes a dois clones diferentes (A e C), com predominância do A (n = 06). Observou-se a presença

do gene PVL em um isolado pertencente ao fenótipo OS-MSSA-*mecA*<sup>+</sup> e em outro pertencente ao fenótipo MRSA-*mecA*<sup>(+)</sup> (Tabelas 7 e 8).

**Tabela 7** - Fenótipos de sensibilidade em relação à oxacilina, presença do gene *mecA*, presença do gene PVL e perfil clonal observados nos 36 isolados de *S. aureus*.

Fenótipos	n (%)	PVL	PFGE	Total
<b>MRSA</b>				
MRSA- <i>mecA</i> <sup>(+)</sup>	14 (52)	01 (3,7)	A (n = 07) B (n = 01) C (n = 03) D (n = 03)	
MRSA- <i>mecA</i> <sup>(-)</sup>	03 (11,1)	0 (0)	A (n = 01) C (n = 01) D (n = 01)	A (n = 13) B (n = 01) C (n = 05) D (n = 06) E (n = 01) NT (n = 01)
OS-MRSA- <i>mecA</i> <sup>(+)</sup>	06 (22,2)	01 (3,7)	A (n = 03) C (n = 01) D (n = 01) E (n = 01)	
Cefoxitina R/ Oxacilina S	04 (14,8)	0 (0)	A (n = 02) D (n = 01) NT (n = 01)	
<b>Sub-Total</b>	<b>27 (75)</b>		<b>27 (100)</b>	<b>27 (100)</b>
MSSA- <i>mecA</i> <sup>(-)</sup>	09 (25)	0 (0)	A (n = 06) C (n = 03)	A (n = 06) C (n = 03)
<b>Total</b>	<b>36 (100)</b>	<b>2 (7,4)</b>	<b>36 (100)</b>	<b>36 (100)</b>

**Fonte:** O Autor.

**Nota:** MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente à metilina, MSSA: *Staphylococcus aureus* sensível à metilina, OS-MRSA: *Staphylococcus aureus* oxacilina sensível-metilina resistente. NT: Não tipável.

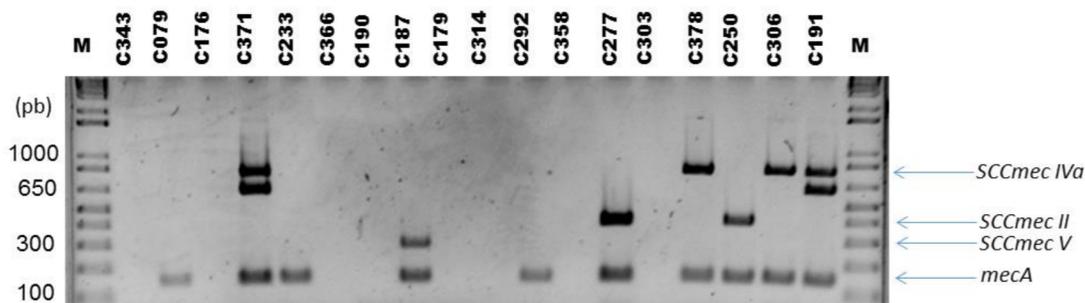
**Tabela 8** - Cassetes *SCCmec* identificados nos isolados de *S. aureus* MRSA.

Fenótipo	<i>SCCmec</i> em <i>S. aureus</i> (%)					Total
	II	III	IV	V	NT	
<b>MRSA</b>						
MRSA- <i>mecA</i> <sup>(+)</sup>	09 (33,3)	01 (3,7)	01 (3,7)	01 (3,7)	02 (10,8)	14(51,8)
MRSA- <i>mecA</i> <sup>(-)</sup>	0 (0)	0 (0)	01* (3,7)	0 (0)	02 (7,4)	03 (10,1)
OS-MRSA- <i>mecA</i> <sup>(+)</sup>	0 (0)	02 (3,7)	02 (3,7)	0 (0)	02 (7,4)	06 (20,2)
FOX-R/OXA-S	01 (3,7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	03 (10,1)	04 (14,8)
<b>Total</b>	<b>10 (37)</b>	<b>03 (11)</b>	<b>04 (14,8)</b>	<b>01 (3,7)</b>	<b>09 (33,3)</b>	<b>27 (100)</b>
<b>MSSA</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	09 (100)	09 (100)
<b>Total</b>	<b>10 (27)</b>	<b>03 (2,7)</b>	<b>04 (8,3)</b>	<b>01 (8,3)</b>	<b>18 (50)</b>	<b>36 (100)</b>

Fonte: O Autor.

Nota: MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina/oxacilina, MSSA: *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina/oxacilina, OS-MRSA: *Staphylococcus aureus* oxacilina sensível-meticilina resistente. NT: Não tipável. MSSA *mec*<sup>+</sup>: *Staphylococcus aureus* sensível à oxacilina *mecA* positivo, MRSA *mec*<sup>-</sup>: *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina/oxacilina e negativo para o *mecA*, FOX- R: cefoxitina resistente, OXA-S: meticilina/oxacilina sensível.

\**SCCmec* IVc

**Figura 7** - Amplificação dos cassetes cromossomais *SCCmec* e do gene *mecA* em isolados de *S. aureus* e CoNS por PCR multiplex. Na figura estão assinalados os amplicons correspondentes aos cassetes *SCCmec* tipo IVa, II, V e o gene *mecA*.

Fonte: O autor.

Nota: M: marcador de peso molecular, pb: pares de base.

Entre os CoNS, observou-se que em 93,3% (28/30) dos oxacilina resistentes (MRS) foram *mecA* positivos, apresentando como principal carreador desse gene o *SCCmec* IVa (29,4%) (10/34). O gene PVL foi observado em apenas uma amostra (3,3%, 1/30). Quanto à distribuição clonal dos isolados resistentes à meticilina/oxacilina, o perfil B foi o mais frequente (34,4%, 10/29), seguido pelo D (27,6%, 8/29) e C (13,8%, 4/29). Os quatro isolados sensíveis a meticilina/oxacilina (MSS) foram *mecA* negativos, entretanto, dois isolados foram classificados como não tipáveis quanto a presença do cassete *SCCmec*, um foi portador do cassete *SCCmec*

II e outro do cassete *SCCmec* III. Esses isolados foram pertencentes aos clones B (n= 01), A (n = 01) e E (n = 02) (Tabela 9 e 10).

**Tabela 9** - Fenótipos de sensibilidade em relação à oxacilina, presença do gene *mecA* e perfil clonal observados nos 34 isolados de CoNS.

Fenótipo	n (%)	<i>mecA</i> <sup>(+)</sup> (n)	PVL (%)	PFGE ( <i>S. epidermidis</i> )
MRS	30 (88,2)	28 (93,3)	01 (3,3)	B (n = 10), D (n=08), C (n = 04), A (n = 02), F (n = 01), NT (n = 04)
MSS	04 (11,8)	0 (0)	0 (0)	B (n = 01), A (n = 01), E (n = 02)
<b>Total</b>	<b>34 (100)</b>	<b>28 (93,3)</b>	<b>01 (3,3)</b>	<b>34(100)</b>

**Fonte:** O Autor.

**Nota:** MRS, *Staphylococcus* spp. resistentes à metilina/oxacilina; MSSA, *Staphylococcus* spp. sensíveis à metilina/oxacilina.

**Tabela 10** - Cassetes *SCCmec* identificados nos isolados de CoNS. Distribuição de acordo com o fenótipo de resistência à oxacilina.

Fenótipo	SCCmec em CoNS (%)						Total
	I	II	III	IVa	V	NT	
MRS	0 (0)	02 (5,8)	5 (14,7)	10 (29)	02 (5,8)	11 (32,4)	30 (88,2)
MSS	0 (0)	01 (2,9)	01 (2,9)	0 (0)	0 (0)	02 (5,8)	04 (11,8)
<b>Total</b>	<b>0 (0)</b>	<b>03 (8,8)</b>	<b>5 (14,7)</b>	<b>10 (29)</b>	<b>04 (11,6)</b>	<b>12 (35,3)</b>	<b>34 (100)</b>

**Fonte:** O Autor.

**Nota:** *SCCmec*: Cassete Estafilocócico para o gene *mec*. MRS: *Staphylococcus* sp. resistente à metilina/oxacilina. MSSA: *Staphylococcus* sp. sensível à metilina/oxacilina.

Quanto ao sítio de isolamento primário distribuição por sítio de infecção verificou-se que 27% (19/70) dos isolados foram MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina) de hemoculturas e 31,4% (22/70) foram oxacilina resistentes pertencentes ao grupo dos CoNS. Entre os susceptíveis, a frequência maior foi de *S.aureus* (MSSA) (*Staphylococcus aureus* sensível à oxacilina) 12,8% (09/70). Em culturas de vigilância, todas as amostras foram oxacilina resistente do grupo dos CoNS (Tabela 11).

**Tabela 11** - Distribuição dos isolados de *Staphylococcus* spp. quanto à sensibilidade à oxacilina e ao sítio de isolamento primário.

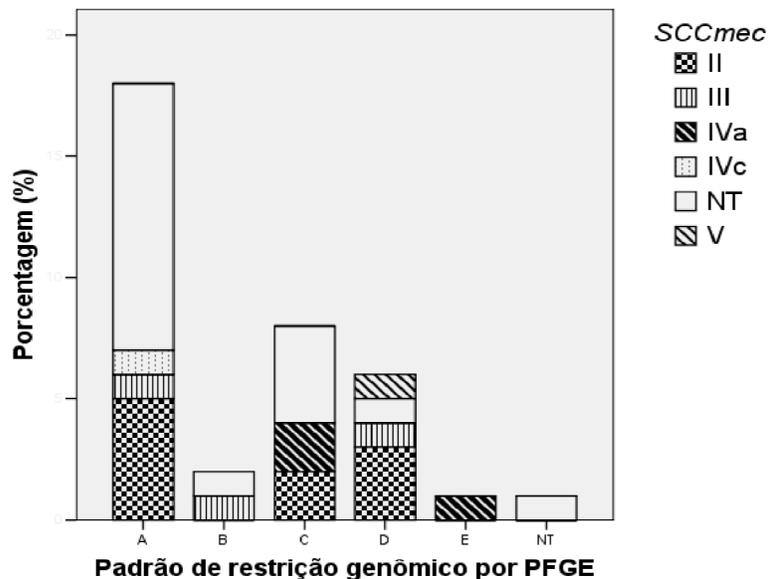
Sítio de isolamento	<i>S. aureus</i>		CoNS	
	MRSA	MSSA	MSS	MRS
Sangue (hemoculturas)	19 (27,1)	06 (8,5)	03 (4,2)	22 (31,4)
Pele e partes moles <sup>b</sup>	04 (5,7)	01 (1,4)	0 (0)	0 (0)
Ponta de catéter	03 (4,2)	0 (0)	0 (0)	01 (1,4)
Outros <sup>c</sup>	01 (1,4)	02 (2,8)	01 (1,4)	03 (4,2)
Culturas de vigilância <sup>d</sup>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	04 (5,7)
<b>Total</b>	<b>27 (38,5)</b>	<b>09 (12,8)</b>	<b>04 (5,7)</b>	<b>30 (42,8)</b>

**Fonte:** O Autor.

**Nota:** ORS, *Staphylococcus* spp. resistentes à oxacilina; OSS, *Staphylococcus* spp. sensíveis à oxacilina; CoNS, *Staphylococcus* coagulase negativa. MRS, *Staphylococcus* spp. resistentes à meticilina/oxacilina; MSS, *Staphylococcus* spp. sensível à meticilina/oxacilina; <sup>b</sup> partes moles (ferida operatória e abscesso); <sup>c</sup> outros (líquido ascítico, líquido pleural, fragmento ósseo, lavado broncoalveolar); <sup>d</sup> *swab* retal e *swab* nasal.

Quanto à distribuição dos cassetes *SCCmec* entre os perfis clonais de *S. aureus*, foi observado que no clone A cerca de 26,3% (05/19) foram classificados como *SCCmec* II e 63% (12/19) foram classificados como não tipáveis (NT). Um isolado pertencente a esse clone foi classificado como *SCCmec* tipo IVc e outro foi classificado como *SCCmec* tipo V (Gráfico 3). Em relação aos CoNS, 36,3% dos isolados (04/11) do clone B apresentaram o *SCCmec* IVa (Gráfico 4) e 27,3% (3/11) das amostras desse grupo foram classificadas como *SCCmec* III. No clone D, 38% (3/8) foram *SCCmec* IVa.

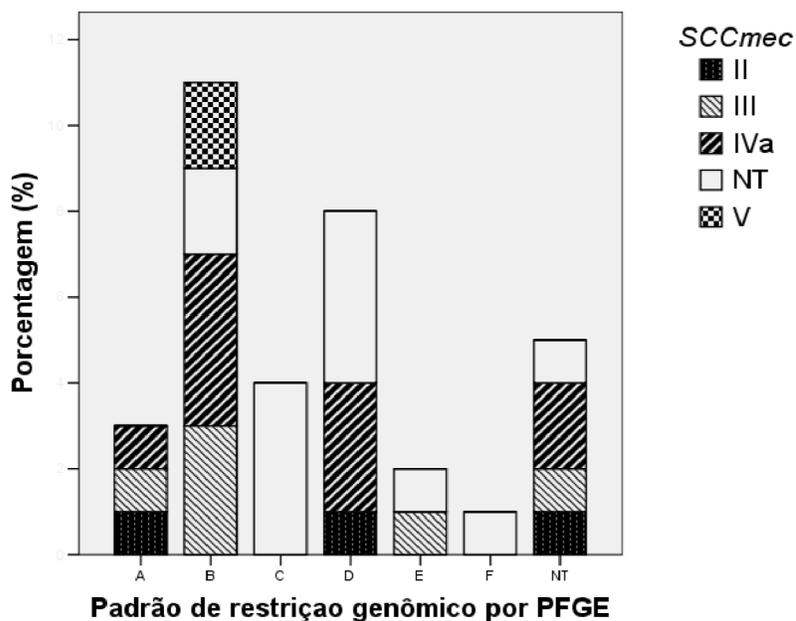
**Gráfico 3** - Distribuição dos cassetes *SCCmec* em relação aos perfis de restrição genômicos por PFGE dos isolados de *Staphylococcus aureus*.



Fonte: O Autor.

Nota: NT: não tipável.

**Gráfico 4** - Distribuição dos cassetes *SCCmec* em relação aos perfis de restrição genômicos por PFGE dos isolados de *Staphylococcus coagulase negativa* (CoNS).



Fonte: O Autor.

Nota: NT: não tipável.

### 5.3 *Staphylococcus* e resistência à vancomicina, linezolida e daptomicina

Dados relacionados à potência e os respectivos perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos considerados de última linha encontrados para os 36 isolados de *Staphylococcus aureus* e 34 de CoNS encontram-se nas Tabelas 12 e 13.

Foi observado que todos os isolados bacterianos foram susceptíveis à daptomicina (MIC  $\leq$  1  $\mu\text{g/mL}$ ), tendo este antimicrobiano apresentado elevada eficácia *in vitro* (CIM<sub>50</sub> = 0,5  $\mu\text{g/mL}$ ) para ambos os grupos. A linezolida apresentou a mesma eficácia para os dois grupos (CIM<sub>50</sub> = 2  $\mu\text{g/mL}$ ). Entretanto o percentual de resistência foi de 5,9% (2/34) entre os CoNS e de 2,8%(1/36) entre os *S. aureus*. Todas as amostras resistentes a linezolida foram isoladas de hemoculturas.

Em relação à vancomicina, nenhum isolado bacteriano foi resistente, a potência deste antimicrobiano também foi igual contra os dois grupos. Porém, 11,1% (4/36) dos isolados de *S.aureus* apresentaram susceptibilidade reduzida para este antimicrobiano, segundo critérios da CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (2018). Dois desses isolados foram oriundos de hemoculturas e os outros dois de secreção de ferida operatória.

**Tabela 12** - Perfil de sensibilidade à vacomicina, linezolida e daptomicina das 36 amostras clínicas de *Staphylococcus aureus* isoladas de pacientes hospitalizados entre janeiro de 2016 e fevereiro de 2017.

Antimicrobianos	<i>Staphylococcus aureus</i> (n = 36)					
	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ):			% por categoria		
	CIM <sub>50</sub>	CIM <sub>90</sub>	Variação	S	I	R
Vacomicina	2	4	$\leq$ 0,5 - 4	88,9	11,1	0
Linezolida	2	4	1 – 8	97,2	0	2,8
Daptomicina	0,5	0,5	-	100	0	0

**Fonte:** O Autor.

**Nota:** CIM – Concentração inibitória mínima; S-sensível; I-intermediário; R-resistente.

**Tabela 13** - Perfil de sensibilidade à vancomicina, linezolida e daptomicina das 34 amostras clínicas de *Staphylococcus* coagulase negativo (CoNS) isoladas de pacientes hospitalizados entre janeiro de 2016 e fevereiro de 2017.

Antimicrobianos	CoNS (n = 34)					
	CIM (µg/mL):			% por categoria		
	CIM <sub>50</sub>	CIM <sub>90</sub>	Variação	S	I	R
Vancomicina	2	4	1 - 4	100	0	0
Linezolida	2	4	1 - 4	94,1	0	5,9
Daptomicina	0,5	0,5	-	100	0	0

**Fonte:** O Autor.

**Nota:** CIM – Concentração inibitória mínima; S-sensível; I-intermediário; R-resistente.

A distribuição dos CIM's de vancomicina em relação ao perfil de resistência à oxacilina entre os isolados de *Staphylococcus aureus* e CoNS é exibida nas Tabelas 14 e 15. Observou-se que dos 27 isolados de *S. aureus* resistentes à oxacilina (MRSA), 96,3% (26/27) apresentaram CIM para a vancomicina  $\geq 1$  µg/mL, sendo 36,1% (13/27) apresentaram CIM = 2 µg/mL. Entre os MSSA, 55,6% (5/9) apresentaram CIM < 0,5 µg/mL. Em relação aos CoNS, todos os 34 isolados apresentaram CIM  $\geq 1$  µg/mL para a vancomicina. Entretanto, aproximadamente 53% dos isolados resistentes à oxacilina apresentaram CIM = 2 µg/mL para a vancomicina.

**Tabela 14** - Distribuição por número de amostras de *S.aureus* em relação ao CIM de vancomicina (µg/mL).

Amostras	n (%)				Total
	Vancomicina CIM (µg/mL)				
	$\leq 0,50$	1,0	2,0	4,0	
MRSA	01 (2,7)	09 (25)	13 (36,1)	04 (11,1)	27 (75)
MSSA	05 (13,8)	02 (5,4)	02 (5,4)	0 (0)	09 (25)
<b>Total</b>	<b>6 (16,5)</b>	<b>11 (30,9)</b>	<b>15 (41,6)</b>	<b>04 (11,1)</b>	<b>36 (100)</b>

**Fonte:** o autor.

**Nota:** MSS: *Staphylococcus* spp. sensíveis à metilicina/oxacilina. MRS: *Staphylococcus* spp. resistentes à metilicina/oxacilina.

**Tabela 15** - Distribuição por número de amostras de CoNS em relação ao CIM de vancomicina ( $\mu\text{g/mL}$ ).

Amostras	n (%)				Total
	Vancomicina CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )				
	$\leq 0,5$	1,0	2,0	4,0	
MSS	0 (0)	02 (5,8)	0 (0)	02 (5,8)	04 (11,7)
MRS	0 (0)	05 (14,7)	18 (52,9)	07 (20,6)	30 (88,3)
<b>Total</b>	<b>0 (0)</b>	<b>07 (20,6)</b>	<b>18 (52,9)</b>	<b>09 (26,4)</b>	<b>34 (100)</b>

**Fonte:** o autor.

**Nota:** MSS: *Staphylococcus* spp. sensíveis à metilicina/oxacilina. MRS: *Staphylococcus* spp. resistentes à metilicina/oxacilina.

Das três amostras de *Staphylococcus* spp. resistentes à linezolida (CIM  $\geq 8$   $\mu\text{g/mL}$ ), duas (2,8%, 2/70) foram CoNS resistentes à metilicina/oxacilina (MRS) e uma (1,4%, 1/70) foi de *S. aureus* oxacilina susceptível. Dos 47 isolados resistentes à oxacilina, 63,8% (30/47) apresentaram CIM para a linezolida de 2  $\mu\text{g/mL}$ . Quanto à daptomicina, todas as 70 amostras bacterianas apresentaram CIM igual a 0,5  $\mu\text{g/mL}$ .

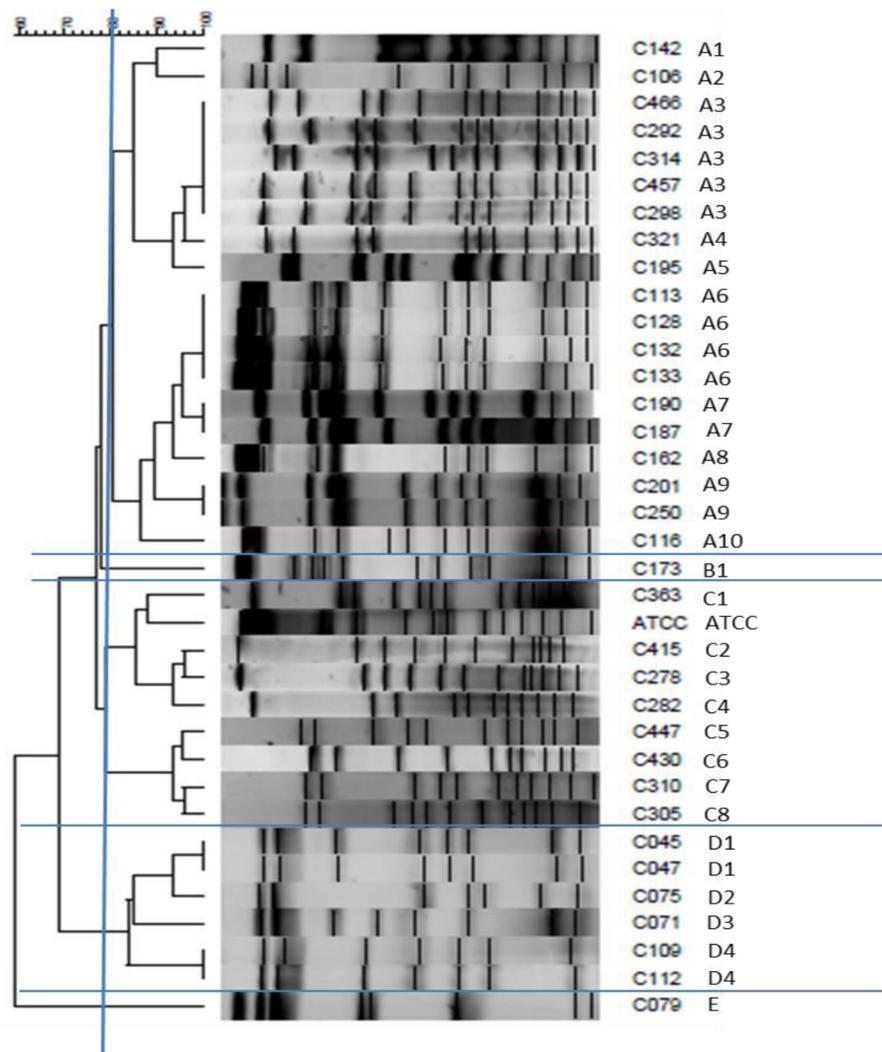
#### 5.4 Distribuição clonal dos isolados de *Staphylococcus* spp.

Do total de 36 isolados de *S. aureus*, um não pode ser tipado por PFGE devido a dificuldade com a lise e digestão do DNA. Um total de cinco grupos de similaridade (A-E) e 24 perfis foram observados (Figura 08). O grupo A apresentou um total de 19 isolados (52,8%, 19/36) distribuídos em nove subtipos, sendo o subtipo A3 (n= 05) o mais frequente. O grupo C foi o segundo maior, com cerca de 22,2% (n=08) dos isolados. O grupo D, terceiro maior, apresentou um total de 16,7% dos isolados (n=06) (Quadro 02). O critério aplicado para distinção dos clones foi o estabelecido por Tenover (1995). Segundo esse critério, isolados com similaridade igual ou superior a 80% são considerados geneticamente relacionados.

Em relação aos 34 isolados de CoNS, quatro não foram tipados por PFGE devido a dificuldade com a lise e digestão do DNA e o *Staphylococcus warneri* não foi incluído na tipagem devido a impossibilidade de estabelecer uma análise comparativa, uma vez que apenas um isolado dessa espécie foi identificado. A partir

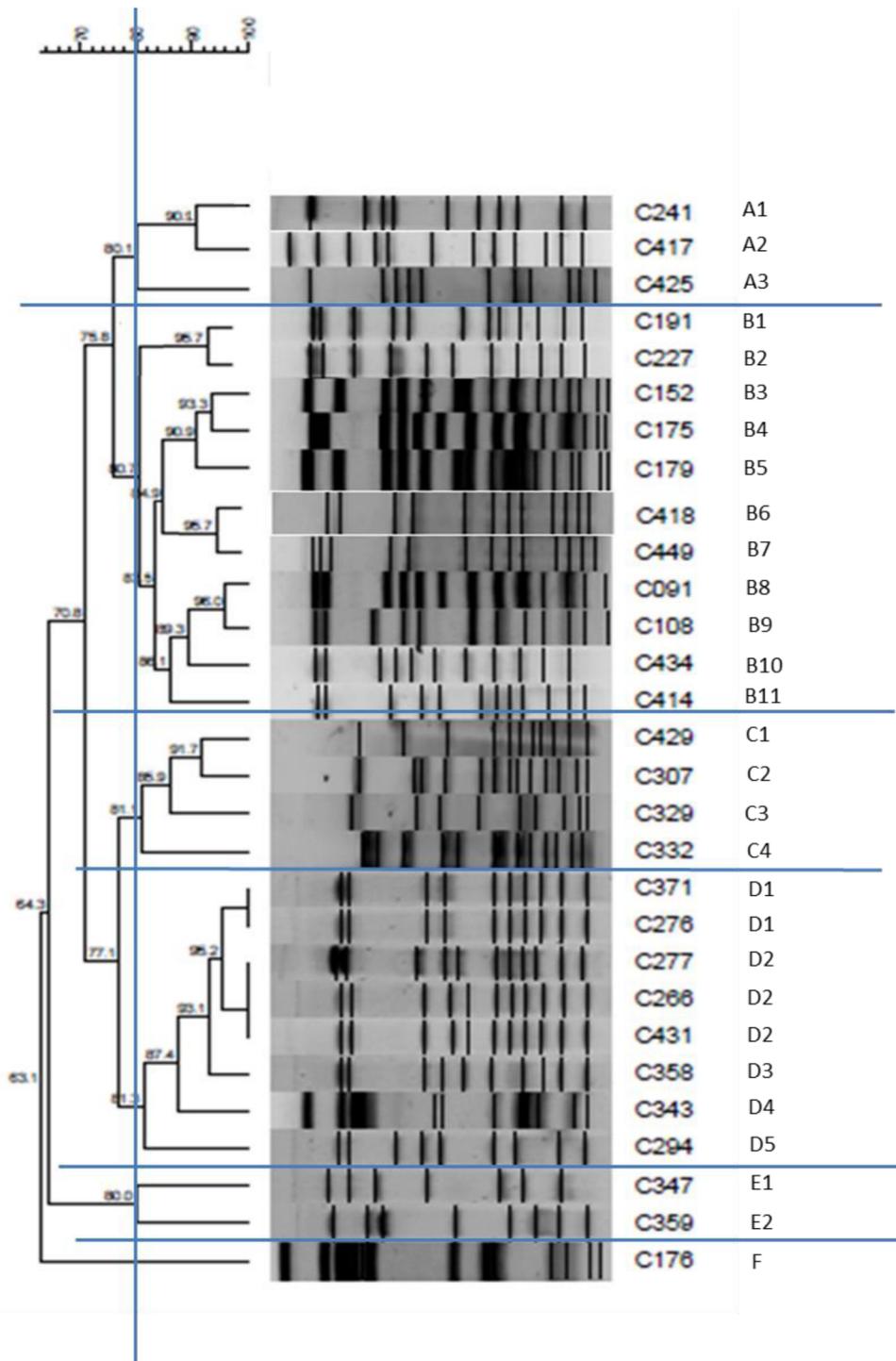
dos 29 isolados de *S. epidermidis* foram obtidos seis grupos de similaridade (A-F) e 26 perfis foram observados (Figura 08). O grupo B apresentou um total de 11 isolados (38%, 11/29) distribuídos em 11 subtipos. O grupo D foi o segundo maior, com 27,6% (8/29) dos isolados e o grupo C, terceiro maior, apresentou um total de 13,8% dos isolados (4/29) (Quadro 03).

**Figura 8** - Dendrograma gerado pela análise dos perfis de PFGE e respectivos subtipos dos isolados de *S. aureus* após digestão com *Sma*I (similaridade > 80%).



Fonte: O autor.

**Figura 9** - Dendrograma gerado pela análise dos perfis de PFGE e respectivos subtipos dos isolados CoNS (*S. epidermidis*) após digestão com *Sma*I (similaridade > 80%).



Fonte: O autor.

**Quadro 02** - Perfis clonais, sítios de coleta, data da coleta, tipagem por SCCmec e avaliação da presença do *mecA* em isolados de *Staphylococcus aureus* oriundos de amostras clínicas de hospital terciário do Recife/PE.

PACIENTES	PFGE	SUBTIPO	SÍTIO DE COLETA	SERVIÇO	SCCmec	<i>mecA</i>	data da coleta
P17	A	A1	Fragmento de osso	Não UTI	NT	-	23.05.16
P09	A	A2	Líquido cavitário	UTI	NT	-	03.04.16
P42	A	A3	Hemocultura	Não UTI	NT	+	21.11.16
P65	A	A3	Hemocultura	Não UTI	NT	-	22.02.17
P38	A	A3	Hemocultura	Não UTI	II	+	10.11.16
P37	A	A3	Líquido pleural	Não UTI	NT	+	08.11.16
P64	A	A3	Abscesso	Não UTI	NT	-	17.02.17
P44	A	A4	Hemocultura	Não UTI	NT	-	27.11.16
P28	A	A5	Hemocultura	Não UTI	II	+	19.09.16
P16	A	A6	Hemocultura	Não UTI	NT	+	02.05.16
P14	A	A6	Ferida operatória	Não UTI	NT	+	20.04.16
P15	A	A6	Hemocultura	Não UTI	IVc	-	24.04.16
P13	A	A6	Ferida operatória	Não UTI	II	+	08.04.16
P27	A	A7	Hemocultura	Não UTI	NT	+	13.09.16
P24	A	A7	Hemocultura	Não UTI	III	+	31.08.16
P19	A	A8	Ponta de cateter	Não UTI	II	+	17.06.16
P29	A	A9	Hemocultura	Não UTI	NT	-	26.09.16
P19	A	A9	Hemocultura	Não UTI	II	+	24.10.16
P11	A	A10	Hemocultura	Não UTI	NT	+	06.04.16
P20	B	B1	Hemocultura	Não UTI	III	+	05.07.16
P52	C	C1	Hemocultura	Não UTI	NT	-	23.12.16
P56	C	C2	Hemocultura	Não UTI	NT	-	31.01.17
P34	C	C3	Hemocultura	Não UTI	IVa	+	03.11.16
P13	C	C4	Ponta de cateter	Não UTI	II	+	07.11.16
P55	C	C5	Hemocultura	Não UTI	NT	-	22.02.17
P62	C	C6	Hemocultura	Não UTI	NT	-	12.02.17
P43	C	C7	Ponta de cateter	Não UTI	IVa	+	23.11.16
P45	C	C8	Hemocultura	Não UTI	II	+	29.11.16
P01	D	D1	Hemocultura	Não UTI	III	+	06.01.16
P02	D	D1	Hemocultura	Não UTI	II	+	01.03.16
P05	D	D2	Ferida operatória	Não UTI	V	+	15.03.16
P03	D	D3	Hemocultura	Não UTI	NT	-	07.03.16
P12	D	D4	Ferida operatória	Não UTI	II	+	07.04.16
P08	D	D4	Hemocultura	Não UTI	II	+	31.03.16
P04	E	E	Hemocultura	Não UTI	IVa	+	09.03.16
P41	NT	NT	Hemocultura	Não UTI	NT	-	19.11.16

**Fonte:** O autor.

**Quadro 03** - Perfis clonais, sítios de coleta, data da coleta, tipagem por *SCCmec* e avaliação da presença do *mecA* em isolados de *Staphylococcus coagulase negativa* oriundos de amostras clínicas de hospital terciário do Recife/PE.

PACIENTE	PFGE	SUBTIPO	SÍTIO DE COLETA	SERVIÇO	SCCmec	mecA	Data da coleta
P31	A	A1	Hemocultura	NÃO UTI	III	+	11.10.16
P57	A	A2	Líquido ascítico	NÃO UTI	II	-	01.02.17
P60	A	A3	Hemocultura	NÃO UTI	IVa	+	09.02.17
P25	B	B1	Hemocultura	NÃO UTI	IVa	+	06.09.16
P45	B	B10	Hemocultura	NÃO UTI	III	+	07.02.17
P54	B	B11	Hemocultura	NÃO UTI	IVa	+	24.01.17
P30	B	B2	Hemocultura	NÃO UTI	IVa	+	03.10.16
P18	B	B3	Hemocultura	UTI	V	+	06.06.16
P22	B	B4	Hemocultura	NÃO UTI	NT	+	09.08.16
P23	B	B5	Líquido peritoneal	NÃO UTI	V	+	26.08.16
P58	B	B6	Hemocultura	NÃO UTI	III	+	03.02.17
P63	B	B7	Hemocultura	NÃO UTI	NT	-	16.02.17
P06	B	B8	Líquido peritoneal	NÃO UTI	III	+	17.03.16
P10	B	B9	Líquido peritoneal	NÃO UTI	IVa	+	05.04.16
P61	C	C1	Hemocultura	NÃO UTI	NT	+	09.02.17
P40	C	C2	Hemocultura	UTI	NT	+	18.11.16
P37	C	C3	Swab retal	UTI	NT	-	08.11.16
P46	C	C4	Swab nasal	UTI	NT	+	01.12.16
P35	D	D1	Swab nasal	NÃO UTI	IVa	+	03.11.16
P53	D	D1	Hemocultura	NÃO UTI	IVa	+	30.12.16
P33	D	D2	Hemocultura	NÃO UTI	IVa	+	31.10.16
P36	D	D2	Hemocultura	UTI	II	+	06.11.16
P59	D	D2	Hemocultura	NÃO UTI	NT	+	03.02.17
P47	D	D3	Hemocultura	UTI	NT	-	05.12.16
P50	D	D4	Hemocultura	UTI	NT	+	14.12.16
P39	D	D5	Hemocultura	UTI	NT	+	11.11.16
P49	E	E1	Hemocultura	UTI	III	-	13.12.16
P51	E	E2	Hemocultura	NÃO UTI	NT	-	16.12.16
P21	F	F	Hemocultura	UTI	NT	+	08.08.16
P07	NT	NT	Hemocultura	NÃO UTI	IVa	+	19.03.16
P32	NT	NT	Swab nasal	NÃO UTI	III	+	21.10.16
P48	NT	NT	Ponta de cateter	NÃO UTI	IVa	+	09.12.16
P55	NT	NT	Hemocultura	NÃO UTI	II	+	30.01.17

Fonte: O autor.

## 6 DISCUSSÃO

O *Staphylococcus* spp. são importantes patógenos responsáveis por infecções na comunidade e no ambiente hospitalar (LAHAM et al., 2015). A epidemiologia global mostrou rápida evolução nos últimos anos, destacando cada vez mais os graves problemas de saúde pública gerados por causa das infecções causadas por esses microrganismos, refletindo diretamente no aumento da mortalidade e na necessidade de usar antibióticos de último recurso (CHESSA et al., 2015). Particularmente, nesse contexto, destacam-se os *Staphylococcus aureus* e os CoNS. Dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2016) destacam os CoNS e *S. aureus* como os patógenos mais frequentes no ambiente hospitalar, sendo responsáveis por 32% das notificações de IRAS em todo o Brasil.

Convencionalmente, o processo de identificação laboratorial desses microrganismos é conduzido com base nas características bioquímicas e perfil metabólico dos isolados. Essas metodologias convencionais requerem de 24 – 48h para a identificação dos isolados. Enquanto isso, pacientes são tratados com antibióticoterapia empírica que, algumas vezes são inapropriadas. O diagnóstico microbiológico laboratorial requer rapidez, confiança e baixo custo para a identificação de patógenos em amostras clínicas para que o antibiótico correto seja prescrito o mais rápido possível. Muitos estudos, tem mostrado que o MALDI TOF MS tem mostrado eficácia superior aos métodos convencionais em termos de velocidade e acurácia no diagnóstico de infecções de corrente sanguínea e trato urinário, inclusive na determinação o perfil de susceptibilidade (SINGHAL et al., 2015; MORENO et al., 2018). O diagnóstico precoce é fundamental para a redução da mortalidade por IRAS. Estudos conduzidos por Bischoff e colaboradores (2018) tem demonstrado que os índices de mortalidade em ICS podem chegar a 40% quando o antibiótico correto não é prescrito nas primeiras 6 horas após o aparecimento dos sintomas de sepse. Nesse contexto, a utilização do MALDI TOF MS como método para a caracterização de espécie confirmou a identidade de todos os isolados, indicando uma diferenciação confiável entre *S.aureus* e CoNS. Foi aplicado o critério recomendado pelo software