

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

ANDREI NICOLI GEBIELUCA DABUL

**Estudo epidemiológico molecular de *Staphylococcus aureus* resistentes à
meticilina (MRSA) isolados no Brasil e estudo da proteína reguladora de resposta
GraR**

São Carlos

2014

ANDREI NICOLI GEBIELUCA DABUL

**Estudo epidemiológico molecular de *Staphylococcus aureus* resistentes à
meticilina (MRSA) isolados no Brasil e estudo da proteína reguladora de resposta
GraR**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Física Aplicada
Opção: Física Biomolecular

Orientadora: Profa. Dra. Ilana Lopes Baratella da Cunha Camargo

Co-orientador: Prof. Dr. Glaucius Oliva

Versão corrigida

(Versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos

2014

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca e Informação do IFSC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Gebieluca Dabul, Andrei Nicoli
Estudo epidemiológico molecular de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilicina (MRSA) isolados no Brasil e estudo da proteína reguladora de resposta GraR / Andrei Nicoli Gebieluca Dabul; orientadora Ilana Lopes Baratella da Cunha Camargo; co-orientador Glaucius Oliva - versão corrigida -- São Carlos, 2014.
134 p.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2014.

1. *Staphylococcus*. 2. Epidemiologia. 3. Genômica.
4. Proteínas recombinantes. 5. Microbiologia médica.
I. Lopes Baratella da Cunha Camargo, Ilana, orient.
II. Oliva, Glaucius, co-orient. III. Título.

*Aos meus pais,
por terem me apoiado incondicionalmente
para que eu chegasse até aqui.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Marilda e Abilio por terem me incentivado a trilhar este caminho desde cedo, e por me apoiarem em todas as decisões que me trouxeram até aqui.

Ao meu irmão Audrei por ser meu exemplo de cientista e ter despertado meu interesse pela pesquisa me introduzindo ao universo acadêmico.

Ao Denis, meu amor, por ter me acalmado quando necessário, por ter me acompanhado ao laboratório nas noites em que precisei, por ter aberto mão de sua programação de fim de semana pra ficar em casa enquanto eu escrevia, escrevia, escrevia...

À minha orientadora Professora Dra. Ilana Camargo, por todo o conhecimento compartilhado, por ter encarado o desafio de orientar seu primeiro doutorado antes mesmo de um mestrado, pelas oportunidades de crescimento profissional que me proporcionou.

À amiga Francieli Colussi por desde o início, na faculdade, ter participado de minha vida acadêmica e pessoal, com seu bom-humor e apoio em todos os momentos.

À amiga e companheira de laboratório Vanessa Arnoldi, por ter me apresentado à meu futuro marido.

À amiga e companheira de laboratório Mariana (pupila) por ser a aprendiz exemplar, por ter me auxiliado nas purificações intermináveis e pelos bons momentos vividos.

Às colegas de laboratório Simoni, Raissa, Jéssicas, Thaís e Fernanda, pelo auxílio nos experimentos e pela companhia, seja no bandeirão, seja na escada para o lanche da tarde.

À Professora Dra. Ana Lúcia da Costa Darini por ter aberto seu laboratório proporcionando que os experimentos de Epidemiologia Molecular se iniciassem quando nós não tínhamos um laboratório próprio, e à técnica Joseane Ferreira por ter me auxiliado nesses experimentos.

Ao Hyllo Baeta Marcello Júnior (Laboratório Geraldo Lustosa), Dra. Edna Leite e Hoberdan Oliveira (ambos da CCIH do Hospital Risoleta Tolentino Neves) por fornecerem as amostras de MRSA para este estudo.

Ao Professor Dr. Michael S. Gilmore e ao pessoal do seu laboratório na Harvard Medical School, especialmente Dra. Veronica N. Kos pela oportunidade de estágio e ensinamentos nesse período.

À Simela Giannakopoulos por ter me abrigado em sua casa durante a estadia em Boston.

À Professora Dra. Josiane Padilha, por ter me orientado durante a iniciação científica e me encorajado a continuar nessa jornada.

Ao Professor Dr. Jorge Iulek por ter me apresentado o IFSC.

Ao Fernando por ter me auxiliado com as proteínas.

Aos técnicos do Grupo de Cristalografia Susana e Simone, do Grupo de Biotecnologia Molecular Maria, Kelven, Sandra e Elizandra e do Grupo de Biofísica Andressa e Patrícia por sempre estarem dispostos a ajudar.

Ao pessoal da secretaria, Fernando e Luciana, e do Serviço de Pós-Graduação, Sílvia, Ricardo e Patrícia.

Às funcionárias da biblioteca do IFSC.

À Capes, à FAPESP e à Novartis Biociências S.A. pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos que contribuíram para que esse projeto se realizasse, meu sincero muito obrigada!

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos.”

Isaac Newton

RESUMO

DABUL, A. N. G. **Estudo epidemiológico molecular de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) isolados no Brasil e estudo da proteína reguladora de resposta GraR**. 2013. 134 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

S. aureus é um patógeno que sempre surpreende equipes médicas quanto à sua capacidade de resistir em curto espaço de tempo às mais novas drogas lançadas no mercado. Algumas alterações genéticas que poderiam causar a emergência de VISA foram previamente identificadas, dentre elas uma mutação no sistema de dois componentes GraRS. As proteínas GraR e GraR*, esta última com a mutação que levaria ao fenótipo de VISA, foram estudadas com o intuito de resolver a estrutura tridimensional de ambas e determinar seu papel no processo de resistência à vancomicina. Ensaios de clonagem, expressão, purificação das proteínas e dicroísmo circular foram realizados, porém não houve sucesso na cristalização. No estudo epidemiológico, PFGE dividiu os 36 isolados de MRSA (25 de infecção e 11 de colonização) de um hospital mineiro em 8 pulsotipos. Análise do MLST e SCCmec do pulsotipo A (58,3% das amostras) mostrou que os isolados pertenciam ao CC5 (ST5 e ST105) e continham SCCmecII. Todos os 3 isolados ST239 continham SCCmecIII, sendo relacionados ao BEC. A maioria dos isolados ST5 continha SCCmecII como o Clone NY/J. Observou-se 24% de resistência à tigeciclina nos isolados de sítios de infecção. Dois isolados foram sensíveis à daptomicina depois de 24 horas de incubação mas resistentes após 48 horas. Os resistentes à tigeciclina eram todos ST105-SCCmecII, e de 5 pacientes diferentes. Os resistentes à daptomicina eram ST5-SCCmecII, de pacientes diferentes, e apresentaram algumas mutações no gene *rpoB*. Uma mudança na linhagem prevalente nos hospitais brasileiros tem sido reportada e, de fato, BEC não era prevalente neste hospital em 2009. ST5-SCCmecII e ST105-SCCmecII foram prevalentes, e ainda o último apresenta o agravante da resistência à tigeciclina quando esta droga ainda não era utilizada no hospital. Não houve disseminação de apenas um pulsotipo, sugerindo que essas linhagens sejam endêmicas ao hospital. O conhecimento do perfil das linhagens locais auxilia na adequação do tratamento empírico dado aos pacientes, além de demonstrar que é preciso ter cuidado ao se administrar novas drogas indiscriminadamente para evitar seleção de clones mais resistentes.

Palavras-chave: *Staphylococcus*. Epidemiologia. Genômica. Proteínas recombinantes. Microbiologia médica.

ABSTRACT

DABUL, A. N. G. **Molecular epidemiological study of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated in Brazil and study of the response regulator protein GraR.** 2013. 134 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

S. aureus is a pathogen that always surprises the medical staff regarding its capability to resist to the newest drugs marketed, in a short period of time. Some genetic changes which might cause the emergence of VISA were previously identified, among them a mutation on the two-component system GraRS. The proteins GraR and GraR*, the last one with the mutation that would lead to the VISA phenotype, were studied aiming to solve the tridimensional structure of both and determine their role on the process of vancomycin resistance. Cloning, expression, protein purification and circular dichroism experiments were performed, however, the crystallization was not successful. In the epidemiological study PFGE distributed the 36 isolates (25 from infection sites and 11 from colonization) from a hospital in Minas Gerais in 8 pulsotypes. Analysis of MLST and SCC*mec* of pulsotype A (58.3% of all samples) showed that the isolates belonged to CC5 (ST5 and ST105) and harbored SCC*mec*II. All three ST239 harbored SCC*mec*III, being related to Brazilian Endemic Clone (BEC). Most ST5 isolates harbored SCC*mec*II as the NY/J clone. It was observed 24% of resistance to tigecycline on the infection sites isolates. On microdilution, 2 isolates were susceptible to daptomycin after 24 hours of incubation, but resistant after 48 hours. Tigecycline-resistants were all ST105-SCC*mec*II and were isolated from 5 different patients. Daptomycin-resistants were ST5-SCC*mec*II, from different patients, and they presented some mutations on the gene *rpoB*. A change in the prevalent lineage of the Brazilian hospitals has been reported and, in fact, the clone BEC was not prevalent in this hospital in 2009. ST5-SCC*mec*II and ST105-SCC*mec*II were prevalent, and also, the last one presents the aggravating factor of tigecycline resistance when this drug was not used in the hospital. However, there was no dissemination of only one pulsotype, suggesting these lineages to be endemic to the hospital. Knowledge of the profile of the local lineages helps on the adequation of empiric treatment given to the patients, besides demonstrating that care is needed on administering new drugs indiscriminately to avoid selection of the more resistant clones.

Keywords: *Staphylococcus*. Epidemiology. Genomics. Recombinant proteins. Medical microbiology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Linha do tempo da resistência aos antimicrobianos em MRSA.....	27
Figura 2 –	Mecanismo de ação dos β -lactâmicos.....	28
Figura 3 –	Exemplo da organização de um elemento SCCmec.....	29
Figura 4 –	Estrutura química da daptomicina.....	32
Figura 5 –	Estrutura química da tigeciclina.....	32
Figura 6 –	Mecanismo de ação de um sistema de dois componentes.....	34
Figura 7 –	Sequências primárias das proteínas GraR e sua mutante GraR*, destacando o aminoácido alterado com a mutação.....	34
Figura 8 –	Mapa do vetor pSMT3.....	43
Figura 9 –	Gel de poliacrilamida 15% corado com azul de Comassie referente à purificação por afinidade da proteína GraR.....	69
Figura 10 –	Gel de poliacrilamida 15% corado com azul de Comassie referente à purificação por afinidade da proteína GraR*.....	70
Figura 11 –	Espectros de Dicroísmo Celular da proteína GraR em temperaturas de 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 e 90 °C.....	71
Figura 12 –	Espectros de Dicroísmo Celular da proteína GraR* em temperaturas de 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 e 90 °C.....	71
Figura 13 –	Espectros de Dicroísmo Celular das proteínas GraR e GraR* à 20 °C.....	72
Figura 14 –	Cristais de GraR na condição de cristalização inicial.....	73
Figura 15 –	Cristais de GraR na após otimização da condição de cristalização.....	73
Figura 16 –	Padrão de difração de um cristal de GraR otimizado.....	74
Figura 17 –	Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo para verificação da digestão dos insertos e do vetor de expressão.....	75
Figura 18 –	Cromatograma da primeira purificação por afinidade da proteína GraR.....	76
Figura 19 –	Gel de poliacrilamida 15% corado com azul de Comassie referente à primeira purificação por afinidade da proteína GraR.....	76
Figura 20 –	Cromatograma da primeira purificação por afinidade da proteína GraR*.....	77

Figura 21 –	Gel de poliacrilamida 15% corado com azul de Comassie referente à primeira purificação por afinidade da proteína GraR*.....	77
Figura 22 –	Cromatograma da segunda purificação por afinidade da proteína GraR, após clivagem da proteína de fusão.....	78
Figura 23 –	Cromatograma da segunda purificação por afinidade da proteína GraR*, após clivagem da proteína de fusão.....	79
Figura 24 –	Gel de poliacrilamida 15% corado com azul de Comassie referente à segunda purificação por afinidade das proteínas GraR e GraR*.....	79
Figura 25 –	Cromatograma da purificação por exclusão de tamanho de GraR.....	80
Figura 26 –	Cromatograma da purificação por exclusão de tamanho de GraR*.....	80
Figura 27 –	Gel de poliacrilamida 15% corado com azul de Comassie referente à purificação por exclusão de tamanho das proteínas GraR e GraR*.....	81
Figura 28 –	Espectros de Dicroísmo Celular da proteína GraR nas temperaturas de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 e 90 °C.....	82
Figura 29 –	Espectros de Dicroísmo Celular da proteína GraR* nas temperaturas de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 e 90 °C.....	83
Figura 30 –	Etest® Daptomicina da amostra SA20 mostrando a dupla elipse de inibição	89
Figura 31 –	Etest® Daptomicina da amostra SA11 mostrando microcolônias dentro da elipse de inibição.....	89
Figura 32 –	Análise de população para daptomicina dos isolados de <i>S. aureus</i> SA07, SA11, SA20, SA47, SA48 e SA53 e das amostras controle de <i>S. aureus</i> N315, Mu3 e Mu50.....	89
Figura 33 –	Etest® Vancomicina da amostra SA16 mostrando a presença de microcolônias até a concentração de 3 mg/L da droga.....	92
Figura 34 –	Diluição em Ágar.....	92
Figura 35 –	Análise de população para vancomicina dos isolados de <i>S. aureus</i> SA42 e SA43 e das amostras controle de <i>S. aureus</i> N315, Mu3 e Mu50.....	94
Figura 36 –	Gel de agarose 1% mostrando produto da amplificação do gene <i>mecA</i> equivalente a 286 pb de alguns isolados.....	95
Figura 37 –	Dendrograma dos padrões de PFGE e informações dos isolados.....	98
Figura 38 –	Representação gráfica produzida com o programa eBURST v3 na base de dados de <i>S. aureus</i>	99

Figura 39 – Representação da relação entre os STs encontrados nesse estudo (ST5, ST105, ST97 e ST239).....	100
--	-----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	“Primers” para amplificação dos genes <i>graR</i> e <i>graR*</i> com sítios para enzimas BamHI e XhoI.....	46
Tabela 2 –	Dados provenientes do Laboratório Geraldo Lustosa referente aos isolados em estudo.....	57
Tabela 3 –	“Primers” utilizados para sequenciamento de genes envolvidos na resistência à vancomicina e à daptomicina.....	65
Tabela 4 –	Composição em estruturas secundárias para GraR e GraR* à 25 e à 90 °C, segundo o programa K2D.....	83
Tabela 5 –	Antimicrobianos testados, classe à que pertencem e local de ação.....	87
Tabela 6 –	Valores de referência para os antimicrobianos testados, em mg/L.....	87
Tabela 7 –	CIM segundo o método das fitas de Etest® (mg/L).....	91
Tabela 8 –	CIM para vancomicina, tigeciclina e daptomicina (mg/L).....	93
Tabela 9 –	Visualização geral da sensibilidade das amostras aos antimicrobianos testados.....	94
Tabela 10 –	Perfil Alélico e Tipo de Sequência (ST) das amostras provenientes de sítios de infecção.....	96
Tabela 11 –	Perfil Alélico e Tipo de Sequência (ST) das amostras provenientes de colonização.....	97
Tabela 12 –	Mutações encontradas no gene <i>graR</i> dos isolados que tiveram o mesmo sequenciado.....	101
Tabela 13 –	Mutações encontradas no gene <i>vraR</i> dos isolados que tiveram o mesmo sequenciado.....	102
Tabela 14 –	Mutações encontradas no gene <i>graS</i> dos isolados que tiveram o mesmo sequenciado.....	102
Tabela 15 –	Mutações encontradas no gene <i>vraS</i> dos isolados que tiveram o mesmo sequenciado.....	103
Tabela 16 –	Mutações encontradas no gene <i>mprF</i> dos isolados que tiveram o mesmo sequenciado.....	104
Tabela 17 –	Mutações encontradas no gene <i>rpoB</i> dos isolados que tiveram o mesmo sequenciado.....	104

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2xYT	2x Yeast extract and Tryptone
AMH	Ágar Müeller-Hinton
BEC	Brazilian Endemic Clone
BHI	Brain-Heart Infusion
CA-MRSA	Community associated methicilin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
CAMP	Cationic Antimicrobial Peptides
CC	Complexo Clonal
CCIH	Comissão de Controle de Infecção Hospitalar
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIM ₅₀	Concentração Inibitória Mínima para 50% das amostras
CIM ₉₀	Concentração Inibitória Mínima para 90% das amostras
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMH	Caldo Müeller-Hinton
dNTPs	Deoxynucleotide Triphosphate
DO ₆₀₀	Densidade Ótica em 600 nm
EUA	Estados Unidos da América
EUCAST	European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases
FDA	Food and Drug Administration
h-DRSA	Heterogeneous daptomycin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
h-VISA	Heterogeneous vancomycin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
HA-MRSA	Hospital acquired methicilin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
IFSC	Instituto de Física de São Carlos
LB	Luria-Bertani
MATE	Multi Antimicrobial Extrusion Protein
MG	Minas Gerais
MLST	Multilocus Sequence Type
MRSA	Methicilin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
pb	Pares de base
PBP	Penicillin Binding Protein
PBP2a	Penicillin Binding Protein 2a
PCR	Polymerase Chain Reaction

PFGE	Pulsed Filed Gel Electrophoresis
PVL	Panton-Valentine Leukocydin
q.s.p.	Quantidade suficiente para
RND	Resistance-Nodulation-Division
SCC $_{mec}$	Staphylococcal Cassette Chromosome <i>mec</i>
SLV	Single Locus Variant
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
ST	Sequence Type
U	Unidade
UFC	Unidade Formadora de Colônia
USP	Universidade de São Paulo
VISA	Vancomycin-intermediate <i>Staphylococcus aureus</i>
VRSA	Vancomycin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>

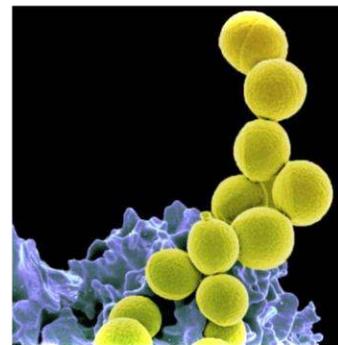
SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	27
1.1	<i>Staphylococcus aureus</i> RESISTENTES À METICILINA.....	27
1.2	EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR E MRSA	30
1.3	TRATAMENTO DAS INFECÇÕES CAUSADAS POR MRSA	31
1.4	<i>S. aureus</i> E GraR	32
2	OBJETIVOS	39
3	MATERIAIS E MÉTODOS	43
3.1	CONSTRUÇÕES <i>graR</i> ou <i>graR*</i> UTILIZANDO O VETOR pET28a.....	43
3.1.1	Ensaio de Dicroísmo Circular de GraR e GraR*	44
3.1.2	Ensaio de Cristalização de GraR e GraR*	45
3.2	CONSTRUÇÕES <i>graR</i> e <i>graR*</i> UTILIZANDO O VETOR pSMT3	45
3.2.1	Amplificação dos genes <i>graR</i> e <i>graR*</i>	46
3.2.2	Ligação em vetor de clonagem pGEM e transformação em <i>E. coli</i> DH5-α	47
3.2.3	Digestão do vetor pSMT3 e dos insertos <i>graR</i> e <i>graR*</i>	47
3.2.4	Ligação no vetor de expressão pSMT3 e transformação em <i>E. coli</i> DH5-α	48
3.2.5	Transformação em célula de expressão <i>E. coli</i> RosettaTM (DE3)	49
3.2.6	Expressão de pSMT3-<i>graR</i> e pSMT3-<i>graR*</i> em <i>E. coli</i> RosettaTM (DE3) e purificação das proteínas GraR e GraR*	49
3.2.7	Ensaio de Cristalização de GraR e GraR*	50
3.2.8	Ensaio de Dicroísmo Circular de GraR e GraR*	50
4	MATERIAIS E MÉTODOS	55
4.1	AMOSTRAS.....	55
4.2	EXTRAÇÃO DE DNA DOS ISOLADOS	55
4.3	TESTES DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS	56
4.3.1	Difusão em ágar	58
4.3.2	Microdiluição	58
4.3.3	Diluição em Ágar	59
4.3.4	Triagem para h-VISA	59
4.3.5	Análise de População	60
4.4	DETECÇÃO DA PRESENÇA DO GENE <i>mecA</i>	60

4.5	TIPAGEM MOLECULAR	61
4.5.1	“Multilocus Sequence Typing” (MLST)	61
4.5.2	Eletoforese em Campo Pulsado.....	62
4.5.3	Tipagem do elemento <i>SCCmec</i>	62
4.6	PESQUISA POR GENES QUE EXPRESSAM LEUCOCIDINA DE PANTON- VALENTINE	63
4.7	SEQUENCIAMENTO DE GENES RELACIONADOS À RESISTÊNCIA À VANCOMICINA E À DAPTOMICINA EM MRSA	64
4.8	SEQUENCIAMENTO DO GENOMA DE <i>S. aureus</i> SA16	65
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
5.1	CONSTRUÇÕES pET28a	69
5.1.1	Expressão e Purificação	69
5.1.2	Dicroísmo Circular	70
5.1.3	Ensaio de Cristalização	72
5.2	CONSTRUÇÕES pSMT3.....	74
5.2.1	Clonagem, expressão e purificação.....	74
5.2.2	Ensaio de Cristalização	81
5.2.3	Dicroísmo Circular	82
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	87
6.1	TESTES DE SENSIBILIDADE	87
6.2	DETECÇÃO DA PRESENÇA DO GENE <i>mecA</i>	94
6.3	TIPAGEM MOLECULAR	95
6.3.1	Fusão dos principais Complexos Clonais de <i>S. aureus</i>	99
6.3.2	Sequenciamento de genes relacionados à resistência à daptomicina e à vancomicina em MRSA	101
6.4	SEQUENCIAMENTO DO GENOMA DE <i>S. aureus</i> SA16	104
7	CONCLUSÃO	109
	REFERÊNCIAS	111
	ANEXOS	125

CAPÍTULO 1

Introdução



1 INTRODUÇÃO

1.1 *Staphylococcus aureus* RESISTENTES À METICILINA

Staphylococcus aureus são cocos gram-positivos, anaeróbios facultativos, membros da família Staphylococcaceae, e estão entre os mais importantes patógenos nosocomiais há mais de um século.¹ Resistência aos antimicrobianos também vem sendo reportada há muito tempo, desde 1945, com o primeiro caso de resistência à penicilina.² Logo após o surgimento da meticilina na década de 1960 - uma tentativa de controle das infecções por organismos resistentes à penicilina - as primeiras linhagens resistentes a este novo antimicrobiano β -lactâmico já foram descritas, primeiramente na Europa³ e mais tarde no mundo todo, dando origem ao termo *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA, do inglês “methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*”), que até hoje causam um grande número de mortes nos hospitais ao redor do mundo (Figura 1).

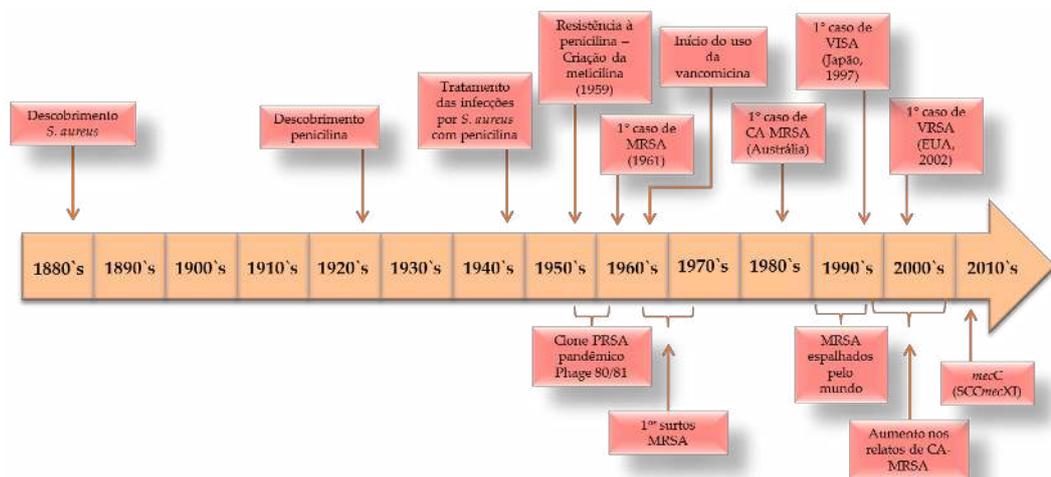


Figura 1 – Linha do tempo da resistência aos antimicrobianos em MRSA.
Fonte: Elaborada pela autora.

O mecanismo de ação de um antimicrobiano β -lactâmico (Figura 2) se dá com a ligação à Proteína Ligadora de Penicilina, ou PBP (do inglês, “Penicillin Binding Protein”). Ela é responsável por diversas reações envolvidas na síntese da parede celular bacteriana,

sendo uma D-alanina carboxipeptidase, uma peptidoglicano transpeptidase e uma peptidoglicano endopeptidase. Ao interagir com essa enzima, o β -lactâmico impede a correta formação da parede celular, deixando a célula bacteriana frágil.⁴

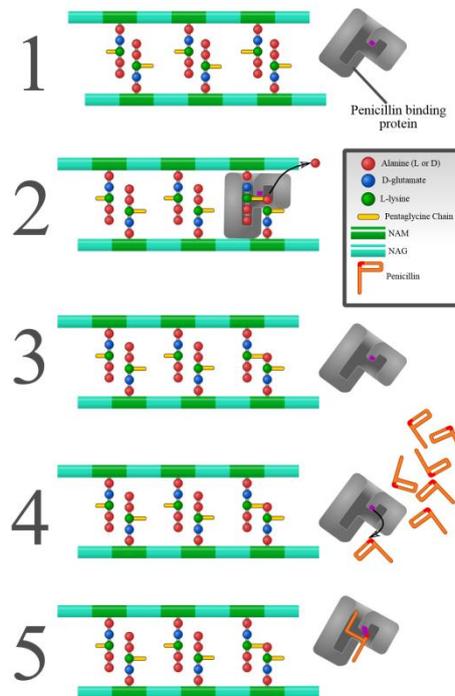


Figura 2 – Mecanismo de ação dos β -lactâmicos. Fonte: Wikimedia Commons.⁵

O primeiro mecanismo de resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos a ser descrito foi o devido à presença de β -lactamases, uma classe de enzimas capazes de hidrolisar o anel β -lactâmico e tornar esses antimicrobianos incapazes de inibir a síntese da parede celular bacteriana. Já a resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos como a meticilina, que são resistentes à β -lactamases, se dá devido à presença do elemento genético móvel *SCCmec* (do inglês “Staphylococcal cassette chromosome *mec*”) no DNA cromossômico do micro-organismo, que tem como parte integrante o gene *mecA*, responsável pela codificação da PBP2a. A PBP2a tem baixa afinidade aos β -lactâmicos, o que possibilita a construção da parede celular bacteriana de maneira íntegra, e a célula torna-se assim resistente.⁶

O elemento *SCCmec* integra-se em uma região específica do cromossomo de *S. aureus*, a extremidade 3’ do gene *orfX*, que até pouco tempo era de função desconhecida, mas hoje é sabido tratar-se de um gene que codifica uma metiltransferase ribossomal.⁷⁻⁸

Capítulo 1 - Introdução

Existem 11 tipos de elementos *SCCmec* descritos até hoje, e alguns além de carregarem o gene *mecA* e recombinases que promovem sua mobilidade através de linhagens, carregam genes de resistência à outras classes de antimicrobianos (Figura 3).⁹ Assim, os MRSA hoje não são apenas resistentes aos β -lactâmicos, mas sim multirresistentes, agravando a situação.

Em 2011 foi identificado um gene *mecA* com sequência diferente das variações até então descritas. Esse gene foi denominado *mecC*, e faz parte do tipo de *SCCmec* XI, até hoje reportado apenas na Europa. Os isolados contendo esse novo gene geralmente apresentam baixos níveis de resistência à oxacilina e cefoxitina.⁷⁻⁸

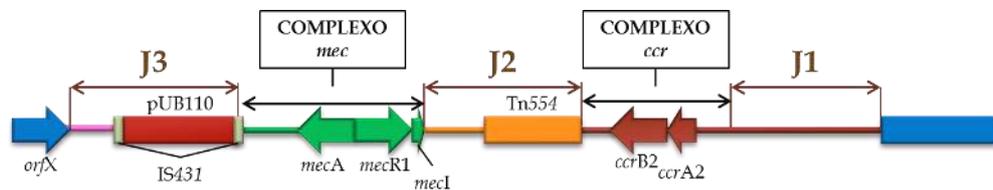


Figura 3 – Exemplo da organização de um elemento *SCCmec*. J1, J2 e J3 – regiões de junção. Fonte: Elaborada pela autora.

MRSA causam desde infecções de pele e feridas, na maioria das vezes decorrente da manutenção de dispositivos tipo cateter em pacientes hospitalizados, até pneumonias e infecções sistêmicas, na sua forma mais grave. O dano pode ser causado pela própria infecção ou por toxinas produzidas pelo patógeno.¹⁰⁻¹¹

Na década de 1980 foram reportados casos de infecções fora do ambiente hospitalar causadas por linhagens específicas de MRSA que foram denominadas MRSA associados à comunidade (CA-MRSA, do inglês “Community Associated - MRSA”), que possuíam como característica principal a maior sensibilidade aos antimicrobianos e a maior virulência associada, quando comparado às linhagens nosocomiais (HA-MRSA, do inglês “Hospital Acquired - MRSA”).¹² Até alguns anos atrás, as linhagens de *S. aureus* podiam ser então classificadas como HA-MRSA ou CA-MRSA, porém hoje já se observa certa homogeneidade entre essas linhagens, encontrando-se HA-MRSA na comunidade bem como CA-MRSA no ambiente hospitalar.¹³

1.2 EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR E MRSA

A Epidemiologia Molecular é uma ciência que dispõe de várias ferramentas para:

- detectar surtos em hospitais;
- identificar clones presentes em determinada região;
- monitorar o espalhamento de clones e plasmídeos entre os hospitais e ao redor do

mundo.

Como exemplo de aplicação, temos o trabalho de Harris et al. (2010) onde os autores realizaram um estudo com linhagens do tipo de sequência (ST, do inglês “Sequence Type”) 239 de MRSA isoladas em diferentes partes do mundo desde os anos 1980. Puderam criar uma árvore filogenética mostrando o espalhamento intercontinental da linhagem através do tempo. Os autores estimaram uma taxa de mutação de $3,3 \times 10^{-6}$ por sítio por ano, e encontraram que o ancestral comum mais antigo data de meados da década de 1960, que condiz com o período da emergência dos MRSA na Europa. Essa taxa de mutação proporcionaria uma mutação pontual a cada 6 semanas, taxa cerca de 1000 vezes maior que para *Escherichia coli*.¹⁴

Diversas linhagens de MRSA têm sido descritas ao redor do mundo, mas linhagens do complexo clonal (CC) 5 e 8 são as mais prevalentes.¹⁵ O clone de MRSA denominado Clone Brasileiro Endêmico (BEC, do inglês “Brazilian Endemic Clone”), um ST239-SCCmecIII, é prevalente no Brasil, e está também sendo reportado no restante da América do Sul bem como em parte da Europa.¹⁶⁻¹⁷ Um estudo demonstrou que BEC foi isolado em 19 cidades brasileiras, em 14 diferentes estados entre 1995 e 1997.¹⁸ Contudo, outras linhagens internacionais tem sido detectadas nos hospitais brasileiros, como CC5-SCCmecIV¹⁹⁻²¹, CC1-SCCmecIV^{20,22}, ST5-SCCmecII¹⁹, ST8-SCCmecIV¹⁹, ST5-SCCmecI¹⁹ e ST30-SCCmecIV.²⁰

No presente trabalho, essas ferramentas são utilizadas para traçar o perfil das linhagens de MRSA presentes no Hospital Risoleta Tolentino Neves, de Belo Horizonte – MG, no período de junho a dezembro de 2009, e verificar se há uma distribuição clonal. Os dados gerados são importantes para que a Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) possa tomar providências mais específicas de controle de infecções, podendo até mesmo contribuir para diminuir o tempo de internação dos pacientes, o que baixaria significativamente os custos para o hospital.

Os dados ainda contribuem para o banco de dados internacional de MLST que possibilita a realização de estudos que geram conhecimento sobre a situação dos MRSA na esfera mundial.

1.3 TRATAMENTO DAS INFECÇÕES CAUSADAS POR MRSA

Os antimicrobianos de escolha para o tratamento de infecções causadas por MRSA no Brasil são vancomicina, teicoplanina e linezolida. Outras alternativas são clindamicina, os macrolídeos e sulfametoxazol/trimetoprima.²³ As alternativas mais recentes para o tratamento são daptomicina e tigeciclina.

Daptomicina é um lipopeptídeo cíclico com atividade bactericida rápida. Em 2003 seu uso clínico foi aprovado nos Estados Unidos ²⁴, em 2005 na Europa ²⁵ e, recentemente, em 2008 no Brasil.²⁶ Daptomicina é indicada para o tratamento de infecções de pele complicadas, de estruturas epiteliais e infecções da corrente sanguínea causadas por MRSA, porém não é recomendada para o tratamento de endocardite infecciosa do lado esquerdo ou pneumonia.²⁷ Seu mecanismo de ação se deve à sua estrutura química particular (Figura 4), composta por um anel lipopeptídico e uma cadeia lateral lipofílica, a qual se insere na membrana celular bacteriana causando despolarização devido à perda de íons potássio. Essa despolarização por sua vez faz com que se interrompa a síntese de DNA, RNA e proteínas, causando morte celular.²⁸ Esse mecanismo de ação único é que faz com que tal antibiótico seja ineficaz no tratamento de infecções pulmonares, já que os surfactantes presentes nesse órgão sequestram as moléculas da droga evitando que ela se insira na membrana celular bacteriana.²⁹

Tigeciclina é um antimicrobiano de amplo espectro pertencente à classe das glicilciclinas, classe derivada das tetraciclinas, e seu mecanismo de ação se dá justamente através do núcleo de 4 anéis característico da classe (Figura 5), ou seja, inibindo a síntese proteica através de ligação à subunidade 30S do ribossomo bacteriano.³⁰ Apesar do mesmo mecanismo de ação, a molécula não é afetada pelos mecanismos de resistência das tetraciclinas, como bombas de efluxo e proteção ribossomal. A maior afinidade da tigeciclina ao ribossomo quando comparada à das tetraciclinas somado ao impedimento estérico causado pelo grupo volumoso pode explicar sua melhor eficiência.³¹ Embora esse antimicrobiano não seja recomendado para teste contra *S. aureus* pelo “Clinical and Laboratory Standards

Institute” (CLSI) ³², ele o é pela “European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases” (EUCAST) ³³. Já que no Brasil a maioria dos laboratórios seguem as recomendações do CLSI, este antimicrobiano é testado in vitro apenas contra microorganismos gram-negativos. De acordo com o fabricante, tigeciclina é indicada para o tratamento de infecções de pele complicadas, de estruturas epiteliais e infecções intra-abdominais complicadas causadas por MRSA.³⁴

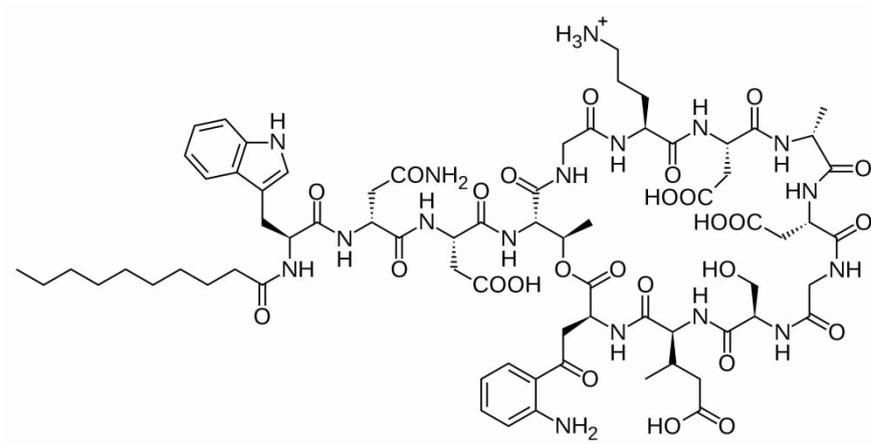


Figura 4 – Estrutura química da daptomicina. Fonte: Elaborada pela autora.

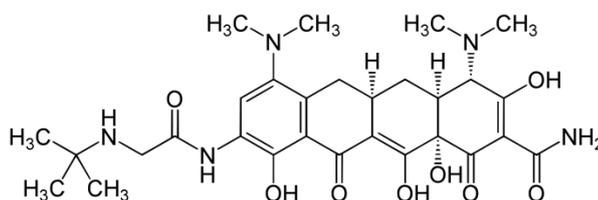


Figura 5 – Estrutura química da tigeciclina. Fonte: Elaborada pela autora.

1.4 *S. aureus* E GraR

Em 1997 foi descrita uma nova classe de MRSA, os *Staphylococcus aureus* com resistência intermediária à vancomicina (VISA, do inglês “Vancomycin-intermediate *S. aureus*”).³⁵

Capítulo 1 - Introdução

A vancomicina age prevenindo a transpeptidação de cadeias de peptidoglicano na parede celular bacteriana.³⁶ Vários estudos têm demonstrado possíveis alterações fenotípicas que levam à resistência a este antibiótico, dentre elas o aprisionamento das moléculas de vancomicina na parede celular mais espessa encontrada nas linhagens resistentes, impedindo sua difusão até o sítio de transpeptidação.³⁷

Algumas alterações genéticas que poderiam ter participação no surgimento de linhagens VISA já foram identificadas, porém não está claro as implicações funcionais dessas mutações.³⁸ Vários autores enfatizam a importância do sistema regulatório de dois componentes *graRS* dentre tais alterações.³⁹⁻⁴³

Um sistema de dois componentes permite que a bactéria reconheça estímulos ambientais e produza uma resposta. O primeiro componente desse sistema seria uma histidina-quinase, nesse caso, GraS, que está localizada na membrana celular do micro-organismo e quando estimulada por um fator externo se auto-fosforila e funciona como doadora de íons fósforo para um resíduo de aspartato do segundo componente, o regulador de resposta, nesse caso GraR, que então assume sua forma ativa dimérica. O regulador de resposta é composto por dois domínios, o N-terminal chamado de receptor, e o C-terminal chamado de efetor. O domínio efetor é responsável por se ligar ao DNA e regular a sua transcrição em resposta ao estímulo inicial.⁴⁴ A Figura 6 ilustra esse processo.

De acordo com Neoh et al. (2008) a expressão do gene codificando o regulador de resposta GraR do sistema *graRS* mutante em *S. aureus* com resistência heterogênea à vancomicina (h-VISA, do inglês “Heterogeneous vancomycin-resistant *S. aureus*”) leva a um aumento considerável na espessura da parede celular bacteriana e, conseqüentemente, a um aumento na concentração inibitória mínima (CIM) de vancomicina para um nível de VISA. Por outro lado, a expressão deste mesmo gene em uma linhagem sensível à vancomicina (VSSA, do inglês “Vancomycin-susceptible *Staphylococcus aureus*) não provoca os mesmos resultados, sugerindo assim a necessidade de mais de um passo para o surgimento de uma linhagem VISA.³⁵

Cui et al. (2009) apresentam dados que resultam na hipótese de que primeiramente ocorreria uma mutação no sistema regulatório de dois componentes *vraSR* de uma linhagem MRSA dando origem às linhagens h-VISA, e só após uma mutação no sistema *graSR* das h-VISA é que surgiriam as linhagens VISA.⁴² Estes mesmos autores sugerem que uma mutação no gene *graR* (*graR**) também está envolvida na redução da sensibilidade à daptomicina de linhagens VISA.

Capítulo 1 - Introdução

antimicrobianos. Com isso foi sugerido que pode haver um mecanismo de resistência cruzada entre vancomicina e daptomicina.⁴⁶ Em seguida, Katayama e colaboradores (2009) descreveram que uma mutação em *vraS* também resultou na redução da sensibilidade à daptomicina concomitantemente com o aparecimento do fenótipo de h-VISA.⁴⁷ Existem divergências entre os relatos sobre o mecanismo genético, o que indica que o perfil da linhagem pode influenciar no mecanismo a ser utilizado pela bactéria para um fenótipo em comum: a resistência.

Acredita-se que o locus de *graRS* poderia controlar pelo menos 248 genes,⁴⁸ e experimentos de microarranjo já demonstraram que uma mutação pontual em *graR* altera a expressão de mais de 100 genes, o que pode dar origem à células que se adaptam mais adequadamente à ambientes adversos.³⁵

Em 2011, Farlord et al. demonstraram o envolvimento do sistema de dois componentes GraRS com a resistência aos Peptídeos Antimicrobianos Catiônicos (CAMP, do inglês *Cationic Antimicrobial Peptides*) através de repulsão eletrostática, pois ele controla a expressão de um complexo enzimático responsável pela D-alanilação dos ácidos teicóicos (DltABCD) e também de outra enzima que promove a lisinilação de fosfatidilgliceróis (MprF). GraRS também controla a expressão de um transportador ABC, *vraFG*, que tem sido relacionado à resistência aos CAMP.⁴⁹

Os mesmos autores também sugerem uma sequência repetida invertida sendo bem conservada à montante do operon *vraFG* e também do operon *dltABCD* e gene *mprF* como sendo seu possível promotor, porém após várias tentativas o grupo não conseguiu obter a proteína GraR na sua forma ativa para mostrar a ligação ao DNA in vitro.⁵⁰

Sendo assim, o estudo estrutural da proteína GraR é de fundamental importância para o melhor entendimento dos mecanismos de resistência à antimicrobianos além da fisiologia de *S. aureus*.

CAPÍTULO 2

Objetivos



2 OBJETIVOS

O objetivo do estudo estrutural é:

- estudar as proteínas GraR e GraR* visando entender os mecanismos de resistência à vancomicina e à daptomicina em *S. aureus*, bem como auxiliar no entendimento da fisiologia de *S. aureus*.

Os objetivos do estudo epidemiológico são:

- Traçar o perfil fenotípico e genotípico das amostras bacterianas provenientes do Hospital Risoleta Tolentino Neves em Belo Horizonte a fim de verificar a disseminação de alguma linhagem;
- Procurar nas linhagens brasileiras mutações em genes descritos na literatura como responsáveis pelas resistências à vancomicina e à daptomicina;
- Pesquisar a presença do fator de virulência Leucocidina de Pantón-Valentine nos isolados;
- Sequenciar o genoma de uma linhagem representativa do clone prevalente no hospital.

CAPÍTULO 3

Materiais e Métodos

Estudo Estrutural



DNA Purification System (Promega, Madison, EUA) e utilizados para transformar células de expressão *E. coli* BL21 (DE3) pLysS (Novagen, Madison, EUA) através de choque térmico.

As células transformadas foram pré-inoculadas em caldo Luria-Bertani (LB) contendo os antimicrobianos adequados (canamicina e cloranfenicol) e permaneceram durante a noite em agitador à 37 °C. Os pré-inóculos foram transferidos para meio de auto-indução⁵¹, o qual foi incubado à 37 °C até atingir densidade ótica em comprimento de onda de 600 nm (DO_{600}) igual a 0,5, e então a expressão proteica se deu por 20 horas à 18 °C.

Após centrifugação por 20 minutos à 4.000 g, o concentrado celular foi suspenso em tampão de lise (Tris-HCl 20 mM pH = 7,4; NaCl 300 mM; Imidazol 20 mM) e as células foram lisadas através de sonicação por 14 ciclos de 30 segundos intercalados com 30 segundos de descanso. Em seguida, os debris foram separados da fração solúvel contendo GraR ou GraR* através de centrifugação à 40.000 g por 20 minutos.

A purificação se deu por meio de cromatografia de afinidade utilizando coluna pré-empacotada com resina de níquel HisTrap™ HP (GE Healthcare, São Paulo, Brasil). As proteínas purificadas foram submetidas à clivagem de suas caudas de hexa-histidina com trombina (5 U/ mg de proteína) em aparato de diálise, contra tampão livre de imidazol. Após clivagem foi realizado passo adicional de purificação em coluna cromatográfica de gel-filtração HiloLoad® 16/60 Superdex® 200 (GE Healthcare, São Paulo, Brasil).

3.1.1 Ensaios de Dicroísmo Circular de GraR e GraR*

O equipamento utilizado foi o espectropolarímetro J-815 (JASCO, São Paulo, Brasil) disponível no Laboratório de Espectroscopia do Grupo de Biofísica (IFSC).

As proteínas primeiramente foram ajustadas para concentração final de 0,25 mg/mL. Foi realizada a leitura do espectro de dicroísmo circular nos comprimentos de onda de 190 a 250 nm em intervalos de 0,2 nm variando a temperatura desde 20 até 90 °C em intervalos de 2 °C.

Os dados foram normalizados para elipticidade molar com o intuito de se comparar a estabilidade térmica das duas proteínas em questão.

3.1.2 Ensaios de Cristalização de GraR e GraR*

Após a obtenção das proteínas GraR e GraR* purificadas, foram realizados ensaios de cristalização visando a obtenção de cristais para posterior difração de raios X e resolução das estruturas cristalinas. Primeiramente, as proteínas foram concentradas para 5 mg/mL em dispositivo Amicon® Ultra-15 10.000 NMWL (Millipore, São Paulo, Brasil).

A triagem inicial das condições de cristalização foi realizada através do robô de cristalização Honeybee (Genomic Solutions, Ann Arbor, EUA) utilizando método de matriz esparsa com conjuntos comerciais para cada uma das duas proteínas de interesse. Os conjuntos utilizados para GraR com cauda de histidina foram: PEGs Suite, PEGs Suite II, Classics Suite e Classics Suite II (QIAGEN, São Paulo, Brasil); SaltRx (Hampton Research, Aliso Viejo, EUA). Para GraR sem cauda de histidina: PEGs Suite, PEGs Suite II, MPD Suite, Cryos Suite (QIAGEN, São Paulo, Brasil); SaltRx, Index HT e Crystal Screen HT (Hampton Research, Aliso Viejo, EUA). Para GraR* sem cauda de histidina: PEGs Suite, PEGs Suite II, MPD Suite e Cryos Suite (QIAGEN, São Paulo, Brasil).

Encontrada uma condição promissora, foi realizada otimização manual visando obter cristais adequados para difração de raios X. Essa otimização incluiu variação de pH, de concentração dos agentes precipitantes e da proteína e variação de temperatura de incubação, além do uso de aditivos. Ensaios de co-cristalização com ácido 5-Amino-2,4,6-triiodoisoftálico (I3C) foram realizados paralelamente para posterior obtenção das fases iniciais dos modelos cristalográficos.

A coleta dos dados cristalográficos dos cristais obtidos foi realizada em linha do “European Synchrotron Radiation Facility” (Grenoble, France). O processamento, integração e escalonamento dos dados de difração foram realizados com o programa XDS.⁵²

3.2 CONSTRUÇÕES *graR* e *graR** UTILIZANDO O VETOR pSMT3

O vetor pSMT3 é uma modificação do vetor pET28a (Novagen, Madison, EUA) onde foi inserido o gene codificando a proteína SUMO entre os sítios de clivagem das enzimas BamHI e NdeI.

Buscou-se essa alternativa com o propósito de se obter mais proteína na fração solúvel, já que a proteína de fusão SUMO auxilia neste objetivo, e também para melhorar o processo de clivagem da cauda de histidina, que utilizando trombina estava sendo de baixa eficiência. A clivagem da cauda de histidina de uma proteína produzida com o vetor pSMT3 se dá no momento em que a proteína de fusão é removida com a protease ULP1; o reconhecimento desta protease é na estrutura terciária da proteína a ser clivada, diferente do que ocorre com a trombina, que reconhece a sequência de aminoácidos. Mesmo a verificação da clivagem em eletroforese se dá mais facilmente, visto a grande diferença de tamanho da proteína fusionada da proteína clivada.

3.2.1 Amplificação dos genes *graR* e *graR**

Primeiramente, utilizou-se DNA genômico de *S. aureus* N315 para amplificação do gene *graR* e de *S. aureus* Mu50 para amplificação do gene *graR**. Os “primers” utilizados nesta amplificação foram confeccionados para inserir no fragmento sequências de reconhecimento para as enzimas de restrição BamHI (fw) e XhoI (rv), e assim tornar possível o uso do vetor pSMT3 (Tabela 1).

Tabela 1 – “Primers” para amplificação dos genes *graR* e *graR** com sítios para enzimas BamHI e XhoI

NOME	SEQUÊNCIA 5'-3'	T _m (° C)	CONTEÚDO GC (%)	TAMANHO DO AMPLIFICADO
GraRBamHISumo	GGATCCATGCAAATACT ACTAGTAGAAGATGAC	61,4	44,4	700 pb
GraRXhoISumo	CTCGAGTATTATTCATG AGCCATATATCCTTT	58,0	34,38	

Fonte: Elaborada pela autora

A reação de PCR utilizou o tampão da polimerase Taq à 1x, 0,2 mM da mistura dos 4 deoxinucleotídeos, 2,5 mM de MgCl₂, 0,4 μM de cada “primer”, 1,5 U de polimerase Taq, 100 ng de DNA e água q.s.p. 50 μL de reação.

O esquema de ciclagem de temperatura utilizado foi um passo inicial de desnaturação à 94 °C por 2 minutos seguido de 30 ciclos de desnaturação à 94 °C por 2 minutos, anelamento à 55 °C por 1 minuto e extensão à 72 °C por 2 minutos. Em seguida um passo final de extensão à 72 °C por 2 minutos.

Para verificação da integridade e pureza dos amplificadores, realizou-se uma corrida eletroforética em gel de agarose 1% à 80 V por 40 minutos.

3.2.2 Ligação em vetor de clonagem pGEM e transformação em *E. coli* DH5- α

Os produtos de PCR na concentração de 12 ng/ μ L foram utilizados na ligação ao vetor pGEM (Promega, Madison, EUA).

Para a ligação seguiu-se o protocolo do vetor que preconiza reação de 1 hora à temperatura ambiente utilizando 1 μ L vetor, 1 μ L inserto, 1 μ L T4 DNA ligase (3 U/ μ L), 5 μ L tampão de ligação e 2 μ L de água.

Após a ligação seguiu-se a transformação em células *E. coli* DH5- α . As células e o vetor ligado foram mantidos em gelo por 5 minutos até que as células descongelassem. Em tubo de 1,5 mL adicionou-se 2 μ L da reação de ligação e 50 μ L de células; manteve-se por 10 minutos no gelo. Realizou-se choque térmico em banho-maria 42 °C por 45 segundos seguido de gelo por 2 minutos. Adicionou-se 950 μ L de caldo LB e manteve-se em agitador à 37 °C por 1 hora. Semeou-se 700 μ L, 200 μ L e 100 μ L respectivamente em 3 placas de ágar LB contendo 100 μ g/mL de ampicilina, 0,5 mM de IPTG e 80 μ g/mL de X-gal, utilizando alça de Drigalski. As placas foram incubadas em estufa à 37 °C por 16 horas.

3.2.3 Digestão do vetor pSMT3 e dos insertos *graR* e *graR**

Uma colônia positiva da etapa anterior foi inoculada em caldo LB contendo 100 μ g/mL de ampicilina que foi incubado em agitador à 37 °C por 24 horas.

Realizou-se extração de DNA plasmidial desta cultura utilizando o conjunto Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System (Promega, Madison, EUA), bem como seu protocolo, partindo de 8 mL.

A digestão tanto do plasmídeo pSMT3 quanto dos insertos foi realizada conforme sugerido pelo site do fabricante das endonucleases (Fermentas, Burlington, Canadá), com

Tampão Tango 2x, BamHI em excesso 2x, XhoI 1x e incubação à 37 °C por 6 horas e então realizou-se a inativação enzimática, elevando a temperatura para 80 °C e mantendo-a por 20 minutos.

Para verificação da ocorrência da digestão adequada realizou-se corrida eletroforética em gel de agarose 1% a 90 V por 40 minutos com todo o conteúdo das reações de digestão.

As bandas foram cortadas do gel e purificadas utilizando o conjunto Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, EUA).

3.2.4 Ligação no vetor de expressão pSMT3 e transformação em *E. coli* DH5- α

Foi utilizada reação contendo 2 μ L do vetor (48,8 ng), 15 μ L do inserto (258 ng), 2 μ L de Tampão T4 DNA Ligase 10x, 0,75 μ L de T4 DNA Ligase e 0,25 μ L de água. A reação foi mantida à 18 °C por 1,5 horas.

Depois disso procedeu-se com a transformação em *E. coli* DH5- α , utilizando 5 μ L da reação de ligação para 50 μ L de células competentes. As células e o vetor ligado foram mantidos em gelo por 5 minutos até que as células descongelassem. Em tubo de 1,5 mL adicionou-se 5 μ L da reação de ligação e 50 μ L de células; manteve-se por 10 minutos no gelo. Realizou-se choque térmico em banho-maria 42 °C por 45 segundos seguidos de gelo por 2 minutos. Adicionou-se 200 μ L de caldo LB e manteve-se em agitador à 37 °C por 1 hora. Plaqueou-se todo o conteúdo do tubo em placa de ágar LB contendo 30 μ g/mL de canamicina, 0,5 mM de IPTG e 80 μ g/mL de X-gal, utilizando alça de Drigalski. As placas foram incubadas em estufa à 37 °C por 16 horas.

Para verificação da presença de inserto nas colônias que cresceram, elas foram submetidas à reação de PCR com primers do inserto.

Foi realizada eletroforese dos produtos de PCR para verificação da amplificação em gel de agarose 1% à 80 V por 40 minutos.

Uma colônia positiva foi escolhida e foi colocada para crescer em agitador à 37 °C em caldo LB contendo 30 μ g/mL de canamicina para realização de extração de DNA plasmidial e estoque glicerinado.

3.2.5 Transformação em célula de expressão *E. coli* Rosetta™ (DE3)

Primeiramente foi realizada extração de DNA plasmidial utilizando o conjunto Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System (Promega, Madison, EUA) com 8 mL de cultura.

Foi realizada transformação em células *E. coli* Rosetta™ (DE3) na proporção 1:10 (vetor:célula), com choque térmico à 42 °C por 45 segundos seguido de 2 minutos em gelo.

As células foram mantidas em agitador à 37 °C por 1 hora em 250 µL de meio LB, e em seguida foram semeadas. As placas utilizadas foram de caldo LB contendo 30 µg/mL de canamicina e 34 µg/mL de cloranfenicol. As placas foram incubadas em estufa à 37 °C por 24 horas.

Algumas colônias foram escolhidas para realização de PCR para verificação da presença do inserto, utilizando primers do inserto.

Foi realizada eletroforese dos produtos de PCR para verificação da amplificação em gel de agarose 1% à 80 V por 40 minutos.

3.2.6 Expressão de pSMT3-graR e pSMT3-graR* em *E. coli* Rosetta™ (DE3) e purificação das proteínas GraR e GraR*

As células transformadas foram pré-inoculadas em caldo LB contendo 30 µg/mL de canamicina e 34 µg/mL de cloranfenicol e incubadas em agitador à 37 °C por 24 horas. Em seguida foi realizado inóculo em meio de auto-indução, o qual foi incubado em agitador à 37 °C até atingir densidade ótica em comprimento de onda de 600 nm (DO_{600}) igual à 0,5, e então a expressão proteica se deu por 20 horas à 18 °C.

Os meios de cultura foram centrifugados por 40 minutos à 4500 rpm e 8 °C para separação das células. O sobrenadante foi descartado e o concentrado celular ressuspensão em 40 mL de tampão 20 mM Tris pH 7,4 + 300 mM NaCl + 20 mM Imidazol. Os concentrados celulares diluídos foram armazenados em tubos de 50 mL no freezer à -20 °C.

Um concentrado celular correspondente à cada proteína foi descongelado e as células foram lisadas através de sonicação por 14 ciclos de 30 segundos de sonicação intercalados

com 14 ciclos de descanso. Em seguida seus debris foram separados da fração solúvel contendo GraR ou GraR* através de centrifugação à 9.000 rpm por 40 minutos.

A purificação se deu por meio de cromatografia de afinidade utilizando coluna pré-empacotada com resina de níquel HisTrap™ HP (GE Healthcare, São Paulo, Brasil). As proteínas purificadas foram submetidas à clivagem de suas caudas de hexa-histidina através de incubação com ULP1 (1 parte de ULP1 para 80 partes da proteína a ser clivada, em massa) em aparato de diálise, contra tampão livre de imidazol. Após clivagem foram realizados passos adicionais de purificação por meio de cromatografia de afinidade utilizando coluna pré-empacotada com resina de níquel HisTrap™ HP (GE Healthcare, São Paulo, Brasil) e coluna cromatográfica de gel-filtração Hiloal® 16/60 Superdex® 200 (GE Healthcare, São Paulo, Brasil).

3.2.7 Ensaios de Cristalização de GraR e GraR*

As proteínas purificadas foram concentradas com Amicon® Ultra-15 10.000 NMWL (Millipore, São Paulo, Brasil) até o volume de 500 µL. A concentração final de GraR foi 5,8 mg/mL e de GraR* 4 mg/mL. Com essas amostras foram confeccionadas as seguintes caixas de cristalização com o auxílio de robô, com gotas de 0,9 µL: SaltRx (Hampton Research, Aliso Viejo, EUA); Cryos Suite, PEGs Suite, PEGs II Suite, Classics Suite e Classics Suite II (QIAGEN, São Paulo, Brasil)

3.2.8 Ensaios de Dicroísmo Circular de GraR e GraR*

O equipamento utilizado foi o espectropolarímetro J-815 (JASCO, São Paulo, Brasil) disponível no Laboratório de Espectroscopia do Grupo de Biofísica (IFSC-USP).

As proteínas primeiramente foram ajustadas para concentração final de 0,25 mg/mL. Foi realizada a leitura do espectro de dicroísmo circular nos comprimentos de onda de 200 a

250 nm em intervalos de 0,2 nm variando a temperatura desde 10 até 90 °C em intervalos de 5 °C.

Os dados foram normalizados para elipticidade molar com o intuito de se comparar a estabilidade térmica das duas proteínas em questão.

Os dados de 25 °C e 90 °C para GraR e GraR* foram submetidos ao programa K2D⁵⁴, que prediz a composição em estruturas secundárias.

CAPÍTULO 4

Materiais e Métodos
Estudo Epidemiológico



4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAS

As amostras bacterianas de 20 pacientes do Hospital Risoleta Tolentino Neves em Belo Horizonte – MG consistem de MRSA isolados entre junho e dezembro de 2009 e identificados por meio do Sistema Vitek® 2 (BioMérieux, Marcy l'Etoile, França) no Laboratório Geraldo Lustosa (Tabela 2). Um número de 25 isolados eram de focos de infecção e como o hospital realiza um programa de vigilância epidemiológica, 11 isolados de colonização de alguns dos pacientes infectados estavam disponíveis e foram incluídos no estudo.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (CEP/FCFRP n° 46/2011).

4.2 EXTRAÇÃO DE DNA DOS ISOLADOS

Cada um dos isolados armazenados em freezer -80 °C em caldo de infusão de cérebro e coração (BHI, do inglês “Brain and Heart Infusion”) contendo 40% de glicerol foi inoculado pela técnica de esgotamento em placas de ágar 2xYT.

As placas foram incubadas em estufa à 37 °C por 14 horas para que houvesse crescimento de colônias isoladas e fosse confirmada a pureza das amostras.

Uma colônia isolada de cada amostra foi inoculada em tubo contendo 10 mL de caldo BHI. Os tubos foram incubados em agitador com rotação de 100 rpm à 37 °C por 20 horas. As células cultivadas foram centrifugadas e lavadas com solução fisiológica esterilizada. Em seguida procedeu-se a lise mecânica das células utilizando pérolas de vidro tratadas com ácido nítrico e agitação vigorosa, segundo Palazzo et al. (2007). O DNA foi extraído com fenol-clorofórmio e precipitado com isopropanol.⁵⁵

Posteriormente o material genético foi suspenso em água e seguiu-se tratamento com RNase. Finalmente, o DNA extraído foi quantificado e avaliado quanto à pureza utilizando a razão de absorbância 260/280 nm.

4.3 TESTES DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

A CIM foi determinada para oxacilina, tigeciclina, teicoplanina, quinupristina-dalfopristina, linezolida, daptomicina e vancomicina.

Todos os antimicrobianos foram avaliados utilizando fitas Etest® (BioMérieux, Marcy l'Etoile, França). Vancomicina (Sigma-Aldrich Co., St Louis, EUA), daptomicina (Hospira Inc., McPherson, EUA) e tigeciclina (Pfizer Inc., Groton, EUA) foram também avaliadas pela técnica de microdiluição, e ainda diluição em ágar, no caso específico de vancomicina.

O critério para sensibilidade aos antimicrobianos foram os recomendados pelo CLSI³², exceto para tigeciclina, que não tem pontos de corte para *S. aureus* descritos neste documento. Os critérios de interpretação para tigeciclina foram aqueles estabelecidos para estafilococos pelo “Food and Drug Administration” (FDA)⁵⁶, isto é, $CIM \leq 0,5$ mg/L indicando sensibilidade, os mesmos critérios do EUCAST.³³

Foram calculadas CIM_{50} e CIM_{90} , ou seja, a concentração que inibiu 50% e 90% dos isolados, respectivamente, para cada antimicrobiano testado. Para este cálculo foram levadas em consideração as CIM determinadas por microdiluição, quando mais de um método foi empregado, e pelo Etest®, quando este foi o único método empregado, porém seguimos as recomendações de Schwarz et al. (2010) que indica a necessidade de se arredondar o valor das CIM para um valor acima quando este não faz parte das diluições seriadas padrão (isto é, 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2 e 4 mg/L, etc).⁵⁷

Capítulo 4 – Materiais e Métodos – *Estudo Epidemiológico*

Tabela 2 – Dados provenientes do Laboratório Geraldo Lustosa referente aos isolados em estudo

Amostra	Paciente	Data de Isolamento	Espécime Clínico
SA01	1	26/06/2009	Secreção da articulação do ombro
SA02	2	26/06/2009	Prótese PTFE
SA15	3	06/07/2009	Refluido de cateter central
SA16	4	07/07/2009	Sangue periférico
SA17	5	10/07/2009	Tecido subcutâneo da perna esquerda
SA23	6	14/07/2009	Secreção de foco de fratura na tíbia
SA24	7	12/07/2009	Mini lavado bronco-alveolar
SA33	8	11/07/2009	Hemocultura 1 e 2
SA34	9	12/07/2009	Fragmento de tecido em membro inferior direito
SA35	10	16/07/2009	Hemocultura 1, 2 e 3
SA36	8	17/07/2009	Fêmur proximal direito
SA41	11	10/08/2009	Aspirado traqueal
SA42	12	09/08/2009	Secreção de abscesso em membro inferior esquerdo e fragmento de ferida em membro inferior esquerdo
SA43	11	10/08/2009	Sangue periférico 1, 2 e 3
SA47	13	10/08/2009	Partes moles e líquido
SA48	13	10/08/2009	Área sequestro ósseo em patela
SA67	14	29/08/2009	Hemocultura 1 e 2 e ponta de cateter de duplo lúmen
SA69	15	01/09/2009	Ponta de cateter
SA70	14	29/08/2009	Ponta de cateter vascular central
SA72	16	07/09/2009	Mini lavado bronco-alveolar
SA73	17	07/09/2009	Fragmento de tecido profundo de pé direito
SA82	18	20/09/2009	Hemocultura 1, 2 e 3
SA83	18	20/09/2009	Ponta de cateter
SA100	19	08/10/2009	Hemocultura 1 e 3
SA113	20	16/11/2009	Mini lavado bronco-alveolar
SA07	10	29/06/2009	Suabe nasal
SA11	4	02/07/2009	Suabe nasal
SA20	10	13/07/2009	Suabe nasal
SA21	3	13/07/2009	Suabe nasal
SA31	10	09/07/2009	Suabe nasal
SA38	11	06/08/2009	Suabe nasal
SA46	11	10/08/2009	Suabe nasal
SA53	12	17/08/2009	Suabe nasal
SA56	14	24/08/2009	Suabe nasal
SA63	15	31/08/2009	Suabe nasal
SA64	14	31/08/2009	Suabe nasal

Fonte: Elaborada pela autora

4.3.1 Difusão em ágar

Para determinação da CIM por difusão em ágar, foram utilizadas fitas Etest® (BioMérieux, Marcy l'Etoile, França). Primeiramente inoculou-se cada isolado em ágar BHI e incubou-se em estufa à 37 °C por 24 horas para obtenção de colônias isoladas.

Com colônias isoladas foi produzida uma suspensão na escala 0,5 de Mc Farland em solução fisiológica esterilizada, que foi inoculada em placa de ágar Mueller-Hinton (AMH) ou Mueller-Hinton com 2% de NaCl, para oxacilina.

Após incorporação da suspensão bacteriana no meio de cultura, uma fita Etest® do antimicrobiano a ser testado foi colocada com pinça. Incubou-se em estufa à 37 °C e realizou-se a leitura após 24 e 48 horas. A CIM foi determinada pelo ponto de intersecção entre a fita e a elipse de inibição do crescimento do micro-organismo.

4.3.2 Microdiluição

Para realizar o método da microdiluição foram seguidas as normas do CLSI.³² Preparou-se uma solução-estoque à 320 mg/L de vancomicina em água ultrapura levando em conta a potência do antimicrobiano (90%). Diluiu-se esta solução em caldo Mueller-Hinton (CMH) de modo a obter a concentração inicial para preparo das microplacas de 96 poços, ou seja, 16 mg/L. A partir desta concentração foi sendo realizada diluição seriada 1:2 na própria microplaca (100 µL por poço). Foi incluído para cada microplaca um controle positivo (CMH sem adição de antimicrobiano) e um controle negativo (CMH sem adição de inóculo). O mesmo procedimento foi realizado para daptomicina e tigeciclina, exceto o fato de que se utilizou CMH cátion-ajustado para tigeciclina e CMH cátion-ajustado suplementado com cloreto de cálcio para uma concentração final de 50 mg/L de íons cálcio, no caso da daptomicina. Os intervalos de concentração de antibiótico avaliados foram 0,125 mg/L à 16,0 mg/L para vancomicina e 0,125 mg/L à 4 mg/L para daptomicina e tigeciclina.

O inóculo foi preparado como descrito no CLSI³² e as microplacas foram incubadas em estufa à 37 °C. A leitura foi feita observando se houve ou não turvação do meio como resultado do crescimento bacteriano, após 24 e 48 horas. Para facilitar a visualização do

resultado, empregou-se 30 µL de solução de resazurina (Sigma-Aldrich Co., St Louis, EUA) 0,1 mg/mL em cada poço, e aguardou-se 4 horas para revelação. A mudança de coloração de azul para rosa indicava crescimento, devido à redução da forma oxidada. A CIM foi definida pela menor concentração do antimicrobiano capaz de inibir visualmente o crescimento bacteriano.

4.3.3 Diluição em Ágar

Para realização do método da diluição em ágar igualmente seguiu-se as normas do CLSI.³² Os inóculos foram semeados utilizando um replicador de Steers, e as concentrações de vancomicina avaliadas foram as mesmas da técnica de microdiluição.

As placas foram deixadas no fluxo laminar até que os inóculos secassem e então elas foram incubadas em estufa à 37 °C. A leitura foi realizada após 24 e 48 horas.

4.3.4 Triagem para h-VISA

Todos os isolados foram submetidos à triagem para h-VISA através de análise de população de um único ponto. Uma linhagem é classificada com h-VISA quando sua CIM fica na faixa da sensibilidade para vancomicina, ou seja, $CIM \leq 2$ mg/L, mas quando se realiza análise de população uma parte da cultura apresenta crescimento em concentrações de vancomicina maiores que 2 mg/L, ou seja, é uma linhagem com população heterogêna.

Culturas com crescimento de 18 horas em caldo BHI foram ajustadas para turbidez 0,5 na escala Mc Farland. Alíquotas de 100 µL da suspensão de células foram espalhadas em placas de ágar BHI contendo 4 mg/L de vancomicina. As placas foram incubadas à 37 °C e lidas após 48 horas. Foram considerados possíveis h-VISA aqueles isolados que apresentaram colônias contáveis em 48 horas de incubação.⁵⁸

4.3.5 Análise de População

Isolados que apresentaram algum crescimento na triagem para detecção de h-VISA ou foram detectados como VISA por Etest® foram submetidos à análise de população. Os isolados foram cultivados em caldo BHI por 24 horas e então as culturas foram diluídas em solução fisiológica esterilizada até atingirem a escala 0,5 de Mc Farland (correspondente à 10^8 UFC/mL). Várias diluições 1:10 foram preparadas a partir desta, até 10 UFC/mL. Inoculou-se 0,1 mL de cada suspensão em placas contendo 0; 0,5; 1; 2; 3; 4; 5 e 6 mg/L de vancomicina. As placas foram então incubadas em estufa à 37 °C. Após 48 horas realizou-se a contagem de colônias, o valor das diluições foi corrigido e o resultado plotado em gráfico log 10 UFC/ml versus concentração de vancomicina. A área sob a curva foi calculada e comparada à da linhagem h-VISA Mu3. Um isolado é considerado h-VISA se houver pelo menos 1 log10 de crescimento na concentração de 4 mg/L de vancomicina⁵⁸, ou a razão entre a áreas sob a curva do mesmo e da linhagem Mu3 for maior ou igual a 0,9.⁵⁹

Isolados que apresentaram crescimento peculiar no Etest® para daptomicina também foram submetidos à análise de população para esta droga. O procedimento foi o mesmo descrito acima, exceto que o caldo BHI foi suplementado com cálcio até uma concentração de 50 mg/L e as concentrações de droga testada foram 0; 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2; 3 e 4 mg/L. Como não existe padronização da interpretação dos dados, seguiu-se os critérios de Hiramatsu et al. (1997) para vancomicina.⁵⁸ Assim, havendo crescimento de pelo menos 1 log10 na concentração de 2 mg/L de daptomicina e a amostra sendo sensível pelo método da microdiluição, era considerada *S. aureus* com resistência heterogênea à daptomicina (h-DRSA, do inglês “Heterogeneous daptomycin-resistant *S. aureus*”).⁵⁸

4.4 DETECÇÃO DA PRESENÇA DO GENE *mecA*

A pesquisa foi realizada utilizando reação de PCR com “primers” desenhados para o gene em questão, seguida de análise do produto em corrida eletroforética a 5 V/cm em gel de agarose 1% para verificação de uma banda de 286 pb.

Os “primers” utilizados para amplificação do gene *mecA* e a reação de PCR foram os descritos por Kondo et al. (2007).⁶⁰ O programa consistiu de uma etapa de desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos, seguida por 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 2 minutos, anelamento a 57 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 2 minutos, e ainda uma etapa de extensão final a 72 °C por 2 minutos.

4.5 TIPAGEM MOLECULAR

4.5.1 “Multilocus Sequence Typing” (MLST)

Fragmentos de 7 genes “housekeeping” foram amplificados utilizando “primers” e condições segundo o esquema descrito no site Multilocus Sequence Typing Homepage⁶¹, exceto o “primer” *gmk rv* que foi redesenhado de modo a cobrir uma porção maior do alelo *gmk* para fins de sequenciamento. A sequência do “primer” *gmk rv* utilizada foi 5'-GCTCAGCTTCTACAATACATTGAA-3'

Os amplicons foram verificados quanto à pureza em eletroforese 5 V/cm em gel de agarose 1% e em seguida foram purificados utilizando o conjunto Wizard® SV (Promega Corporation, Fitchburg, EUA). Após purificação, os amplicons foram quantificados em equipamento Nanodrop (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, EUA) onde ainda verificou-se a relação de pureza 260/280 nm.

Eles então foram submetidos ao sequenciamento em duplicata em equipamento MegaBACE™ (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Reino Unido) utilizando os mesmos “primers” da reação de PCR.

As sequências produzidas foram analisadas através do programa ContigExpress, parte integrante do pacote VectorNTI® 11.0 (Life Technologies, Carlsbad, EUA) para a formação dos seus “contigs”. Os “contigs” formados foram então submetidos à análise mutacional comparando-os às sequências depositadas no banco de dados do site Multilocus Sequence Typing Homepage. Com isso, cada sequência, de cada alelo, de cada isolado foi classificada de acordo com o banco de dados resultando num Perfil Alélico. Este Perfil Alélico consiste de

um conjunto de 7 números, cada qual correspondente a um alelo. A cada conjunto de 7 números é dado um outro número, o chamado ST.

Os STs foram ainda analisados com o auxílio do algoritmo eBURSTv3,⁶² onde é possível verificar a relação genética entre os STs e com o banco de dados, o que permite observar sua distribuição mundial.

4.5.2 Eletroforese em Campo Pulsado

PFGE foi realizada após macrorrestrrição do material genético dos isolados com a enzima *SmaI*, de acordo com Tenover et al. (1995).⁶³ O gradiente da corrida de 22 horas foi de 6 V/cm sob ângulo de 120°, com tempo inicial de 5 segundos e tempo final de 40 segundos e rampeamento linear. O perfil eletroforético foi analisado com o programa Bionumerics v6.5 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica) realizando agrupamento baseado nos coeficientes Dice e utilizando o método da média aritmética não ponderada, onde otimização e tolerância foram ajustados para 0,5% e 1,25%, respectivamente. Amostras foram consideradas do mesmo pulstotipo quando compartilharam mais de 80% de similaridade no perfil eletroforético.⁶⁴

4.5.3 Tipagem do elemento SCCmec

Foi empregado PCR “multiplex” em duas etapas para tipagem do elemento SCCmec.⁶⁰

A primeira etapa classificou o complexo *ccr* de acordo com o tamanho do amplificado: 695 pb para *ccrA1B1*, 937 pb para *ccrA2B2*, 1791 pb para *ccrA3B3*, 1287 pb para *ccrA4B4* e 518 pb para *ccrC*, além da amplificação de um controle interno, o gene *mecA* com tamanho de 286 pb.

A segunda etapa classificou o complexo *mec* de acordo com o tamanho do amplificado: 1963 ou 1797 pb para classe A (*mecA-mecI*), 2827 pb para classe B (*mecA-IS1272*) e 804 pb para classe C (*mecA-IS431*).

A combinação de complexo *ccr* e classe *mec* resultou no tipo de elemento *SCCmec*: *SCCmecI* – *ccrA1B1/B*, *SCCmecII* – *ccrA2B2/A*, *SCCmecIII* – *ccrA3B3ccrC/A*, *SCCmecIV* – *ccrA2B2/B*, *SCCmecV* – *ccrC/C*, *SCCmecVI* – *ccrA4B4/B*.

Os “primers”, bem como a reação de PCR “multiplex” e programa utilizados foram os descritos por Kondo et al. (2007).⁶⁰

Linhagens padrão foram amplificadas em cada um dos PCR “multiplex” para fins de controle de qualidade. São elas *S. aureus* NCTC10442 (*SCCmecI*), *S. aureus* N315 (*SCCmecII*), *S. aureus* 85/2082 (*SCCmecIII*), *S. aureus* CA05 (*SCCmecIV*), *S. aureus* WIS (*SCCmecV*) e *S. aureus* NARSA144 (controle negativo).

Nos casos em que houve amplificação de *ccrA2B2* e *ccrA4B4* no mesmo isolado, foi realizado um protocolo adicional para confirmar a origem externa ao elemento *SCCmec* de *ccrA4B4*, e assim enquadrar tais amostras em subtipos de *SCCmecII* (A a E). Esse “multiplex” PCR adicional utilizou “primers” que identificam o gene *mecA* (*mecA147-F* e *mecA112-R*), a classe *mec A* (*mecI-F* e *mecI-R*), o *ccrA4B4* externo ao elemento *SCCmec* de origem em *Staphylococcus epidermidis* (*ccr4-Fd* e *ccr4-R2*), espécie *S. aureus* (*nuc1* e *nuc2*), e junção específica do *SCCmec* tipo VIII (VIII-F3 e VIII-R3). Os “primers”, bem como a reação de PCR “multiplex” e programa de ciclagem de temperatura utilizada foram os descritos por McClure et al. (2010).⁶⁵

A eletroforese para verificação das bandas foi realizada em gel de agarose 1,5% a 5 V/cm.

4.6 PESQUISA POR GENES QUE EXPRESSAM LEUCOCIDINA DE PANTON-VALENTINE

Leucocidina Panton-Valentine (PVL, do inglês Panton-Valentine leukocidin) é uma toxina produtora de poros, utilizada por *S. aureus* para destruir leucócitos. É produzida por 2 genes contíguos e co-expressos num fragmento de prófago integrado no cromossomo bacteriano.

A pesquisa por genes que expressam PVL, *lukS* e *lukF*, foi realizada utilizando “primers” e condições previamente descritos⁶⁶ e comparando o resultado da amplificação com a de um controle positivo (*S. aureus* 81/108) em eletroforese 5 V/cm em gel de agarose 1%.

4.7 SEQUENCIAMENTO DE GENES RELACIONADOS À RESISTÊNCIA À VANCOMICINA E À DAPTOMICINA EM MRSA

Uma amostra de cada pulstotipo foi selecionada para ter alguns de seus genes envolvidos nas resistências à vancomicina (*graR*³⁵, *graS*⁴³, *vraR*⁶⁷ e *vraS*⁴²) e à daptomicina (*mprF*⁶⁸) sequenciados. São elas: pulstotipo A – SA16, pulstotipo B – SA01, pulstotipo C – SA33, pulstotipo D – SA73, pulstotipo E – SA23, pulstotipo F – SA17, pulstotipo G – SA113 – pulstotipo H – SA34. A amostra SA72 também teve esses genes sequenciados, para completar o grupo dos ST239. O gene *rpoB*⁶⁹, também envolvido na resistência à daptomicina foi sequenciado apenas nas amostras que apresentaram tal resistência, SA42 e SA69.

Para amplificação de cada gene, utilizou-se um par de “primers” composto pelo primeiro F e último R de cada grupo exposto na Tabela 3, os demais “primers” foram utilizados apenas para fins de sequenciamento. A reação de PCR foi composta por 100 ng de DNA genômico; 0,5 µM de cada “primer”; 200 µM de dNTPs; 2,5 mM de MgCl₂; tampão da DNA polimerase Taq 1x; 1,5 U da DNA polimerase Taq e q.s.p. 50 µL de água ultrapura. O programa consistiu de uma etapa de desnaturação inicial à 94 °C por 2 minutos, seguida por 30 ciclos de desnaturação à 94 °C por 2 minutos, anelamento à 55 °C por 1 minuto e extensão à 72 °C por 2 minutos, e ainda uma etapa de extensão final à 72 °C por 2 minutos.

Os tamanhos esperados para os fragmentos amplificados são 630 pb para *graR*, 1044 pb para *graS*, 675 pb para *vraR*, 1041 pb para *vraS*, 2523 pb para *mprF* e 3552 pb para *rpoB*.

Os amplicons foram verificados quanto à pureza em eletroforese 5 V/cm em gel de agarose 1% e em seguida foram purificados utilizando o conjunto Wizard® SV (Promega Corporation, Fitchburg, EUA). Após purificação os amplicons foram quantificados em equipamento Nanodrop (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, EUA) onde ainda verificou-se a relação de pureza 260/280 nm.

Eles então foram submetidos ao sequenciamento em equipamento Applied Biosystems® 3130 Genetic Analyzer (Life Technologies, Carlsbad, EUA). As sequências produzidas durante o sequenciamento foram analisadas através do programa ContigExpress, parte integrante do pacote VectorNTI® 11.0 (Life Technologies, Carlsbad, EUA) para verificação da qualidade dos eletroferogramas e posterior formação dos “contigs”. As sequências trabalhadas foram então submetidas à análise mutacional comparando-as às sequências depositadas nas bases de dados de linhagens resistentes aos referidos antimicrobianos.

Tabela 3 – “Primers” utilizados para sequenciamento de genes envolvidos na resistência à vancomicina e à daptomicina

NOME	SEQUÊNCIA 5'-3'
graR-F1	ATGCAAATACTACTAGTAGAAGATG
graR-R1	TTATTCATGAGCCATATATCCTTTT
graS-F1	ATGAATAATTTGAAATGGGTAGCTTAT
graS-R1	TCGAGTTTATACGAGACCATTTC
graS-F2	CTGTGACAGCCATGAAATTA
graS-R2	TTAAAATGACAAATTTGTCACTTCC
vraR-F1	ATGACGATTAAAGTATTGTTTGTG
vraR-R1	CTATTGAATTAATTTATGTTGGAATGC
vraS-F1	ATGAACCACTACATTAGAACAATTG
vraS-R1	AAAGCATCATACTTGCCG
vraS-F2	CAAAGACTAGCTCGAGAACT
vraS-R2	TTAATCGTCATACGAATCCTCC
mprF-F1	ATGAATCAGGAAGTTAAAAACAAAATA
mprF-R1	TGAATGATACATGAGCGTCAA
mprF-F2	ACTTTAGTGTGCGTGTGTGAA
mprF-R2	TACAATAAGCAGAACAATAAATAGC
mprF-F3	CATTCTTCACTTACGCTTCATA
mprF-R3	TGCGTTAAATCAATAATTGCTTC
mprF-F4	ACACATGCCTTTATATCATAATTTT
mprF-R4	TTATTTGTGACGTATTACACGC
rpoB-F1	TTGGCAGGTCAAGTTGTCCA
rpoB-R1	GCTTGTTCAAGTGTTCAGTGCC
rpoB-F2	CTCAAGTGACCAAGAAATTGTTGACCTT
rpoB-R2	GTACAACCTTTCCATTCTTGATAAACCGAT
rpoB-F3	TTAGGTAACCGTCGTTTACGTTCTGTAG
rpoB-R3	CATGTTTCGCACCCATCAATGC
rpoB-F4	ATCGCCGAAGCAAGTTGTTC
rpoB-R4	CACCTTTAGGCGTTACTTTACCAACTAA
rpoB-F5	AATCACAAGAGATATTCCTAATGTTTCTGA
rpoB-R5	CAAGTGAATATGGTCCTGTTGAACG
rpoB-F6	GCACATGGTTGATGATAAATTACATGCG
rpoB-R6	TTAATCAGTAACTTCTTTTTGTGTTTCAGGAGC

Fonte: Elaborada pela autora

4.8 SEQUENCIAMENTO DO GENOMA DE *S. aureus* SA16

Essa é uma seção do trabalho que não estava prevista no projeto inicial, mas que surgiu na oportunidade de realização de estágio de pesquisa no laboratório do Prof. Dr. Michael S. Gilmore (Harvard Medical School, Massachusetts Eye and Ear Infirmary, Boston, USA) no período de setembro a dezembro de 2011.

SA16 foi isolado do sangue de um paciente e representa o clone MRSA prevalente no Hospital Risoleta Tolentino Neves em 2009. Utilizando o método de Kirby-Bauer, ainda no laboratório do hospital onde foi isolado, foi determinado como sensível à vancomicina,

amicacina e gentamicina, mas resistente à oxacilina, ciprofloxacino, clindamicina, eritromicina e penicilina.

De acordo com Etest® (BioMérieux, Marcy l'Etoile, França), SA16 era também sensível à daptomicina (CIM=1 mg/L), teicoplanina (CIM=3 mg/L), linezolida (CIM=0,75 mg/L), tigeciclina (CIM=0,19 mg/L), e tinha resistência intermediária à quinupristina-dalfopristina (CIM=1,5 mg/L).

O DNA genômico foi extraído e purificado com o auxílio de DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, Valencia, EUA), e então submetido ao sequenciamento através de tecnologia Illumina HiSeq (Illumina) na Tufts University DNA Core Facility (Boston, MA). Independentemente, DNA genômico foi também submetido à um sequenciador 454 FLX (Roche) na University at Buffalo Next-Generation Sequencing and Expression Analysis Core (Buffalo, NY) para obter cobertura maior que 10 vezes.

As leituras produzidas por ambas as plataformas foram agrupadas em “contigs” através de mapeamento contra o genoma de referência *S. aureus* N315 no programa CLC Genomics Workbench v4.8.

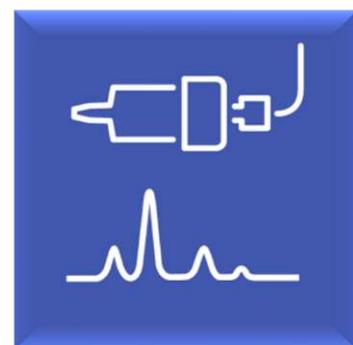
Leituras que não puderam ser mapeadas foram então agrupadas em “contigs” pelo método “de novo” no mesmo programa.

Os “contigs” >200 pb (n=74) foram anotados com Prokaryotic Genome Annotation Pipeline v2.0 (NCBI) para depósito da sequência junto ao GenBank.

CAPÍTULO 5

Resultados e Discussão

Estudo Estrutural



5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CONSTRUÇÕES pET28a

5.1.1 Expressão e Purificação

A expressão tanto de GraR quanto de GraR* com o vetor pET28a foi adequada, com alguma proteína sendo perdida na fração insolúvel mas boa parte disponível na fração solúvel, como verificou-se nos géis de poliacrilamida (Figuras 9 e 10). Porém, a purificação não foi eficiente. Após a purificação por afinidade verificou-se muitas bandas de contaminantes.

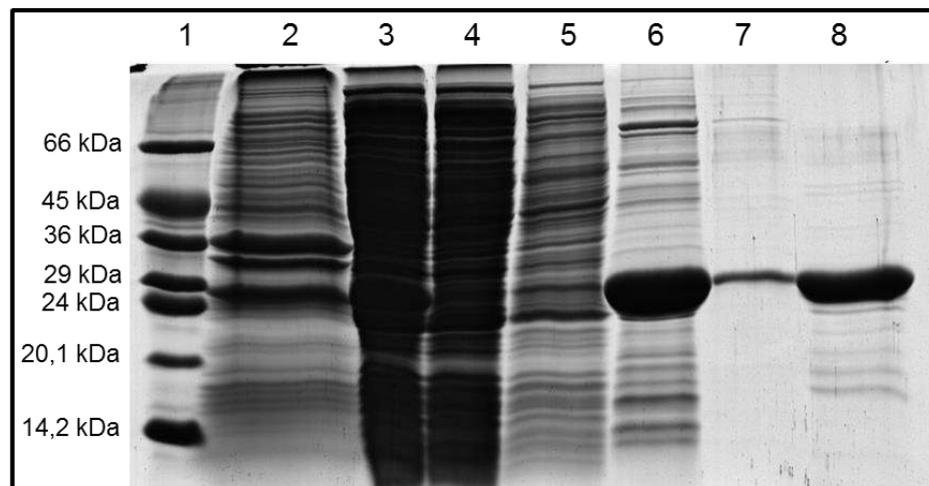


Figura 9 – Gel de poliacrilamida 15% corado com azul de Comassie referente à purificação por afinidade da proteína GraR. 1 – Marcador de massa molecular; 2 – Fração Insolúvel; 3 – Fração Solúvel; 4 – Fração não-ligada; 5 – Lavagem; 6 – Pico 1; 7 – Pico 2; 8 – Após clivagem e gel-filtração. Fonte: Elaborada pela autora.

A clivagem da cauda hexa-histidina também foi problemática, tendo um rendimento muito baixo, tanto que a etapa de purificação por afinidade após clivagem foi excluída para não haver muitas perdas. Após gel-filtração ainda verificou-se a presença de contaminantes na amostra, principalmente de menor massa molecular. Outro problema é que com a exclusão da

segunda etapa de purificação por afinidade, foi mantida uma dupla população proteica: clivada e não-clivada.

5.1.2 Dicroísmo Circular

Para realização dos experimentos de Dicroísmo Circular, a última etapa de purificação (cromatografia por exclusão molecular) foi realizada com tampão 20 mM Fosfato pH=7,4 + 100 mM NaCl, pois o tampão Tris não é estável com variação de temperatura e excesso de sal diminui a capacidade de detecção de sinal em comprimentos de onda menores.

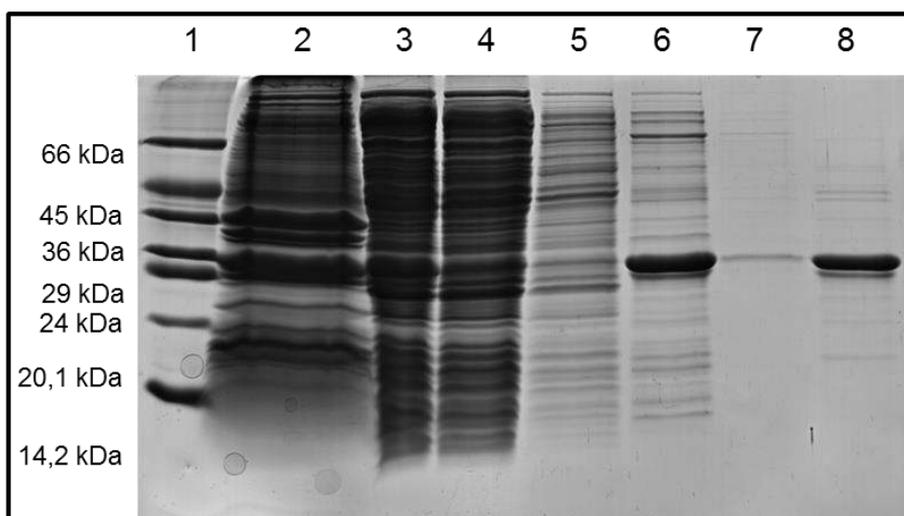


Figura 10 – Gel de poliacrilamida 15% corado com azul de Coomassie referente à purificação por afinidade da proteína GraR*. 1 – Marcador de massa molecular; 2 – Fração Insolúvel; 3 – Fração Solúvel; 4 – Fração não-ligada; 5 – Lavagem; 6 – Pico 1; 7 – Pico 2; 8 – Após clivagem e gel-filtração. Fonte: Elaborada pela autora.

Tanto GraR quanto GraR* não chegaram a perder completamente a estrutura secundária quando aquecidas até 90 °C, com pequena variação quando comparadas à 20 °C (Figuras 11 e 12).

A Figura 13 também mostra que a estrutura das proteínas é bastante semelhante, e estavam bem enoveladas à 20 °C.

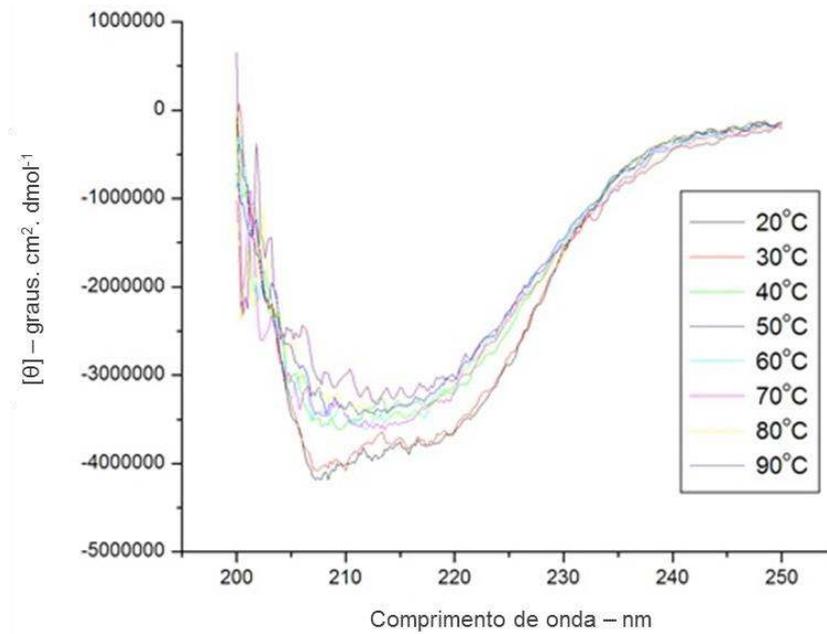


Figura 11 – Espectros de Dicroísmo Celular da proteína GraR em temperaturas de 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 e 90 °C. Fonte: Elaborada pela autora.

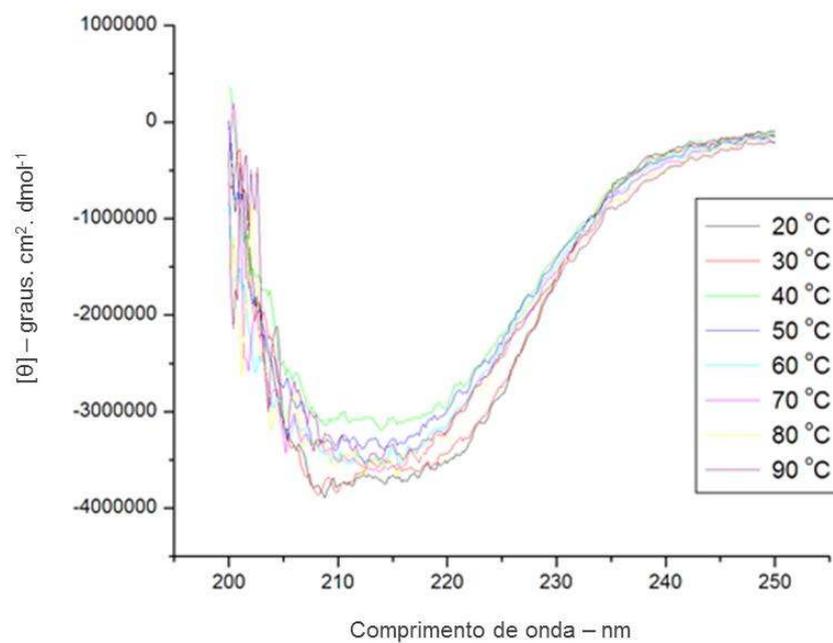


Figura 12 – Espectros de Dicroísmo Celular da proteína GraR* em temperaturas de 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 e 90 °C. Fonte: Elaborada pela autora.

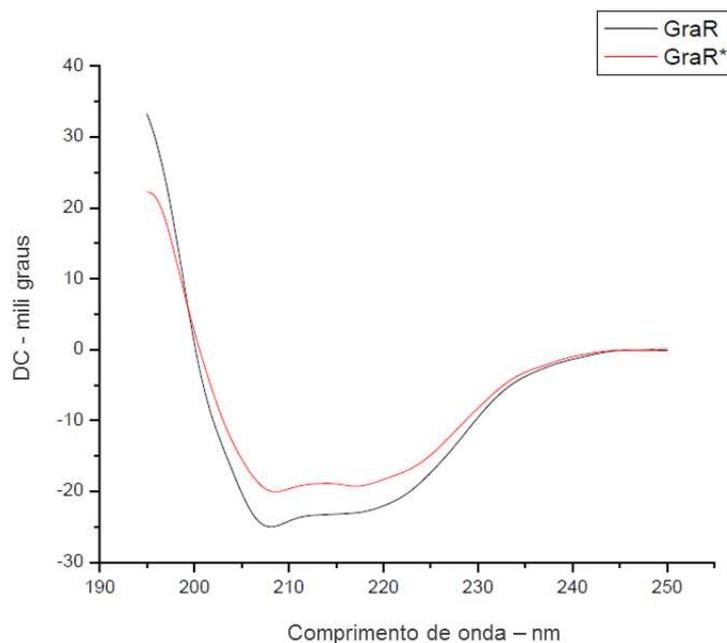


Figura 13 – Espectros de Dicroísmo Celular das proteínas GraR e GraR* à 20 °C. Fonte: Elaborada pela autora.

5.1.3 Ensaios de Cristalização

Dentre todas as condições testadas, apenas uma delas apresentou cristais (Figura 14): condição C6 do conjunto Cryos Suite (QIAGEN, São Paulo, Brasil) para a proteína GraR. A condição consiste de Tris-HCl 75 mM pH=8,5; glicerol 25%; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,5 M; a concentração proteica era de 5 mg/mL.

Primeiramente testou-se essa mesma condição em gotas de 4 μL manualmente para verificar a reprodutibilidade, que foi constatada. Um dos cristais foi testado no difratômetro Rigaku Micromax-007HF com placa de imagem Rigaku R-AXIS IV++ disponível no Grupo de Cristalografia do IFSC-USP, e verificou-se tratar-se de um cristal proteico, porém os dados estavam com baixíssima resolução.

Partiu-se então para a otimização da condição de cristalização. A condição que produziu cristais mais bem formados foi apenas alterando-se o pH para 8,3 (Figura 15).

Estes cristais foram difratados no European Synchrotron Radiation Facility (Grenoble, França), e sua organização molecular ainda não foi suficiente para produzir bons padrões de difração (Figura 16). Informações preliminares puderam ser obtidas, como as dimensões da

cela unitária (171.21 171.21 109.10 90.00 90.00 120.00 sendo a, b, c, (Å) α , β , γ (°); respectivamente) e provável grupo espacial (P61).



Figura 14 – Cristais de GraR na condição de cristalização inicial. Tris-HCl 75 mM pH=8,5; Glicerol 25%; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,5 M. Fonte: Elaborada pela autora.

A partir destes resultados decidiu-se por tentar uma nova construção utilizando o vetor pSMT3 para tentar obter proteína em maior quantidade, mais facilmente purificável e com clivagem da cauda eficiente. Talvez com proteína mais pura pudessem ser obtidos cristais mais adequados à difração de raios X.



Figura 15 – Cristais de GraR na após otimização da condição de cristalização. Tris-HCl 75 mM pH=8,3; Glicerol 25%; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,5 M. Fonte: Elaborada pela autora.

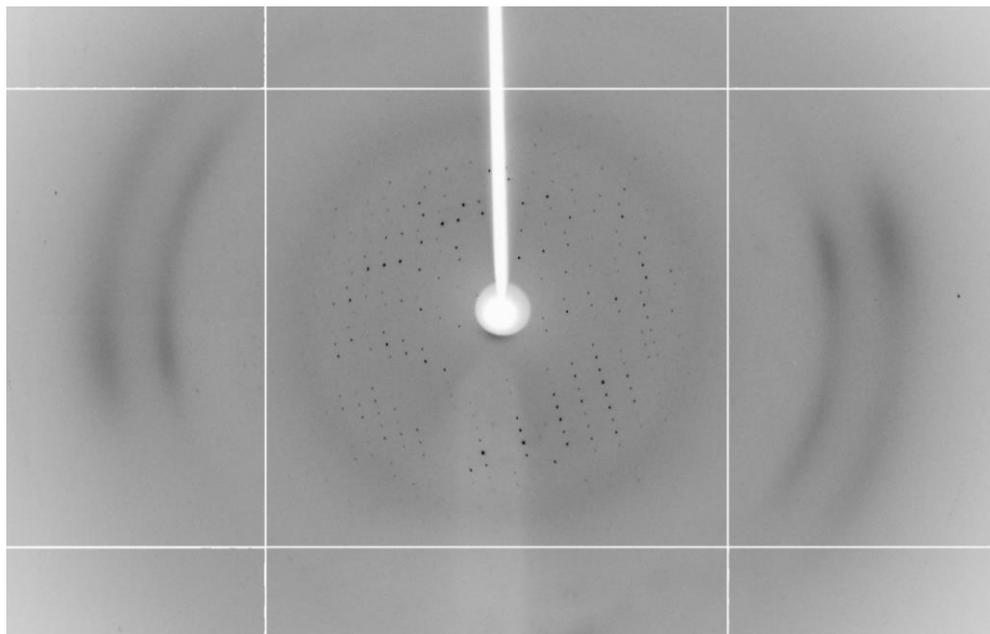


Figura 16 – Padrão de difração de um cristal de GraR otimizado. Fonte: Elaborada pela autora.

5.2 CONSTRUÇÕES pSMT3

5.2.1 Clonagem, expressão e purificação

Na etapa de amplificação dos genes *graR* e *graR** ambas as amostras apresentaram-se suficientemente puras e com tamanho adequado (ao redor de 700 pb).

Após a ligação dos amplificados no vetor de clonagem e transformação em *E. coli* DH5- α houve crescimento tanto de colônias brancas como de azuis (positivas e negativas, respectivamente). Realizou-se PCR de todas essas colônias com os primers do inserto para confirmação da adequada transformação.

Apesar de teoricamente somente as colônias brancas serem positivas, o teste foi realizado para todas, inclusive azuis, e ambas amplificaram com o tamanho correto (ao redor de 700 pb). Segundo o fabricante isso é possível quando ocorre inserção no quadro de leitura do gene *lacZ*, e ele continua ativo.

Após realização de extração de DNA plasmidial para obter o vetor, o resultado foi 100 μ L a 183 ng/ μ L.

O sucesso na digestão dos insertos bem como do vetor de expressão pSMT3 com as enzimas BamHI e XhoI foi demonstrado em gel de agarose após corrida eletroforética (Figura 17).

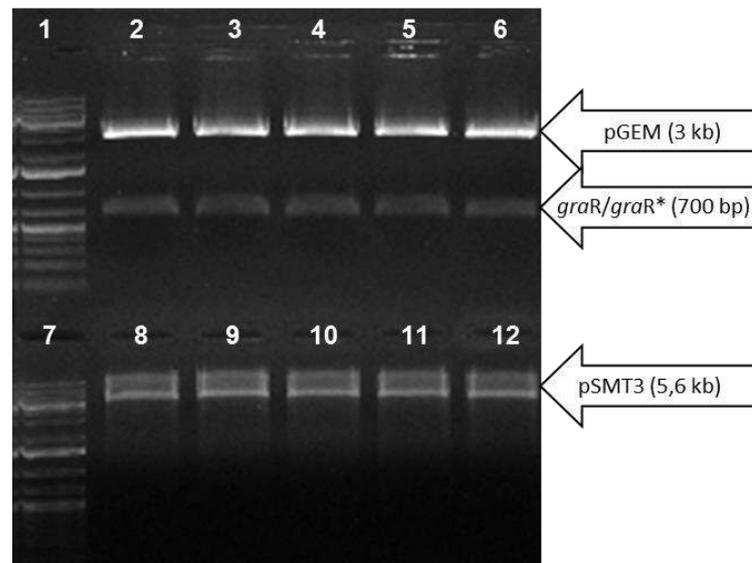


Figura 17 – Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo para verificação da digestão dos insertos e do vetor de expressão. 1 e 7 – Marcador de massa molecular GeneRuler™ 1 kb Plus (Fermentas); 2 a 6 – fragmento correspondente ao gene *graR* e fragmento correspondente ao vetor pGEM; 8 a 12 – fragmento correspondente vetor pSMT3. Fonte: Elaborada pela autora.

O procedimento de ligação no vetor de expressão e transformação em *E. coli* DH5- α foi eficiente, bem como a transformação nas células de expressão. Uma das colônias que foi positiva foi escolhida para dar procedimento ao experimento e realizar expressão proteica.

Foi realizada a primeira purificação de afinidade da proteína GraR e foi possível visualizar no cromatograma três picos (Figura 18). Estes foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida, juntamente com frações representativas de cada etapa da purificação de modo a verificar em que fração a proteína de interesse se encontrava (Figura 19).

Sendo assim, com a eletroforese verificou-se que a proteína fusionada (26 kDa GraR + 16 kDa SMT3 = 42 kDa) foi eluída em grande quantidade nos picos 2 e 3 da cromatografia de afinidade.

Do mesmo modo, o cromatograma abaixo (Figura 20) refere-se à primeira purificação de afinidade da proteína GraR*. Igualmente é possível visualizar 3 picos, que foram submetidos à eletroforese, juntamente com frações representativas de cada etapa da

purificação de modo a verificar em que fração a proteína de interesse encontrava-se (Figura 21).

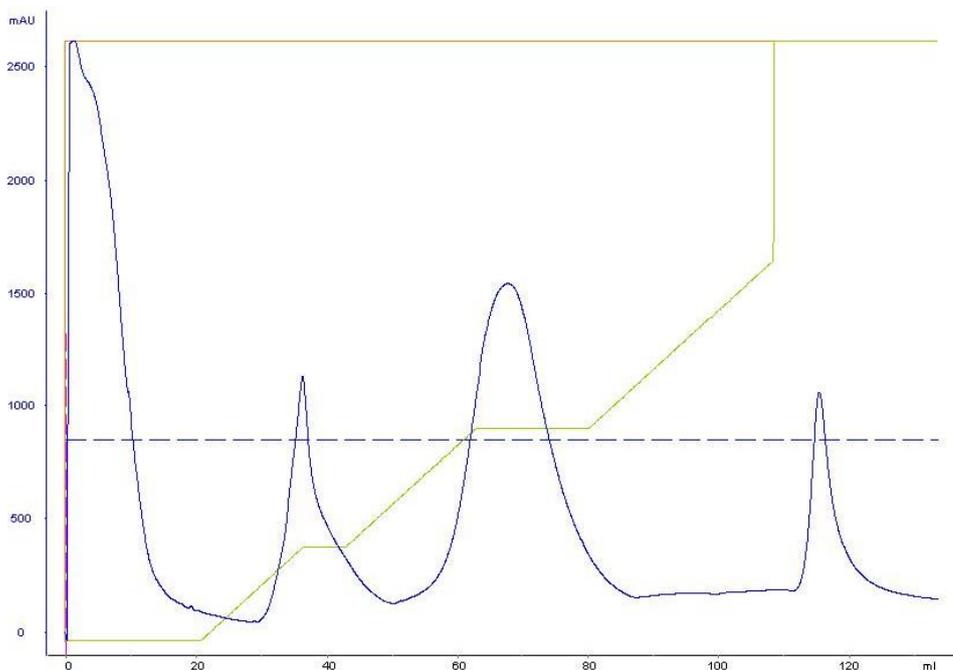


Figura 18 – Cromatograma da primeira purificação por afinidade da proteína GraR. Em azul a leitura em 280 nm, em verde o gradiente de imidazol. Fonte: Elaborada pela autora.

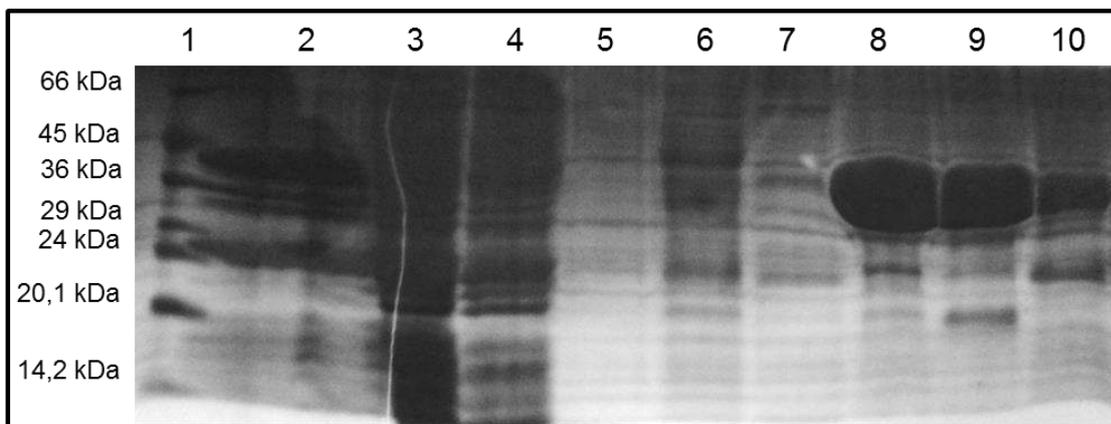


Figura 19 – Gel de poliacrilamida 15% corado com azul de Comassie referente à primeira purificação por afinidade da proteína GraR. 1 – Marcador de massa molecular; 2 – Fração Insolúvel; 3 – Fração não-ligada; 4 – Lavagem (parte 1); 5 – Lavagem (parte 2); 6 – Pico 1 (parte 1); 7 – Pico 1 (parte 2); 8 – Pico 2 (parte 1); 9 – Pico 2 (parte 2); 10 – Pico 3. Fonte: Elaborada pela autora.

Novamente a proteína foi eluída nos picos 2 e 3. Esses dois géis ficaram repletos de bandas secundárias devido a um defeito no tampão de corrida.

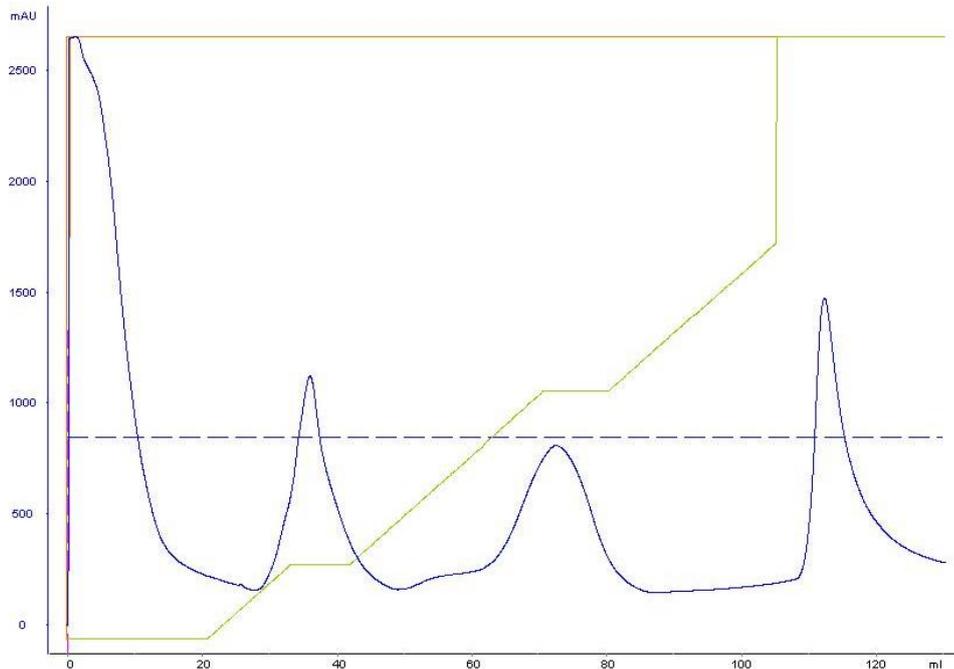


Figura 20 – Cromatograma da primeira purificação por afinidade da proteína GraR*. Em azul a leitura em 280 nm, em verde o gradiente de imidazol. Fonte: Elaborada pela autora.

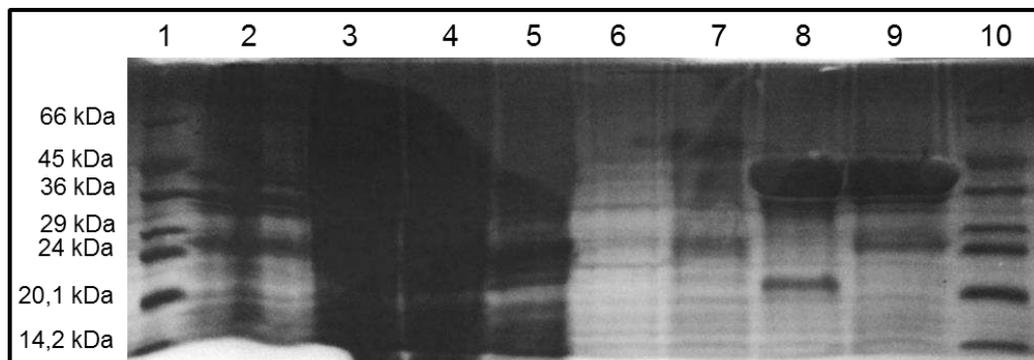


Figura 21 – Gel de poliacrilamida 15% corado com azul de Coomassie referente à primeira purificação por afinidade da proteína GraR*. 1 e 10 – Marcador de massa molecular; 2 – Fração Insolúvel; 3 – Fração Solúvel; 4 - Fração não-ligada; 5 – Lavagem (parte 1); 6 – Lavagem (parte 2); 7 – Pico 1; 8 – Pico 2; 9 – Pico 3. Fonte: Elaborada pela autora.

Juntando os picos 2 e 3 de GraR foram obtidos 60 mg de proteína, e juntando os picos 2 e 3 de GraR* foram obtidos 42 mg de proteína. Estes valores representam a proteína fusionada, e esperava-se que ele caísse aproximadamente pela metade quando houvesse a clivagem, pois a proteína perde aproximadamente 50% de sua massa que é correspondente à proteína de fusão SMT3.

Após a clivagem, realizou-se nova etapa de purificação por afinidade (Figuras 22 e 23), desta vez esperando-se que a proteína de interesse fosse eluída na lavagem, e que a proteína de fusão, que continuaria com a cauda de histidina, fosse eluída com a gradiente de imidazol.

Com eletroforese em gel de poliacrilamida das etapas de purificação foi possível visualizar se houve clivagem completa ou não (Figura 24).

A clivagem foi insuficiente para ambas as proteínas. Separou-se a fração clivada, concentrou-se para 4 mL e aplicou-se em coluna de gel-filtração (HiLoad 16/60 Superdex 75).

Previamente à aplicação na coluna de gel-filtração a concentração das proteínas foi medida, e foi de 2,7 mg/mL (10,8 mg no total) para GraR e 1,84 mg/mL (7,36 mg no total) para GraR*.

O cromatograma abaixo refere-se à gel-filtração de GraR (Figura 25), onde observa-se um pico bem definido na região de 70 mL de eluição. O mesmo ocorre para GraR* (Figura 26).

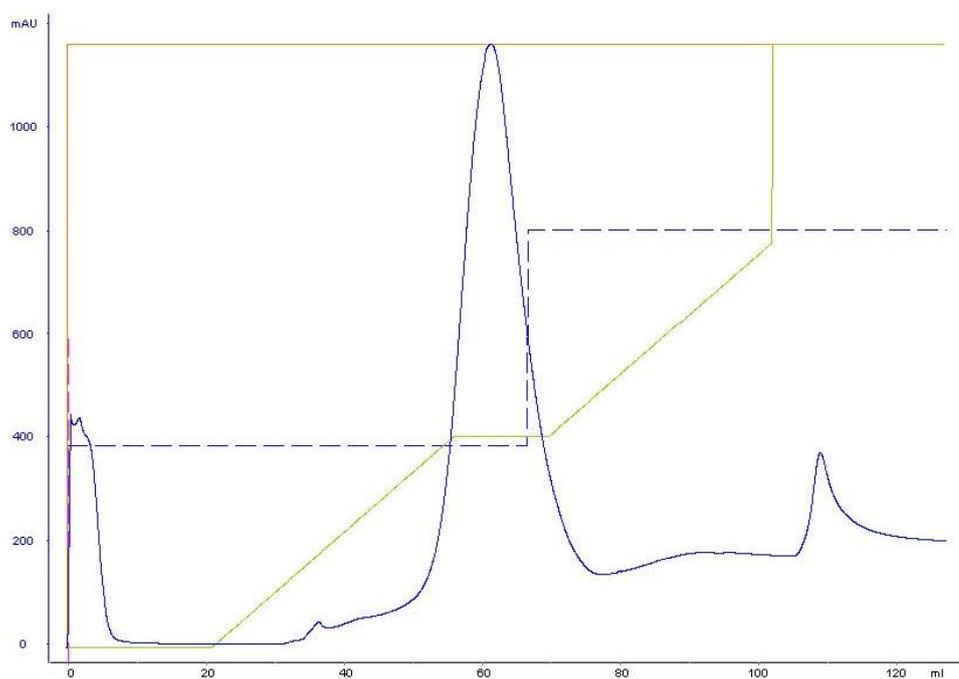


Figura 22 – Cromatograma da segunda purificação por afinidade da proteína GraR, após clivagem da proteína de fusão. Em azul a leitura em 280 nm, em verde o gradiente de imidazol. Fonte: Elaborada pela autora.

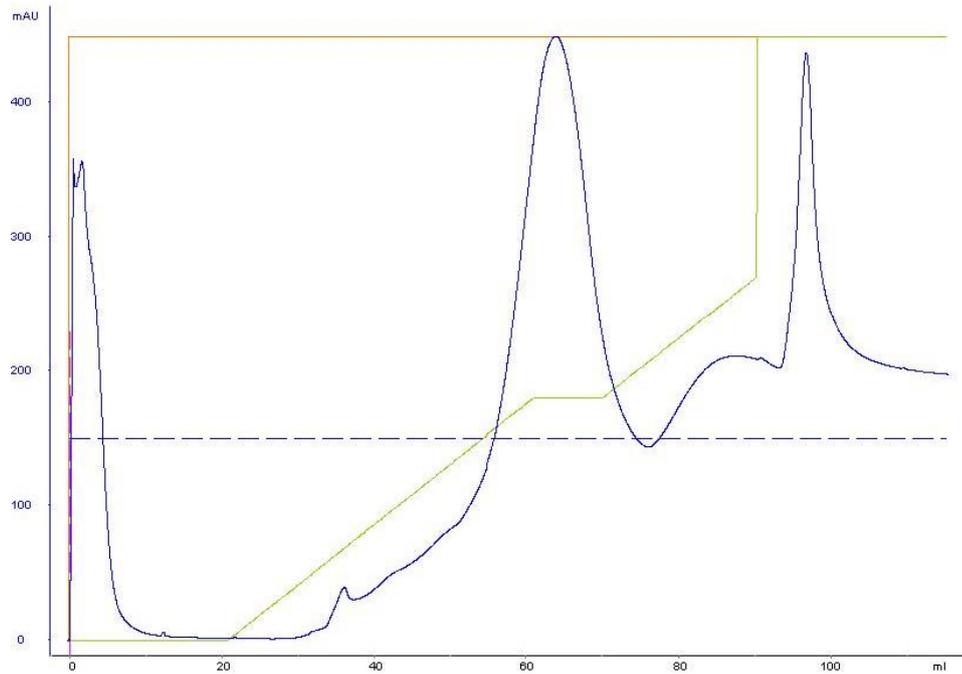


Figura 23 – Cromatograma da segunda purificação por afinidade da proteína GraR*, após clivagem da proteína de fusão. Em azul a leitura em 280 nm, em verde o gradiente de imidazol. Fonte: Elaborada pela autora.

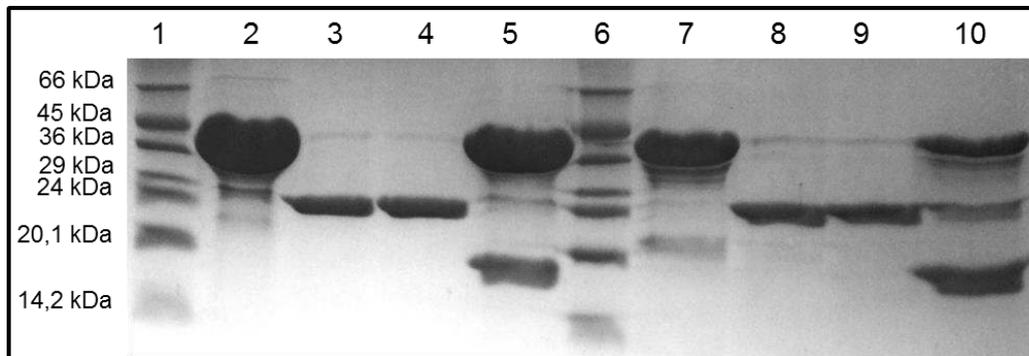


Figura 24 – Gel de poliacrilamida 15% corado com azul de Coomassie referente à segunda purificação por afinidade das proteínas GraR e GraR*. 1 e 6 – Marcador de massa molecular; 2 – GraR antes da clivagem; 3 – GraR não-ligada (clivada); 4 – GraR fração lavagem (clivada); 5 – GraR pico 1 (não clivado); 7 – GraR* antes da clivagem; 8 – GraR* não-ligada (clivada); 9 – GraR* fração lavagem (clivada); 10 – GraR* pico 1 (não-clivada). Fonte: Elaborada pela autora.

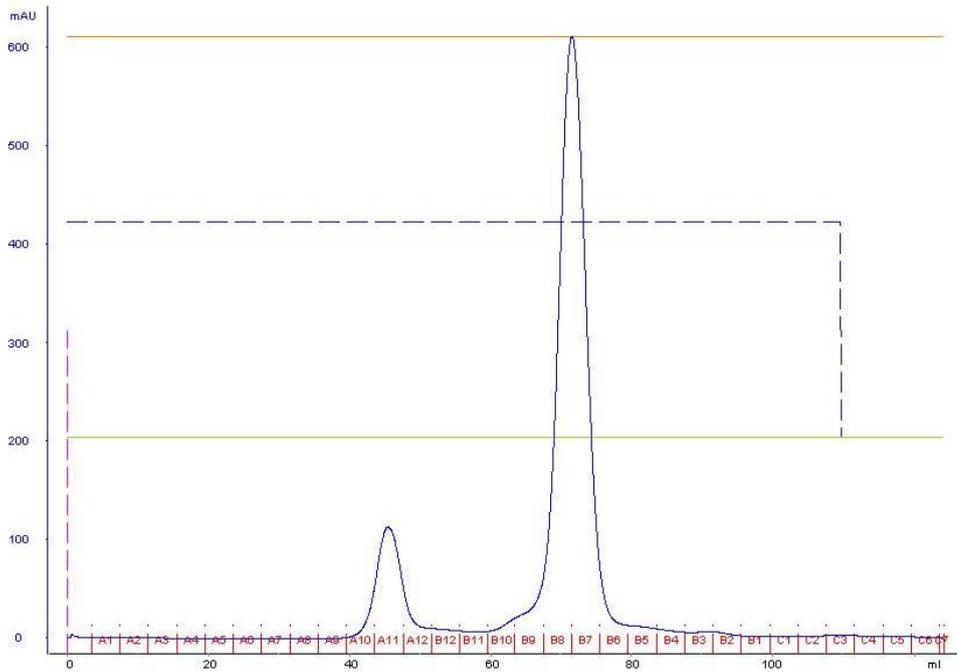


Figura 25 – Cromatograma da purificação por exclusão de tamanho de GraR. Em azul a leitura em 280 nm. Fonte: Elaborada pela autora.

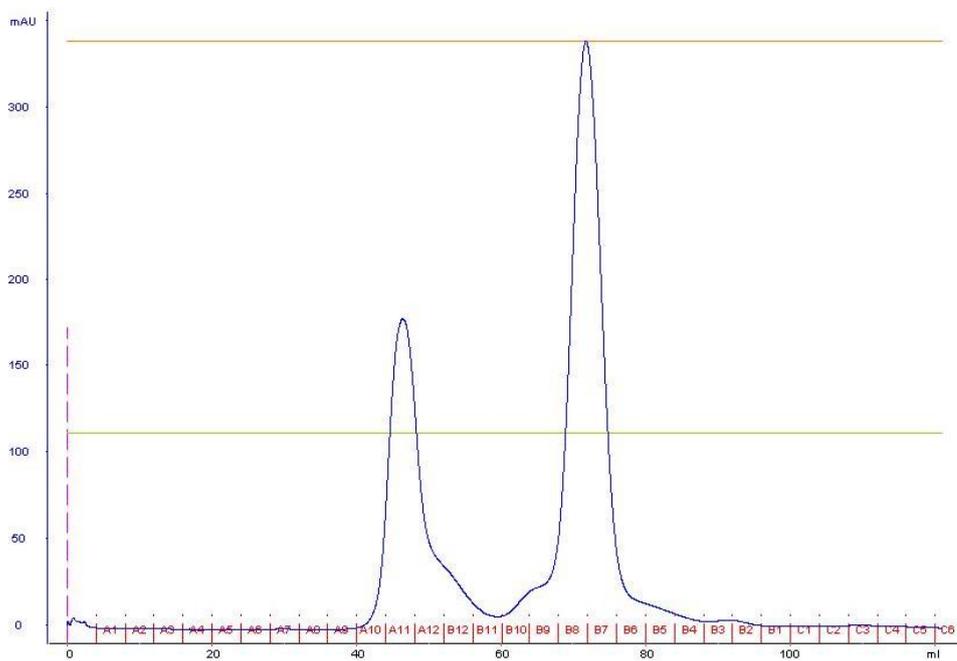


Figura 26 – Cromatograma da purificação por exclusão de tamanho de GraR*. Em azul a leitura em 280 nm. Fonte: Elaborada pela autora.

É possível visualizar na Figura 27 que a purificação foi bem sucedida para ambas as proteínas (sem nenhuma banda adicional, como acontecia utilizando a construção anterior com pET28a).

Ambas foram concentradas para aproximadamente 500 μ L e separadas para triagem de condições de cristalização.

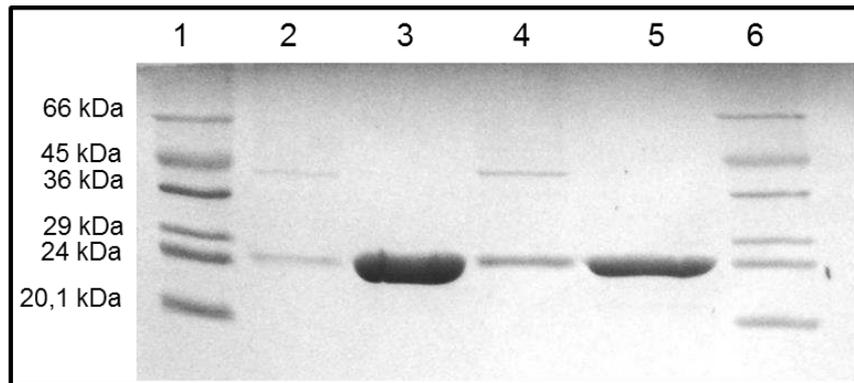


Figura 27 – Gel de poliacrilamida 15% corado com azul de Comassie referente à purificação por exclusão de tamanho das proteínas GraR e GraR*. 1 e 6 – Marcador de massa molecular; 2 – GraR pico 1; 3 – GraR pico 2; 4 – GraR* pico 1; 5 – GraR* pico 2. Fonte: Elaborada pela autora.

5.2.2 Ensaio de Cristalização

A leitura das condições de cristalização foi realizada após 48 horas, 9 dias, 21 dias e 1 ano. Nenhuma condição apresentou cristais.

É de senso comum que os reguladores de resposta de múltiplos domínios são difíceis de cristalizar.^{50,70-71} Isso se deve primeiramente à necessidade de haver fosforilação de um resíduo de aspartato conservado do domínio receptor para que a molécula assuma sua forma dimérica ativa. Segundo, por ser uma molécula que se liga ao DNA, se mostra extremamente flexível, dificultando ainda mais a estabilização em uma forma passível de cristalização.

5.2.3 Dicroísmo Circular

Para realização dos experimentos de Dicroísmo Circular das proteínas provenientes de construções com SMT3, os tampões usuais de purificação foram utilizados.

Tanto GraR quanto GraR* não chegaram a perder completamente a estrutura secundária quando aquecidas até 90 °C, ocorrendo pequena variação quando comparadas à temperatura de 10 °C (Figuras 28 e 29). Ocorreram variações mais bruscas apenas na região dos 200 nm, provavelmente por perda da estrutura das hélices- α .⁷²

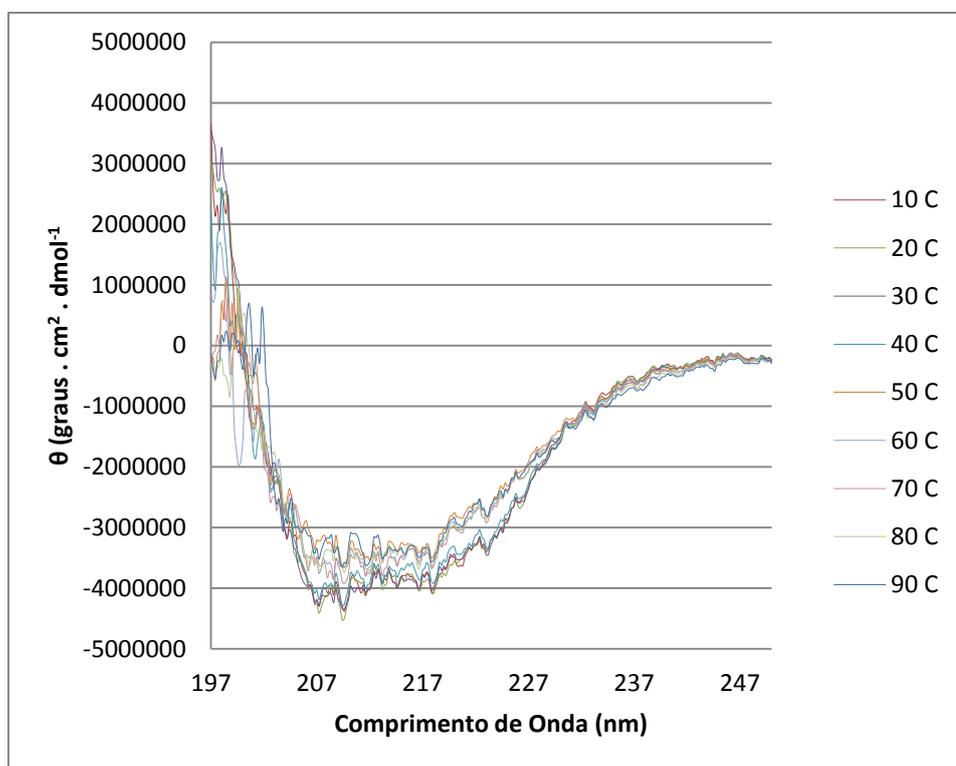


Figura 28 – Espectros de Dicroísmo Celular da proteína GraR nas temperaturas de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 e 90 °C. Fonte: Elaborada pela autora.

Os resultados do programa K2D são mostrados na Tabela 4, e para GraR observa-se apenas uma queda de 4% na quantidade de hélices- α quando a temperatura passa de 25 para 90 °C, e uma queda de 9% nas hélices- α e 1% nas folhas- β no caso de GraR*. Porém, esses dados devem ser levados em conta com cautela, visto que para todas as análises, o valor de erro máximo ficou muito próximo ao limite admitido (dados não mostrados). Essa perda de

estrutura de hélices- α provavelmente proporcionaria uma perda da atividade, já que a região do domínio efetor dos reguladores de resposta que se liga ao DNA normalmente é composta por um motivo que contém hélices.⁷³

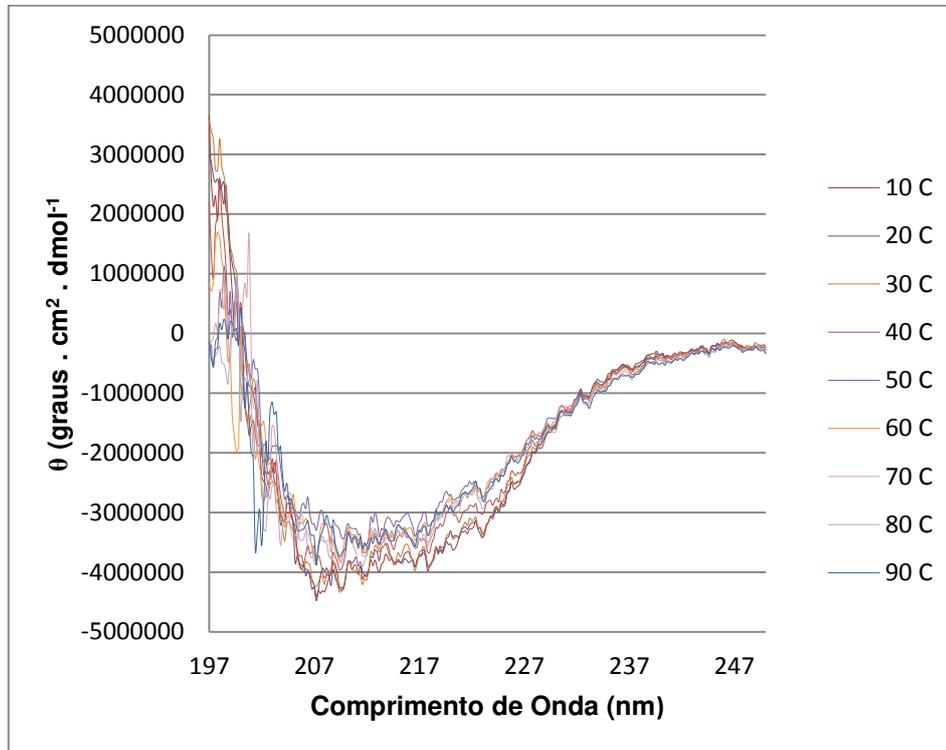


Figura 29 – Espectros de Dicroísmo Celular da proteína GraR* nas temperaturas de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 e 90 °C. Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 4 – Composição em estruturas secundárias para GraR e GraR* à 25 e à 90 °C, segundo o programa K2D

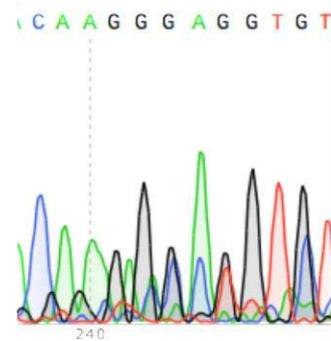
	GraR		GraR*	
	25 °C	90 °C	25 °C	90 °C
Hélice- α	38%	34%	40%	31%
Folha- β	16%	16%	16%	15%
Estruturas randômicas	46%	50%	44%	54%

Fonte: Elaborada pela autora

CAPÍTULO 6

Resultados e Discussão

Estudo Epidemiológico



6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 TESTES DE SENSIBILIDADE

Os antimicrobianos aqui testados (Tabela 5 e 6) incluem os de última geração disponíveis no mercado, com exceção da oxacilina.

Tabela 5 – Antimicrobianos testados, classe à que pertencem e local de ação

Antimicrobiano	Classe	Local de ação
Vancomicina	Glicopeptídeo	Parede celular
Teicoplanina	Glicopeptídeo	Parede celular
Daptomicina	Lipopeptídeo	Membrana celular
Quinupristina/ Dalfopristina	Estreptogramina	Síntese proteica
Linezolida	Oxazolidinona	Síntese proteica
Tigeciclina	Gliciliciclina	Síntese proteica

Fonte: Elaborada pela autora

Oxacilina foi testada para confirmação dos isolados como linhagens MRSA, fato comprovado, já que todos apresentaram CIM >256 mg/L.

Tabela 6 – Valores de referência para os antimicrobianos testados, em mg/L

ANTIMICROBIANO	S ≤	I =	R ≥	REFERÊNCIA
Oxacilina	2	-	4	CLSI 2013
Vancomicina	2	4-8	16	CLSI 2013
Teicoplanina	8	16	32	CLSI 2013
Daptomicina	1	-	-	CLSI 2013
Quinupristina/ Dalfopristina	1	2	4	CLSI 2013
Linezolida	4	-	-	CLSI 2013
Tigeciclina	0,5	-	-	FDA

Fonte: Elaborada pela autora

Houve 100% de sensibilidade dos isolados à teicoplanina e à linezolida. Níveis intermediários de resistência à quinupristina-dalfopristina foram observados em 36% dos isolados de sítios de infecção e 63,6% dos isolados de vigilância epidemiológica. Leclercq et al. (1992) descreveram a possibilidade da expressão de proteínas em estafilococos que promovem resistência à apenas uma das estreptograminas, resultando em valores de CIM na região de resistência intermediária, por exemplo, Estreptogramina A acetiltransferase ou

Estreptogramina B hidroxilase, que afetam respectivamente a sensibilidade à dalfopristina e quinupristina.⁷⁴

Embora as recomendações do CLSI para microdiluição sejam para leitura das microplacas após apenas 24 horas, em 2 isolados foi observada resistência à daptomicina emergindo depois de 48 horas. Outras amostras tiveram resultados peculiares no Etest®: as amostras SA07 e SA20 (Figura 30) apresentaram um halo de inibição não homogêneo, com 2 regiões distinguíveis, e as amostras SA47, SA48, SA11 e SA53 apresentaram microcolônias dentro do halo de inibição (Figura 31). Esses isolados foram submetidos à análise de população, cujos resultados encontram-se expostos na Figura 32, onde é possível visualizar que todos apresentaram crescimento de pelo menos 1 log 10 em concentração de daptomicina superior à seu ponto de corte para resistência (1 mg/L). Ao mesmo tempo esses isolados foram classificados como sensíveis à daptomicina através da técnica de microdiluição. Isso faz com que se encaixem na classe de hetero-resistência, segundo os critérios definidos por Hiramatsu para vancomicina⁵⁸, e podem ser chamados de h-DRSA. O surgimento de resistência à daptomicina é preocupante, já que ocorre geralmente em pacientes com infecções profundas, como osteomielite e endocardite, e poucas alternativas terapêuticas restam nesses casos. Estudos têm verificado que a resistência à daptomicina sensibiliza MRSA à oxacilina, um processo chamado de Efeito Seesaw.⁷⁵⁻⁷⁶ Ainda, há trabalhos que demonstram um fato interessante de ação sinérgica entre daptomicina e oxacilina contra MRSA, onde a co-incubação com ambas as drogas reduziria a carga líquida positiva da superfície celular, revertendo o efeito de aumento da carga positiva causado pela daptomicina, permitindo que a mesma se ligue mais facilmente à superfície celular⁷⁷, portanto, surge aí uma boa alternativa de tratamento.

Para tigeciclina foi observado 24% de resistência nos isolados provenientes de sítios de infecção e 36,4% nos isolados de vigilância epidemiológica, todos pertencentes ao ST105, sendo que dos 13 isolados ST105, apenas 3 são sensíveis à tigeciclina. Verkade et al. (2010) encontraram valores de CIM para tigeciclina em linhagens MRSA variando de 0,05 a 1,0 mg/L, com CIM₅₀ e CIM₉₀ de 0,19 e 0,38 mg/L, respectivamente.⁷⁸ Os valores encontrados nesse estudo foram maiores (Tabela 7). Já foi sugerido que a alta concentração de manganês presente no AMH pode aumentar os valores de CIM para tigeciclina determinados por Etest®, e que o AMH do fabricante Merck possui o teor de manganês muito maior que o equivalente no soro humano, enquanto dos fabricantes Oxoid e Difco não apresentaram problemas.⁷⁹ O meio de cultura utilizado neste estudo foi da marca Oxoid, portanto descartamos a possibilidade desse tipo de interferência.

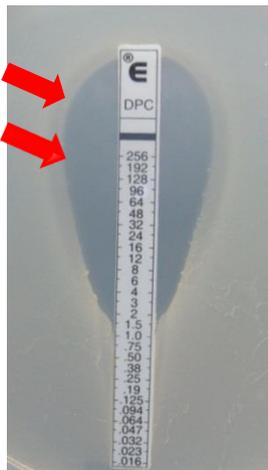


Figura 30 – Etest® Daptomicina da amostra SA20 mostrando a dupla elipse de inibição. Fonte: Elaborada pela autora.

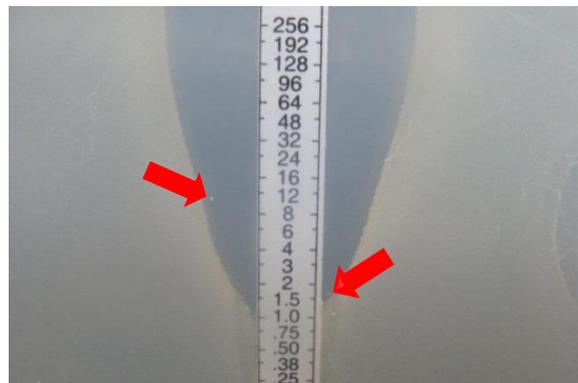


Figura 31 – Etest® Daptomicina da amostra SA11 mostrando microcolônias dentro da elipse de inibição. Fonte: Elaborada pela autora.

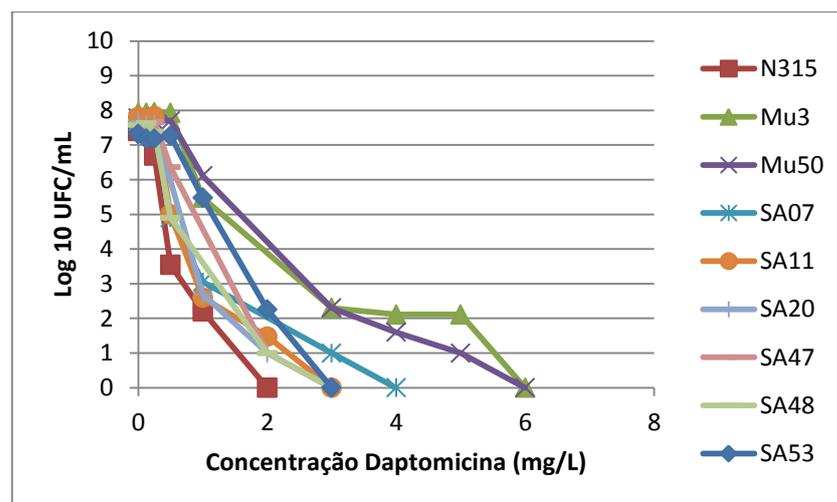


Figura 32 – Análise de população para daptomicina dos isolados de *S. aureus* SA07, SA11, SA20, SA47, SA48 e SA53 e das amostras controle de *S. aureus* N315, Mu3 e Mu50. Fonte: Elaborada pela autora.

Os mecanismos de resistência tanto à daptomicina quanto à tigeciclina ainda precisam ser elucidados. Porém, é sabido que não se deve a aquisições e que pode envolver mutações.

Camargo et al. (2008) geraram uma linhagem com sensibilidade reduzida à daptomicina in vitro e observaram que a parede celular foi alterada e que o crescimento era mais lento quando comparado à linhagem parental.⁴⁶ O papel da subunidade β da RNA polimerase (gene *rpoB*) foi demonstrado por Cui et al. (2010) com experimentos de substituição de genes.⁶⁹ O locus regulatório *ycyFGHI* também tem sido relacionado à

resistência à daptomicina,⁸⁰ bem como uma série de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs, do inglês “Single Nucleotide Polymorphisms”) no gene *mprF*.⁶⁸ Recentemente, Kaatz et al. (2006) relacionaram a resistência à daptomicina em MRSA à ausência do que parece ser uma chaperona de 81 kDa localizada na membrana celular.⁸¹ No nosso estudo, a resistência à daptomicina foi detectada somente após 48 horas de incubação. Este fato é consistente com o relato anterior mostrando que as linhagens resistentes à daptomicina poderiam ter alguma alteração levando ao crescimento lento.⁴⁶

A resistência à tigeciclina não é um evento usual, na maioria das vezes é associado a micro-organismos gram-negativos. Yang et al. encontraram uma mono-oxigenase dependente de flavina, TetX, que oxida tetraciclina a produtos inativos. O gene da TetX é encontrado nos transposons *Tn4351* e *Tn4400* de *Bacteroides fragilis*, ironicamente um organismo anaeróbio; mas quando o gene foi transferido para *E. coli*, um aeróbio, a resistência emergiu.⁸² Dean et al. (2003) reportaram resistência à tigeciclina em *Pseudomonas aeruginosa* e propuseram ser devido a uma bomba de efluxo da família RND, Mex-OprM.⁸³ O primeiro relato de resistência à tigeciclina em MRSA foi um caso induzido no trabalho de McAleese et al. (2005) depois de conhecer a capacidade de *S. aureus* desenvolver sensibilidade reduzida à tigeciclina quando cultivado sob pressão seletiva.⁸⁴ Eles submeteram as linhagens de *S. aureus* N315 e Mu3 a passagens em concentrações crescentes da droga, e após 16 passagens, isolou-se resistentes. A expressão gênica dos isolados resistentes foi verificada e encontraram uma expressão 100 vezes maior no grupo de genes *mepRAB*, que contém uma bomba de efluxo da família MATE. Superexpressão de *mepA* mostrou sua participação no mecanismo de resistência, já que diminuiu a sensibilidade à tigeciclina na linhagem selvagem - embora não tenha sido suficiente para conferir altos níveis de resistência.³¹

Outros casos foram reportados recentemente. Um estudo avaliou a atividade de tigeciclina contra 217 isolados de MRSA da América Latina, e mais de 99,9% foram inibidos por $\leq 0,5$ mg/L da droga.⁸⁵ Em Trípoli, na Líbia, 4,2% dos MRSA isolados de feridas de pacientes queimados entre 2009 e 2010 eram resistentes à tigeciclina.⁸⁶ Numa análise de VISA e *S. aureus* resistentes à vancomicina (VRSA, do inglês Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*), mais de 90% de ambos os grupos de isolados era sensível à tigeciclina.⁸⁷ Em um programa de vigilância da região Ásia-Pacífico que seguiu a introdução de tigeciclina no uso clínico por 7 anos, houve 100% de sensibilidade dos *S. aureus*, exceto no ano de 2006, quando 4 isolados (1%) não eram sensíveis.⁸⁸ Entretanto, nenhum desses estudos caracterizou as linhagens ou o mecanismo de resistência envolvido.

Capítulo 6 – Resultados e Discussão – *Estudo Epidemiológico*

Tabela 7– CIM segundo o método das fitas de Etest® (mg/L)

AMOSTRA	OXACILINA	DAPTOMICINA	TIGECICLINA	TEICOPLANINA	LINEZOLIDA	QUINUPRISTINA/ DALFOPRISTINA
SA01	> 256	0,25	0,75	1,5	0,75	1,5
SA02	> 256	0,50	0,19	3,0	0,75	1,0
SA15	> 256	0,50	0,125	3,0	0,75	1,5
SA16	> 256	0,50	0,19	3,0	0,75	1,5
SA17	> 256	1,0	0,125	2,0	0,5	0,75
SA23	> 256	0,50	0,094	1,0	0,38	1,0
SA24	> 256	0,75	0,19	2,0	0,75	1,5
SA33	> 256	0,50	1,0	3,0	0,75	1,5
SA34	> 256	1,5	0,125	2,0	0,75	0,5
SA35	> 256	0,50	1,0	2,0	1,0	1,0
SA36	> 256	0,38	1,0	2,0	1,0	0,75
SA41	> 256	0,75	0,25	3,0	1,0	1,0
SA42	> 256	0,50	0,38	4,0	0,75	1,5
SA43	> 256	1,0	0,125	4,0	0,75	1,5
SA47	> 256	1,5*	0,25*	6,0*	0,75*	1,5*
SA48	> 256	1,5*	0,19*	6,0*	0,75*	1,0*
SA67	> 256	0,25	0,5	1,5	1,0	1,0
SA69	> 256	1,0	0,19	3,0	0,75	1,0
SA70	> 256	0,50	1,0	2,0*	1,0	1,0*
SA72	> 256	1,0	0,19	3,0*	0,75	1,0
SA73	> 256	0,75	0,25	2,0	0,75	0,38
SA82	> 256	0,38	1,0	3,0	1,0	1,5
SA83	> 256	0,75	0,25	2,0*	0,75	1,0
SA100	> 256	0,50	0,19	3,0	1,0	1,0
SA113	> 256	1,0	0,125	1,5	0,75	0,75
SA07	> 256	1,5 H	1,5	2,0	1,0	1,5
SA11	> 256	2,0*	0,19	3,0	0,75	1,5
SA20	> 256	1,5 H	0,5	2,0	1,5	1,0
SA21	> 256	1,0	0,19	2,0	1,0	1,5
SA31	> 256	0,75 H	1,5	2,0	1,5	1,0
SA38	> 256	0,75	0,19	2,0	0,75	2,0
SA46	> 256	0,75	0,25	2,0	0,75	1,5
SA53	> 256	1,5*	0,25	3,0	0,75	1,5
SA56	> 256	0,38	0,75	2,0	1,0	1,0
SA63	> 256	0,75	0,125	3,0	0,75	1,5
SA64	> 256	1,0	0,75	0,38	1,5	1,0

* com colônias dentro da elipse de inibição; H – presença de halo duplo

Fonte: Elaborada pela autora

Para vancomicina, segundo o método das fitas de Etest®, 19,4% das amostras apresentaram resistência intermediária, com microcolônias dentro do halo de inibição (Figura 33) chegando a 3 mg/L da droga, enquanto segundo os métodos de diluição em ágar (Figura 34) e microdiluição houve 94,5 e 100% de sensibilidade (Tabela 8), porém o intervalo testado nessas 2 últimas técnicas exclui 3 mg/L, passando de 2 diretamente para 4 mg/L. Esse tipo de problema envolvendo o aumento da CIM devido ao método utilizado, no caso de Etest®, já foi reportado por outros autores,⁸⁹ e atenção deve ser dada principalmente em casos em que o valor em questão é limítrofe para a classificação. Assim, realizou-se triagem para h-VISA em todos os isolados, e SA42 e SA43 apresentaram crescimento nesse ensaio. Tais isolados foram

submetidos à análise de população (Figura 35), e a área sob a curva calculada para ambos (15,97 e 12,75; respectivamente) foi muito inferior à da linhagem h-VISA Mu3 (20,95). A razão das áreas sob a curva para ambos foi menor que 0,9 (0,8 para SA42 e 0,6 para SA43), e ainda não houve crescimento acima de 1 log₁₀ na concentração de 4 mg/L de vancomicina, portanto nenhum isolado deste estudo era h-VISA.

Quando comparado a outros estudos, foi possível notar importantes diferenças nos valores de CIM₉₀ (Tabela 9). Enquanto em vários estudos a CIM₉₀ para tigeciclina foi 0,5 mg/L,⁹⁰⁻⁹¹ para daptomicina 0,5 mg/L^{90,92-93} e para vancomicina 1 mg/L,^{90,92-93} nosso estudo mostrou valores de CIM₉₀ mais elevados, 1, 2 e 2 mg/L, respectivamente. Somente para linezolida o oposto ocorreu, quando para a maioria a CIM₉₀ foi 2,^{90,92-93} nosso estudo encontrou 1 mg/L.

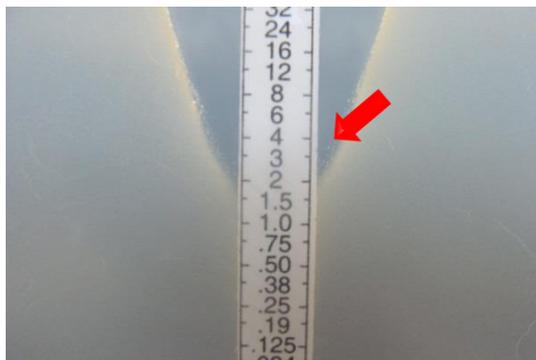


Figura 33 – Etest® Vancomicina da amostra SA16 mostrando a presença de microcolônias até a concentração de 3 mg/L da droga. Fonte: Elaborada pela autora.

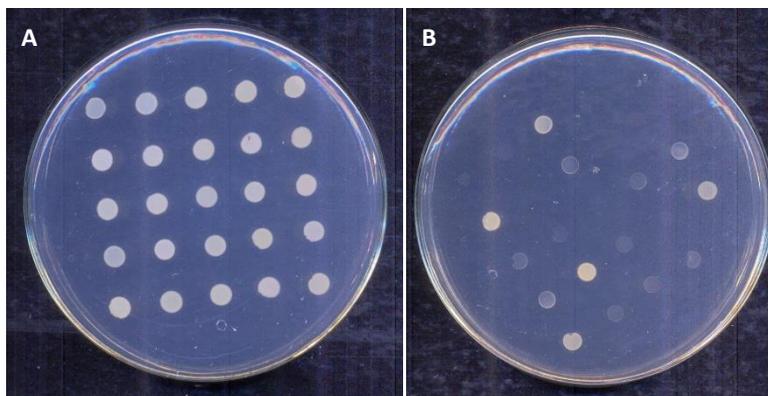


Figura 34 – Diluição em Ágar. A - Placa controle, sem adição da droga, mostrando crescimento das 25 amostras de sítios de infecção; B - Placa mostrando o crescimento de apenas algumas amostras na concentração de 1,0 mg/L de vancomicina. Fonte: Elaborada pela autora.

Capítulo 6 – Resultados e Discussão – Estudo Epidemiológico

Tabela 8 – CIM para vancomicina, tigeciclina e daptomicina (mg/L)

ISOLADO	VANCOMICINA			TIGECICLINA		DAPTOMICINA	
	Microdiluição	Diluição em Ágar	Etest®	Microdiluição	Etest®	Microdiluição	Etest®
SA01	1,0	2,0	2,0	1,0	0,75	1,0	0,25
SA02	1,0	2,0	2,0	-	0,19	1,0	0,5
SA15	2,0	2,0	3,0	-	0,125	1,0	0,5
SA16	2,0	2,0	3,0*	-	0,19	1,0	0,5
SA17	1,0	2,0	1,5	-	0,125	1,0	1,0
SA23	0,5	1,0	1,5	-	0,094	1,0	0,5
SA24	2,0	2,0	3,0*	-	0,19	1,0	0,75
SA33	2,0	2,0	1,5	1,0	1,0	0,5	0,5
SA34	2,0	1,0	3,0*	-	0,125	0,5	1,5 H
SA35	2,0	2,0	2,0	1,0	1	0,5	0,5
SA36	2,0	2,0	1,5	1,0	1	1,0	0,38
SA41	1,0	2,0	2,0	-	0,25	1,0	0,75
SA42	2,0	2,0	2,0	-	0,38	2,0**	0,5
SA43	2,0	1,0	2,0	-	0,125	1,0	1,0
SA47	2,0	2,0	3,0*	-	0,25*	1,0	1,5*
SA48	2,0	2,0	3,0*	-	0,19*	1,0	1,5*
SA67	1,0	1,0	2,0	-	0,5	1,0	0,25
SA69	2,0	2,0	3,0*	-	0,19	2,0**	1,0
SA70	2,0	1,0	3,0*	1,0	1	0,5	0,5
SA72	2,0	1,0	1,5	-	0,19	1,0	1,0
SA73	1,0	2,0	2,0	-	0,25	0,5	0,75
SA82	2,0	1,0	2,0	1,0	1	0,5	0,38
SA83	1,0	1,0	1,5	-	0,25	0,5	0,75
SA100	2,0	2,0	2,0	-	0,19	1,0	0,5
SA113	2,0	1,0	1,0	-	0,125	1,0	1,0
SA07	2,0	2,0	2,0	1,0	1,5	1,0	1,5 H
SA11	2,0	4,0**	3,0*	-	0,19	1,0	2,0*
SA20	2,0	2,0	1,5	-	0,5	0,5	1,5 H
SA21	2,0	2,0	3,0*	-	0,19	1,0	1
SA31	2,0	2,0	2,0	1,0	1,5	1,0	0,75 H
SA38	2,0	2,0	2,0	-	0,19	1,0	0,75
SA46	2,0	2,0	2,0	-	0,25	1,0	0,75
SA53	2,0	4,0**	2,0	-	0,25	1,0	1,5*
SA56	1,0	2,0	2,0	1,0	0,75	0,5	0,38
SA63	2,0	2,0	2,0	-	0,125	1,0	0,75
SA64	1,0	2,0	1,5	1,0	0,75	1,0	1,0

*Presença de Microcolônias; **Leitura após 48h; H- Presença de halo duplo.

Fonte: Elaborada pela autora

Teicoplanina e linezolida mostraram as melhores atividades antimicrobianas, já que seus valores de CIM₉₀ foram distantes de seus pontos de corte para resistência (8 e 4 mg/L, respectivamente).³²

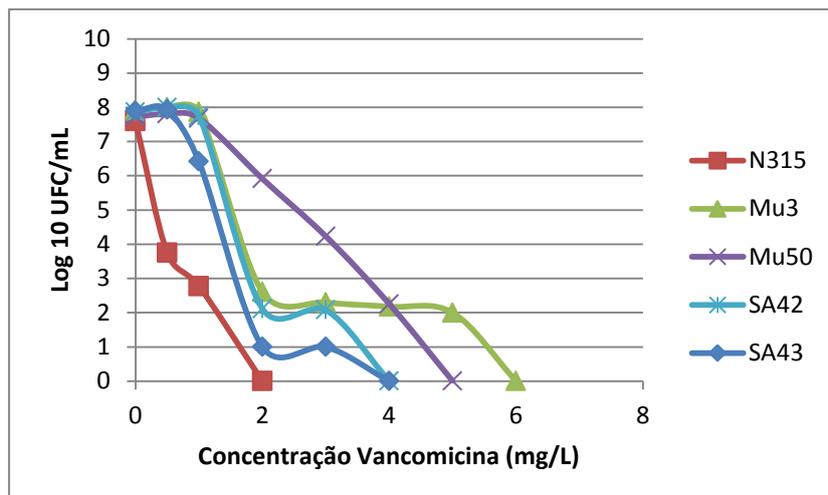


Figura 35 – Análise de população para vancomicina dos isolados de *S. aureus* SA42 e SA43 e das amostras controle de *S. aureus* N315, Mu3 e Mu50. Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 9 – Visualização geral da sensibilidade das amostras aos antimicrobianos testados

ANTIMICROBIANO	Intervalo CIM (mg/L)	GERAL (n=36)		VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA (n=11)			SÍTIOS DE INFECÇÃO (n=25)		
		CIM ₅₀ (mg/L)	CIM ₉₀ (mg/L)	Intervalo CIM (mg/L)	CIM ₅₀ (mg/L)	CIM ₉₀ (mg/L)	Intervalo CIM (mg/L)	CIM ₅₀ (mg/L)	CIM ₉₀ (mg/L)
<i>Daptomicina</i> *	0,5-2	1	1	0,5-1	1	1	0,5-2	1	1
<i>Linezolid</i> †	0,5-2	1	1	1-2	1	2	0,5-1	1	1
<i>Oxacillina</i> †	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256
<i>Quinupristina/Dalfopristina</i> †	0,5-2	1	2	1-2	2	2	0,5-2	1	2
<i>Teicoplanina</i> †	0,5-8	2	4	0,5-4	2	4	1-8	4	4
<i>Tigeciclina</i> *	0,125-2	0,25	1	0,125-2	0,25	2	0,125-1	0,25	1
<i>Vancomicina</i> *	0,5-2	2	2	1-2	2	2	0,5-2	2	2

* – Determinado por microdiluição; † – Determinado por Etest®

Fonte: Elaborada pela autora

6.2 DETECÇÃO DA PRESENÇA DO GENE *mecA*

O gene *mecA* é parte integrante do elemento genético móvel *SCCmec* e codifica a expressão da proteína PBP2a, que confere resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos às linhagens que o expressam.

Somente a presença deste gene não é garantia que a linhagem de *S. aureus* será resistente à meticilina, já que o gene *mecI*, também parte integrante do elemento *SCCmec*,

pode estar ativo, inibindo a expressão do produto do gene *mecA*. A sua ausência também não garante que a amostra seja sensível à meticilina, pois ela pode carregar o gene *mecC*, que tem apenas 69% de identidade em nucleotídeos ao *mecA*. Porém, somado aos dados provenientes do hospital, essa é uma forma rápida de confirmação de estarmos trabalhando com linhagens MRSA.

Todas as amostras estudadas apresentaram o gene *mecA*, como demonstrado na Figura 36.

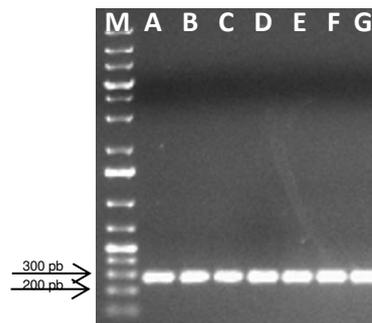


Figura 36 – Gel de agarose 1% mostrando produto da amplificação do gene *mecA* equivalente a 286 pb de alguns isolados. M - Marcador de Massa Molecular GeneRuler 1 kb Plus (Fermentas); A - SA01; B - SA02; C - SA15; D - SA16; E - SA17; F - SA23; G - SA24; H - SA33. Fonte: Elaborada pela autora.

6.3 TIPAGEM MOLECULAR

Existem hoje depositadas no banco de dados internacional o MLST de 163 linhagens brasileiras (busca realizada em 19 de novembro de 2013). Dessas, 21% são ST5, 9% são ST105, 2% ST239 e 2% ST97.

Porém, o que encontramos na literatura no que diz respeito à situação brasileira é um pouco diferente, citando a prevalência do Clone Brasileiro Endêmico, BEC (do inglês “Brazilian Endemic Clone”), um ST239 que pertence ao CC8. De fato, o ST239 é o mais encontrado ao redor do mundo.⁹⁴

Os nossos resultados mostraram um cenário semelhante ao banco de dados (Tabelas 10 e 11). O que encontramos foi uma prevalência absoluta de linhagens pertencentes ao CC5

(88,9%), sendo 52,8% ST5 e 36,1% ST105, este último sendo um variante de locus único (SLV, do inglês “Single Locus Variant”) do ST5 onde apenas o gene *yqiL* difere.

Encontramos ainda que todas as amostras de colonização dos pacientes que vieram a apresentar infecção exibem um perfil alélico idêntico às suas respectivas amostras de sítios de infecção, mostrando possivelmente tratar-se da mesma linhagem residente que na maioria das vezes encontrou condições para invadir o hospedeiro.

Tabela 10 – Perfil Alélico e Tipo de Sequência (ST) das amostras provenientes de sítios de infecção

Amostra (Infecção)	Perfil de alelos	ST
SA01	1.4.1.4.12.1.28	105
SA02	1.4.1.4.12.1.10	5
SA15	1.4.1.4.12.1.10	5
SA16	1.4.1.4.12.1.10	5
SA17	2.3.1.1.4.4.3	239
SA23	1.4.1.4.12.1.10	5
SA24	1.4.1.4.12.1.10	5
SA33	1.4.1.4.12.1.28	105
SA34	3.1.1.1.1.5.3	97
SA35	1.4.1.4.12.1.28	105
SA36	1.4.1.4.12.1.28	105
SA41	1.4.1.4.12.1.10	5
SA42	1.4.1.4.12.1.10	5
SA43	1.4.1.4.12.1.10	5
SA47	1.4.1.4.12.1.10	5
SA48	1.4.1.4.12.1.10	5
SA67	1.4.1.4.12.1.28	105
SA69	1.4.1.4.12.1.10	5
SA70	1.4.1.4.12.1.28	105
SA72	2.3.1.1.4.4.3	239
SA73	1.4.1.4.12.1.10	5
SA82	1.4.1.4.12.1.28	105
SA83	1.4.1.4.12.1.28	105
SA100	1.4.1.4.12.1.10	5
SA113	2.3.1.1.4.4.3	239

Fonte: Elaborada pela autora

Quando analisamos por este lado individualizado, paciente por paciente, encontramos que dos 20 pacientes, 11 (55%) apresentam MRSA ST5 e 5 (25%) apresentaram MRSA ST105. Ou seja, dos pacientes infectados com MRSA no Hospital Risoleta Tolentino Neves no período de junho a dezembro de 2009, 80% estavam infectados com linhagens do CC5, o que caracteriza a prevalência absoluta deste Complexo Clonal.

PFGE separou os isolados em 8 pulsotipos diferentes, de A até H (Figura 37).

Análise de MLST e tipagem do elemento *SCC_{mec}* do pulsotipo A e seus subtipos, equivalente a 58,3% dos isolados, indicou que todos pertenciam ao CC5 (ST5 e ST105) e

Capítulo 6 – Resultados e Discussão – Estudo Epidemiológico

continham *SCCmecII*. O mesmo foi encontrado para os pulsotipos B e C. Os pulsotipos D e E continham apenas linhagens do CC5, mas tipos de *SCCmec* variados.

Ao considerar apenas isolados de sítios de infecção, observou-se a prevalência do CC5, 54% pertencendo ao ST5 e 29% ao ST105.

Tabela 11 – Perfil Alélico e Tipo de Sequência (ST) das amostras provenientes de colonização

Amostra (Vigilância)	Amostra de Infecção à qual se relaciona	Perfil de alelos	ST
SA07	SA35	1.4.1.4.12.1.28	105
SA11	SA16	1.4.1.4.12.1.10	5
SA20	SA35	1.4.1.4.12.1.28	105
SA21	SA15	1.4.1.4.12.1.10	5
SA31	SA35	1.4.1.4.12.1.28	105
SA38	SA41 e SA43	1.4.1.4.12.1.10	5
SA46	SA41 e SA43	1.4.1.4.12.1.10	5
SA53	SA42	1.4.1.4.12.1.10	5
SA56	SA67 e SA70	1.4.1.4.12.1.28	105
SA63	SA69	1.4.1.4.12.1.10	5
SA64	SA67 e SA70	1.4.1.4.12.1.28	105

Fonte: Elaborada pela autora

Resistência à tigeiciclina foi encontrada em 10 isolados, somente em linhagens ST105-*SCCmecII*, em 3 pulsotipos. Esses isolados eram de 5 pacientes diferentes, 2 dos quais foram colonizados por linhagens do mesmo pulsotipo da linhagem que veio a causar infecção.

Quatro isolados pertenciam a outros CCs, três ST239 e um ST97, que é frequentemente associado à casos de mastite bovina.⁹⁵ Todos os isolados ST239 carregavam *SCCmecIII*, sendo relacionados ao BEC. Onze dos 13 isolados ST5 carregavam *SCCmecII*, como o clone Nova Iorque/Japão, um carregava *SCCmecI* como o clone Cordobês/Chileno, e 1 carregava *SCCmecIV* como o clone Pediátrico.

Cinco isolados (um de vigilância e quatro de infecção) com *SCCmecII* apresentaram *ccrA4B4* adicional, o qual confirmou-se⁶⁵ estar localizado fora do elemento *SCCmec*.

Como esperado para estes STs e tipos de *SCCmec*, nenhum dos isolados continha os genes codificando PVL.

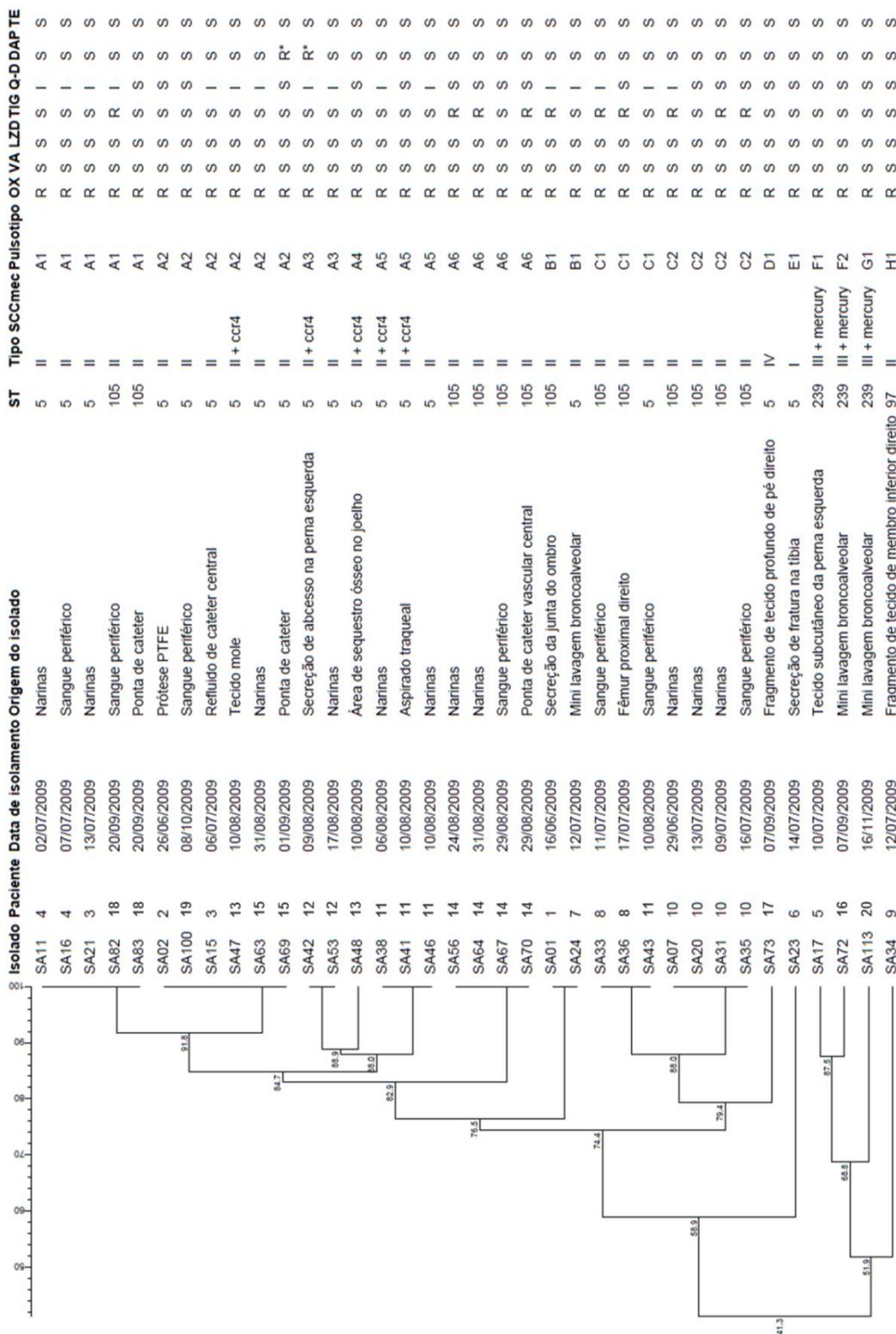


Figura 37 – Dendrograma dos padrões de PFGE e informações dos isolados. ST – Tipo de Sequência; OX – Oxacilina; VA – Vancomicina; LZD – Linezolida; TIG – Tigeciclina; Q-D – Quinupristina-Dalfopristina; DAP – Daptomicina; TE – Teicoplanina; R – Resistente; I – Nível intermediário de resistência; S – sensível; R* - Resistente após 48 horas; + ccr4 – presença de recombinase 4 externa ao SCCmec; + mercury – presença de SCCmec. Fonte: Elaborada pela autora.

6.3.1 Fusão dos principais Complexos Clonais de *S. aureus*

Era de se esperar que as linhagens patogênicas de *S. aureus* estariam um dia conectadas por eBURST. Após a introdução da linhagem A08151 na base de dados de MLST (<http://saureus.mlst.net/>) em 21/08/2013, CC1, CC5, CC8, CC15 e CC97 agora formam o maior grupo de linhagens de *S. aureus* compreendendo 911 STs diferentes (Figura 38).

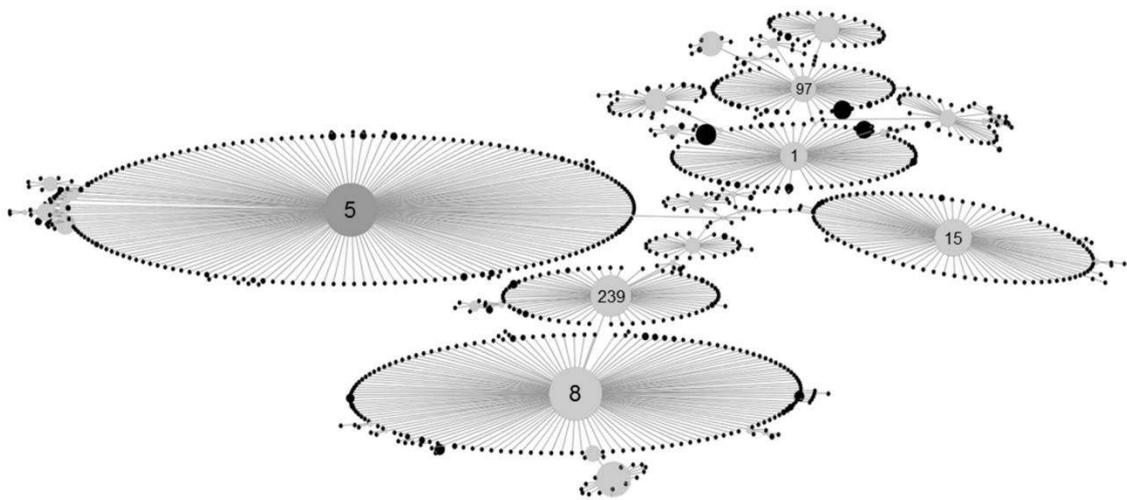


Figura 38 – Representação gráfica produzida com o programa eBURST v3 na base de dados de *S. aureus*. Os principais Complexos Clonais que foram conectados estão nomeados. Fonte: Elaborada pela autora.

A convergência destas linhagens começou a ocorrer após a introdução da linhagem BJ0192 na base de dados, um MRSA ST2139 de Pequim, China isolado em 2009 de uma mulher saudável. Esta linhagem ligou o CC1 ao CC97. A segunda conexão aconteceu entre CC1/97 e CC15, através da linhagem 12-18207 isolada em 2012 na Austrália, um MRSA ST2605. A última e maior conexão foi feita após a adição da linhagem A08151, um VISA isolado em 2012 em Iowa, Estados Unidos de uma ferida no calcanhar de uma mulher de 91 anos. Esta linhagem conectou CC1/97/15 ao CC8 e CC5 (Figura 39).

Como observado nos nossos resultados, nós reportamos a ocorrência dos clones ST5-SCC*mecII* e ST105-SCC*mecII*, ambos CC5, como prevalentes no Hospital Risoleta Tolentino Neves em 2009. Esses clones parecem ter substituído BEC (ST239-SCC*mecIII*), uma

linhagem do CC8 frequentemente isolada no país. Ironicamente todas pertencem agora ao mesmo CC.

A conexão desses CC levanta a questão de qual seria o melhor modo de discriminar os isolados de *S. aureus*. Talvez num futuro próximo chegue o momento de colocar em prática os benefícios da era da genômica e comparar o genoma fixo como um todo ao invés de apenas sete loci, mas enquanto isso não está facilmente disponível a todos os centros de pesquisa, deve-se pensar numa mudança do esquema de MLST para que as linhagens possam ser separadas em seus respectivos Complexos Clonais.

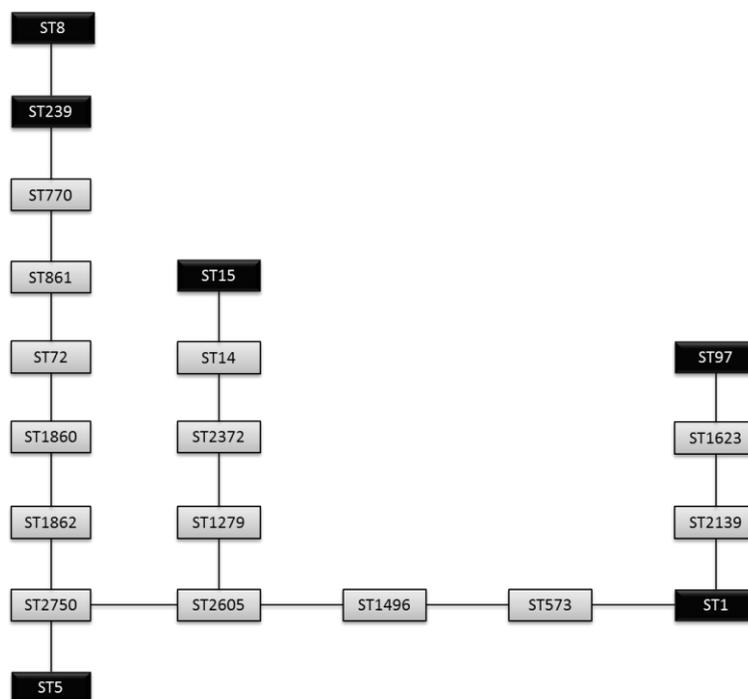


Figura 39 – Representação da relação entre os STs encontrados nesse estudo (ST5, ST105, ST97 e ST239). Cada linha representa uma variação em um loco dos 7 necessários para determinação do ST. Fonte: Elaborada pela autora.

6.3.2 Sequenciamento de genes relacionados à resistência à daptomicina e à vancomicina em MRSA

Os genes envolvidos na resistência à vancomicina e à daptomicina selecionados tiveram suas sequências comparadas às da linhagem de *S. aureus* N315, usada aqui como referência, além de outras.

O gene *graR* dos isolados do CC5 eram idênticos ao da linhagem N315 (Tabela 12), e os do CC8 e CC97 eram idênticos ao de outras linhagens do CC8, como *S. aureus* TW20, JKD6008 e USA300, porém nenhuma apresentou a mutação encontrada na linhagem Mu50 que acredita-se ocasionar resistência à vancomicina³⁵, o que é coerente com o fato de nenhum dos isolados ser resistente à vancomicina.

Tabela 12 – Mutações encontradas no gene *graR* dos isolados que tiveram o mesmo sequenciado

Isolado	Posição da mutação no gene	Mutação*	Consequência da mutação
	303	T → G	Silenciosa
	441	C → T	Silenciosa
SA17, SA72, SA113 e SA34	442	G → C	Códon GAT → CAG: Asp → Gln
	444	T → G	Códon GAT → CAG: Asp → Gln
	453	T → C	Silenciosa
	456	A → G	Silenciosa

* Quando comparado ao gene da linhagem N315; A – adenina; T – timina; G – guanina; C – citosina; Asp – Ácido Aspártico; Gln – Glutamina

Fonte: Elaborada pela autora

Resultados semelhantes foram encontrados para o gene *vraR* (Tabela 13), com os isolados do CC5 e CC97 sendo idênticos à *S. aureus* N315, Mu3 e Mu5, outras linhagens pertencentes ao CC5, e as do CC8 idênticas à outras linhagens do CC8, *S. aureus* JKD6008, TW20 e COL, inclusive, na única mutação encontrada nos isolados do CC8 quando comparados aos do CC5 que não é silenciosa, houve troca de um aminoácido carregado negativamente para outro (glutamato para aspartato), mantendo as características da proteína.

O gene *graS* foi o que mais apresentou mutações, muitas delas silenciosas, mas algumas despertaram interesse (Tabela 14). Em uma delas houve mudança de aminoácido Leucina para Fenilalanina; ambos são apolares, porém o segundo é muito mais volumoso. A troca de Isoleucina para Leucina é a menos radical. Quando a mudança ocorre de Treonina

para Isoleucina, muda-se o caráter do aminoácido de polar neutro para apolar. Todas essas trocas são características das linhagens do CC8, como *S. aureus* COL, e não afetam o perfil de sensibilidade à vancomicina. Na última delas, que ocorreu apenas no isolado SA69, houve troca de Histidina por Tirosina, ambos aminoácidos polares, porém o primeiro básico e o segundo neutro; essa mutação não foi encontrada em nenhuma linhagem quando realizou-se busca com Blast.

Tabela 13 – Mutações encontradas no gene *vraR* dos isolados que tiveram o mesmo sequenciado

Isolado	Posição da mutação no gene	Mutação*	Consequência da mutação
SA17, SA72, SA113	177	T → A	Códon GAA → GAT: Glu → Asp
	597	T → C	Silenciosa
SA34	114	G → A	Silenciosa

* Quando comparado ao gene da linhagem N315; A – adenina; T – timina; G – guanina; C – citosina; Asp – Ácido Aspártico; Glu – Ácido Glutâmico
Fonte: Elaborada pela autora

Tabela 14 – Mutações encontradas no gene *graS* dos isolados que tiveram o mesmo sequenciado

Isolado	Posição da mutação no gene	Mutação*	Consequência da mutação
SA17, SA72, SA113	78	G → C	Códon TTG → TTC: Leu → Phe
	175	A → T	Códon ATA → TTA: Ile → Leu
	345	A → G	Silenciosa
	411	C → T	Silenciosa
	456	G → A	Silenciosa
	495	G → A	Silenciosa
	534	C → T	Silenciosa
SA17, SA72, SA113 e SA34	699	G → A	Silenciosa
	671	C → T	Códon ACA → ATA: Thr → Ile
SA34	582	T → C	Silenciosa
SA34	681	T → C	Silenciosa
	931	C → T	Códon CAC → TAC: His → Tyr
SA69	931	C → T	Códon CAC → TAC: His → Tyr
SA16, SA42, SA43 e SA69	198	A → G	Silenciosa

* Quando comparado ao gene da linhagem N315; A – adenina; T – timina; G – guanina; C – citosina; Leu – Leucina; Phe – Fenilalanina; Ile – Isoleucina; Thr – Treonina; His – Histidina; Tyr – Tirosina
Fonte: Elaborada pela autora

Capítulo 6 – Resultados e Discussão – *Estudo Epidemiológico*

Todas as mutações encontradas no gene *vraS* (Tabela 15), quando comparado à linhagem *S. aureus* N315, ocorreram nas linhagens de outros complexos clonais, que não o CC5, como esperado. Além disso, todas essas mutações são silenciosas.

Tabela 15 – Mutações encontradas no gene *vraS* dos isolados que tiveram o mesmo sequenciado

Isolado	Posição da mutação no gene	Mutação*	Consequência da mutação
SA17, SA72, SA113	69	A → G	Silenciosa
	144	C → T	Silenciosa
	204	A → T	Silenciosa
	456	T → A	Silenciosa
	510	T → A	Silenciosa
	561	G → T	Silenciosa
	381	C → T	Silenciosa
SA34	699	A → G	Silenciosa
	870	T → C	Silenciosa

* Quando comparado ao gene da linhagem N315; A – adenina; T – timina; G – guanina; C – citosina
 Fonte: Elaborada pela autora

Quanto ao gene envolvido na resistência à daptomicina *mprF* (Tabela 16), todos os isolados do CC5 eram idênticos às linhagens do CC5, *S. aureus* N315, Mu50 e ED98. As demais, sejam elas CC8 ou CC97 apresentaram diversas mutações, mas a maioria silenciosa, exceto uma, em que houve troca de glutamina para glutamato, mudando então a carga do aminoácido. Porém essa mutação também ocorreu em outras linhagens do CC8 (*S. aureus* USA300, TW20 e COL) e não está relacionada à resistência à daptomicina.

Finalmente, o outro gene envolvido na resistência à daptomicina que somente foi sequenciado nos isolados que desenvolveram resistência a este antimicrobiano após 48 horas é *rpoB* (Tabela 17). Ao se comparar à linhagem N315 foram encontradas 2 mutações, das quais 1 ocorreu apenas em SA42 e a outra ocorreu tanto em SA42 quanto em SA69, e ambas não são silenciosas. Na que é exclusiva da linhagem SA42 há troca do aminoácido leucina para serina, e na outra de histidina para asparagina. Nenhuma sequência idêntica às dos isolados foi encontrada utilizando o algoritmo Blast.

Tabela 16 – Mutações encontradas no gene *mprF* dos isolados que tiveram o mesmo sequenciado

Isolado	Posição da mutação no gene	Mutação*	Consequência da mutação
SA17, SA72, SA113 e SA34	1944	C → T	Silenciosa
	1968	A → G	Silenciosa
	2013	G → A	Silenciosa
	2070	G → T	Silenciosa
	2148	C → T	Silenciosa
	2238	A → T	Silenciosa
	2239	T → C	Silenciosa
	2250	C → T	Silenciosa
SA17, SA72, SA113	2074	C → G	Códon CAA → GAA: Gln → Glu
SA34	1044	C → T	Silenciosa

* Quando comparado ao gene da linhagem N315; A – adenina; T – timina; G – guanina; C – citosina; Gln – Glutamina; Glu – Ácido Glutâmico

Fonte: Elaborada pela autora

Tabela 17 – Mutações encontradas no gene *rpoB* dos isolados que tiveram o mesmo sequenciado

Isolado	Posição da mutação no gene	Mutação*	Consequência da mutação
SA42 e SA69	1141	C → A	Códon CAT → AAT: His → Asn
SA42	1463	T → C	Códon TTA → TCA: Leu → Ser

* Quando comparado ao gene da linhagem N315; A – adenina; T – timina; G – guanina; C – citosina; His – Histidina; Asn – Asparagina; Leu – Leucina; Ser – Serina

Fonte: Elaborada pela autora

6.4 SEQUENCIAMENTO DO GENOMA DE *S. aureus* SA16

O rascunho do genoma consistiu de 2.961.555 pb distribuídos em 74 contigs e com um conteúdo de GC de 32,9%. Quando comparado ao genoma de referência *S. aureus* N315, verificou-se que 99% do genoma é compartilhado pelas duas linhagens.

Análise da sequência permitiu a classificação da linhagem como *agr* tipo II, *cap* tipo 5 e *spa* tipo t539. Foram encontrados os fatores de virulência tipicamente associados com linhagens do CC5.⁹⁶⁻¹¹⁰ SA16 também contém os genes *msrA*, *msrB*, *ermA* e *ermC*, todos relacionados com resistência à estreptograminas do tipo B.¹¹¹ Esse fato pode explicar o nível intermediário de resistência à quinupristina-dalfopristina. *ermC* provavelmente está localizado em um plasmídeo, já que estava presente em um “contig” que não pareiou com o genoma de

Capítulo 6 – Resultados e Discussão – *Estudo Epidemiológico*

S. aureus N315, mas alinhou com vários plasmídeos. SA16 também apresentou dois fagos intactos, ϕ MR25 e ϕ N315, este último sendo comum ao genoma de *S. aureus* N315.

O sequenciamento do genoma de *S. aureus* SA16 foi o primeiro rascunho de genoma de uma linhagem representativa do CC5 do Brasil. Apesar de ser um clone que apareceu apenas recentemente no Brasil, há grandes possibilidades de ser um clone bem sucedido, pois como vem sendo discutido, a resistência à fluoroquinolonas é um ótimo candidato à marcador para clones HA-MRSA de sucesso, e SA16, apresenta resistência à ciprofloxacina, uma fluoroquinolona. Os clones mais importantes de HA-MRSA, CC22, CC30, CC5, ST239 e CC45 são resistentes à essa classe de antimicrobianos. Observou-se em certo hospital que somente os clones de sucesso, e não os esporádicos, eram resistentes à fluoroquinolonas. Ainda como um ponto a seu favor, essa resistência, que é causada por mutações pontuais em genes codificando topoisomerasas, pode ser transferida horizontalmente através de transdução generalizada, apesar de não ser codificada em elementos genéticos móveis.¹¹²

O projeto foi depositado no DDBJ/EMBL/GenBank sob o número de acesso ASZO00000000, e a versão descrita no presente documento é ASZO01000000.

CAPÍTULO 7

Conclusão



7 CONCLUSÃO

No estudo estrutural, com a clonagem em vetor pSMT3 foi possível aumentar o rendimento da expressão tanto de GraR quanto de GraR* e otimizar a clivagem de suas caudas de histidina, quando comparadas às construções anteriores em pET28a. A maior quantidade de proteína produzida facilitou a realização de experimentos posteriores, principalmente ensaios de cristalização que demandam de elevada concentração proteica.

Porém, não foi obtido nenhum cristal a partir das proteínas produzidas com as novas construções, portanto futuramente novos experimentos deverão ser colocados em prática, como por exemplo o “Differential Scanning Fluorimetry”, que possibilita encontrar um tampão em que as proteínas fiquem mais estáveis, e assim tentar novas condições para cristalização, ou ainda tentativas de fosforilação das proteínas à fim de atingir a forma dimérica mais estável.

Os experimentos de Dicroísmo Circular mostraram que ambas as proteínas em estudo estavam bem enoveladas à temperatura ambiente. Nas construções em pET28a houve uma pequena variação no espectro a partir de 40 °C, mas quando se trata das construções em pSMT3, os espectros de 20 a 90 °C estavam praticamente sobrepostos, mostrando uma ótima estabilidade térmica das proteínas.

Já o estudo epidemiológico dos isolados deste hospital brasileiro revelou a presença endêmica de uma linhagem MRSA ST5-SCC*mecII* e seu SLV ST105-SCC*mecII*. Dentre elas, sensibilidade reduzida à daptomicina e à tigeciclina foi detectada, mesmo este último antimicrobiano só tendo seu uso iniciado neste hospital em 2011. Embora outros estudos de sensibilidade ao redor do mundo tenham descrito este tipo de resistência¹⁰²⁻¹⁰⁵, ao nosso conhecimento este é o primeiro relato de caracterização molecular das linhagens envolvidas.

Apesar deste estudo envolver apenas um único hospital, ele mostrou um cenário diferente do estabelecido para o país até agora. Uma mudança na linhagem de MRSA prevalente nos hospitais brasileiros tem sido reportada, com BEC sendo substituída por clones internacionais.¹⁸⁻²¹ BEC não era prevalente no Hospital Risoleta Tolentino Neves em 2009. Ao invés disso, os casos de infecção por MRSA mostraram prevalência das linhagens ST5-SCC*mecII* e ST105-SCC*mecII*, com o fator agravante desta última apresentar tendência a ser resistente à tigeciclina.

No presente estudo, isolados do mesmo paciente coletados em datas diferentes indicaram a persistência da colonização das linhagens resistentes à tigeciclina, mesmo quando esta droga não vinha sendo utilizada no hospital. Isto enfatiza a importância da vigilância e estudos epidemiológicos constantes para que medidas de controle eficiente no ambiente hospitalar possam ser aplicadas pelas CCIHs.

Alguns casos de sensibilidade reduzida à daptomicina e de resistência heterogênea à daptomicina que apareceram durante este estudo são do mesmo modo relevantes e um estudo aprofundado deverá ser realizado em nosso grupo. Ainda, algumas mutações encontradas nos gene *rpoB* das linhagens que desenvolveram resistência à daptomicina são de interesse para futuros estudos de mecanismo de resistência.

Durante este período de 6 meses no referido hospital não houve disseminação de um único genótipo idêntico detectável por PFGE, o que caracterizaria um surto. A presença de vários subtipos relacionados de um mesmo pulsotipo sugere que estas linhagens são endêmicas ao hospital, e que houve modificações genéticas ao longo do tempo. Portanto, a aquisição de MRSA pelos pacientes pode ter ocorrido devido à contaminação do ambiente hospitalar.

Em conclusão, casos de infecção por linhagens de MRSA resistentes às mais novas drogas disponíveis para uso clínico e sua disseminação são de grande preocupação. Embora os mecanismos de resistência não tenham sido ainda elucidados, este estudo possibilitou a identificação e o rastreamento das linhagens nos pacientes hospitalizados, dando uma visão da evolução das linhagens de MRSA que culminou com um importante perfil de resistência. Quando se conhece os clones prevalentes em uma determinada região, as chances de se aplicar um protocolo de tratamento adequado são maiores, contribuindo assim ao uso racional dos antimicrobianos.

O sequenciamento de *S. aureus* SA16, representante do clone prevalente neste estudo, proporcionou uma referência para estudos posteriores de genômica comparativa com isolados nacionais. Ainda, essa linhagem tem sido utilizada por nosso grupo no estudo de novos compostos antimicrobianos e estudos estruturais de proteínas de *S. aureus*.

REFERÊNCIAS

- 1 LOWY, F. D. *Staphylococcus aureus* infections. **New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 339, n. 8, p. 520–532, 1998.
- 2 SPINK, W. W.; FERRIS, V. Quantitative action of penicillin inhibitor from penicillin-resistant strain of *Staphylococcus*. **Science**, Washington, v. 102, n. 2644, p. 102-221, 1945.
- 3 STEWART G. P.; HOLT R. J. Evolution of natural resistance of the new penicillin. **British Medical Journal**, London, v. 1, n. 5326, p. 309-311, 1963.
- 4 CHAMBERS, H. F. Penicillin-binding protein-mediated resistance in pneumococci and staphylococci. **Journal of Infectious Diseases**, Arlington, v. 179, p. S353– S359, 1999. Supplement 2.
- 5 WIKIMEDIA COMMONS. **Penicillin inhibition**. San Francisco, 2013. Disponível em: <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Penicillin_inhibition.svg>. Acesso em: 19 jun. 2013.
- 6 FUDA, C. C.; FISHER, J. F.; MOBASHERY, S. Beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*: the adaptive resistance of a plastic genome. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 62, n. 22, p. 2617-2633, 2005.
- 7 GARCÍA-ÁLVAREZ, L. et al. MRSA harbouring a novel *mecA* homologue emerging in human and bovine populations in the UK and Denmark. **Lancet Infectious Diseases**, Amsterdam, v. 11, n. 8, p. 595–603, 2011.
- 8 SHORE, A. C.; DEASY, E. C.; SLICKERS, P.; BRENNAN, G.; O’CONNELL, B.; MONECKE, S.; EHRLICH, R.; COLEMAN, D. C. Detection of staphylococcal cassette chromosome *mec* type XI carrying highly divergent *mecA*, *mecI*, *mecR1*, *blaZ*, and *ccr* genes in human clinical isolates of clonal complex 130 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 55, n. 8, p. 3765–3773, 2011.
- 9 DEURENBERG, R. H.; VINK, C.; KALENIC, S.; FRIEDRICH, A. W.; BRUGGEMAN, C. A.; STOBBERINGH, E. E. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology and Infection**, Basel, v. 13, n. 3, p. 222-235, 2007.
- 10 CROSSLEY, K. B.; ARCHER, G. L. **The Staphylococci in human disease**. New York: Churchill Livingstone, 1997.

11 ENRIGHT, M. C.; WITTE, W. Epidemiology of MRSA and MSSA. In: ALA'ALDEEN, D.; HIRAMATSU, K. (Ed.). *Staphylococcus aureus: molecular and clinical aspects*. Chichester: Horwood Publishing, 2004. 267p.

12 DERESINSKI, S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an evolutionary, epidemiologic, and therapeutic odyssey. **Clinical Infectious Diseases**, Arlington, v. 40, n. 4, p. 562-573, 2005.

13 CARVALHO, K. S.; MAMIZUKA, E. M.; GONTIJO FILHO, P. P. Methicillin/oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a hospital and public health threat in Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 14, n. 1, p. 71-76, 2010.

14 HARRIS, S. R.; FEIL, E. J.; HOLDEN, M. T. G.; QUAIL, M. A.; NICKERSON, E. K.; CHANTRATITA, N.; GARDETE, S.; TAVARES, A.; DAY, N.; LINDSAY, J. A.; EDGEWORTH, J. D.; DE LENCASTRE, H.; PARKHILL, J.; PEACOCK, S. J.; BENTLEY, S. D. Evolution of MRSA during hospital transmission and intercontinental spread. **Science**, Washington, v. 327, n. 5964, p. 469-474, 2010.

15 TENOVER, F. C. et al. Characterization of nasal and blood culture isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from patients in United States hospitals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 56, n. 3, p. 1324-1330, 2012.

16 AIRES DE SOUSA, M. et al. Three-year assessment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America from 1996 to 1998. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, n. 6, p. 2197-2205, 2001.

17 ROBINSON, D. A.; ENRIGHT, M. C. Evolutionary models of the emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 47, n. 12, p. 3926-3934, 2003.

18 OLIVEIRA, G. A.; FARIA, J. B.; LEVY, C. E.; MAMIZUKA, E. M. Characterization of the Brazilian Endemic Clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from hospitals throughout Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 5, n. 4, p. 163-170, 2001.

19 TEIXEIRA, M. M.; ARAÚJO, M. C.; SILVA-CARVALHO, M. C.; BELTRAME, C. O.; OLIVEIRA, C. C.; FIGUEIREDO, A. M.; OLIVEIRA, A. G. Emergence of clonal complex 5 (CC5) methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates susceptible to trimethoprim-sulfamethoxazole in a Brazilian hospital. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 45, n. 7, p. 637-643, 2012.

Referências

20 SCHUENCK, R. P.; CAVALCANTE, F. S.; EMERY, E.; GIAMBIAGI-DE MARVAL, M.; DOS SANTO, S. K. R. *Staphylococcus aureus* isolates belonging to different multilocus sequence types present specific virulence gene profiles. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, Delft, v. 65, n. 3, p. 501-504, 2012.

21 CARMO, M. S.; INOUE, F.; ANDRADE, S. S.; PASCHOAL, L.; SILVA, F. M.; OLIVEIRA, V. G. PIGNATARI, A. C. New multilocus sequence typing of MRSA in São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 44, n. 10, p. 1013-1017, 2011.

22 SILVA-CARVALHO, M. C.; BONELLI, R. R.; SOUZA, R. R.; MOREIRA, S.; DOS SANTOS, L. C.; DE SOUZA CONCEIÇÃO, M.; DE MELLO JUNIOR, S. J.; CARBALLIDO, J. M.; RITO, P. N.; VIEIRA, V. V.; TEIXEIRA, L. A.; SÁ FIGUEIREDO, A. M. Emergence of multiresistant variants of the community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineage ST1-SCCmecIV in 2 hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, North Liberty, v. 65, n. 3, p. 300-305, 2009.

23 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Gram-positivos: resistência aos antimicrobianos. In: _____. **Resistência microbiana – mecanismos e impacto clínico**. Brasília, 2007. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo3/gramp_staphylo4.htm>. Acesso em: 15 jan. 2013.

24 FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Orange book**: approved drug products with therapeutic equivalence evaluations. Silver Spring, 2013. Disponível em: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/ob/docs/obdetail.cfm?Appl_No=021572&TABLE1=OB_Rx>. Acesso em: 15 jan. 2013.

25 EUROPEAN MEDICINES AGENCY. Monthly report. In: _____. **Committee for medicinal products for human use - November 2005 plenary meeting**. London, 2005. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Committee_meeting_report/2009/10/WC500006374.pdf>. Acesso em: 15 jan. 2013.

26 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Detalhe do produto : Cubicin**. Brasília, 2008. Disponível em: <http://www7.anvisa.gov.br/datavisa/consulta_produto/rconsulta_produto_detalhe.asp>. Acesso em: 15 jan. 2013.

27 CUBICIN. **About Cubicin**. Lexington, 2012. Disponível em: <www.cubicin.com/about.html>. Acesso em: 15 jan. 2013.

28 STEENBERGEN, J. N.; ALDER, J.; THORNE, G. M.; TALLY, F. P. Daptomycin: a lipopeptide antibiotic for the treatment of serious Gram-positive infections. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v. 55, p. 283-288, 2005. doi:10.1093/jac/dkh546.

29 SILVERMAN, J. A.; MORTIN, L. I.; VANPRAAGH, A. D.; LI, T.; ALDER, J. Inhibition of daptomycin by pulmonary surfactant: in vitro modeling and clinical impact. **Journal of Infectious Diseases**. Oxford, v. 191, n. 12, p. 2149-2152, 2005.

30 PANKEY, G. A. Tigecycline. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v. 56, n. 3, p. 470-480, 2005.

31 MCALEESE, F. et al. A novel MATE family efflux pump contributes to the reduced susceptibility of laboratory-derived *Staphylococcus aureus* mutants to tigecycline. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 49, n.5, p. 1865-1871, 2005.

32 CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. In: ____ **23th Informational Supplement. CLSI document M100-S23**. Wayne: 2013.

33 EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING. **Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters**. Basel, 2012. Disponível em: <http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/Breakpoint_table_v_2.0_120221.pdf>. Acesso em: 15 jan. 2013.

34 PFIZER. Indications and important safety information. In: ____ **Tygacil**. New York, 2013. Disponível em: <<http://www.pfizerpro.com/hcp/tygacil/iisi>>. Acesso em: 15 jan. 2013.

35 NEOH, H. M.; CUI, L.; YUZAWA, H.; TAKEUCHI, F.; MATSUO, M.; HIRAMATSU, K. Mutated response regulator *graR* is responsible for phenotypic conversion of *Staphylococcus aureus* from heterogeneous vancomycin-intermediate resistance to vancomycin-intermediate resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 52, n. 1, p. 45-53, 2008.

36 REYNOLDS, P. E. Structure, biochemistry and mechanism of action of glycopeptide antibiotics. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, New York, v. 8, n. 11, p. 943-950, 1989.

Referências

- 37 CUI, L.; IWAMOTO, A.; LIAN, J. Q.; NEOH, H. M.; MARUYAMA, T.; HORIKAWA, Y.; HIRAMATSU, K. Novel mechanism of antibiotic resistance originating in vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 50, n. 2, p. 428-438, 2006.
- 38 MEEHL, M.; HERBERT, S.; GÖTZ, F.; CHEUNG, A. Interaction of the GraRS two-component system with the VraFG ABC transporter to support vancomycin-intermediate resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 51, n. 8, p. 2679-2689, 2007.
- 39 HANAKI, H.; KUWAHARA-ARAI, K.; BOYLE-VAVRA, S.; DAUM, R. S.; LABISCHINSKI, H.; HIRAMATSU, K. Activated cell-wall synthesis is associated with vancomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strains Mu3 and Mu50. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v. 42, n. 2, p.199–209, 1998.
- 40 CUI, L.; MA, X.; SATO, K.; OKUMA, K.; TENOVER, F. C.; MAMIZUKA, E. M.; GEMMELL, C. G.; KIM, M. N.; PLOY, M. C.; EL-SOLH, N.; FERRAZ, V. HIRAMATSU, K. Cell wall thickening is a common feature of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, n. 1, p. 5–14, 2003.
- 41 BOYLE-VAVRA, S.; LABISCHINSKI, H.; EBERT, C. C; EHLERT, K.; DAUM, R. S. A spectrum of changes occurs in peptidoglycan composition of glycopeptide- intermediate clinical *Staphylococcus aureus* isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 45, n. 1, p. 280–287, 2001.
- 42 CUI, L.; NEOH, H. M.; SHOJI, M.; HIRAMATSU, K. Contribution of *vraSR* and *graSR* point mutations to vancomycin resistance in vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 53, n. 3, p. 1231-1234, 2009.
- 43 HOWDEN, B. P.; STINEAR, T. P.; ALLEN, D. L.; JOHNSON, P. D.; WARD, P. B.; DAVIES, J. K. Genomic analysis reveals a point mutation in the two-component sensor gene *graS* that leads to intermediate vancomycin resistance in clinical *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 52, n. 10, p. 3755-3762, 2008.
- 44 NOWAK, E.; PANJIKAR, S.; KONAREV, P.; SVERGUN, D. I.; TUCKER, P. A. The structural basis of signal transduction for the response regulator PrrA from *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 281, n. 14, p. 9659-9666, 2006.
- 45 DODDANGOUDAR, V. C.; BOOST, M. V.; TSANG, D. N.; O'DONOGHUE, M. M. Tracking changes in the *vraSR* and *graSR* two component regulatory systems during the development and loss of vancomycin non-susceptibility in a clinical isolate. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 8, p. 1268-1272, 2011.

46 CAMARGO, I. L.; NEOH, H. M.; CUI, L. HIRAMATSU, K. Serial daptomycin selection generates daptomycin-nonsusceptible *Staphylococcus aureus* strains with a heterogeneous vancomycin-intermediate phenotype. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 52, n. 12, p. 4289-4299, Dec. 2008.

47 KATAYAMA, Y.; MURAKAMI-KURODA, H.; CUI, L.; HIRAMATSU, K. Selection of heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* by imipenem. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 53, n. 8, p. 3190-3196, 2009.

48 HERBERT, S.; BERA, A.; NERZ, C.; KRAUS, D.; PESCHEL, A.; GOERKE, C.; MEEHL, M.; CHEUNG, A.; GÖTZ, F. Molecular basis of resistance to muramidase and cationic antimicrobial peptide activity of lysozyme in staphylococci. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 3, n. 7, p. e102, 2007.

49 FALORD, M.; MÄDER, U.; HIRON, A.; DÉBARBOUILLÉ, M.; MSADEK, T. Investigation of the *Staphylococcus aureus* GraSR regulon reveals novel links to virulence, stress response and cell wall signal transduction pathways. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 6, n. 7, p. e21323, 2011.

50 FALORD, M.; KARIMOVA, G.; HIRON, A.; MSADEK, T. GraXSR proteins interact with the VraFG ABC transporter to form a five-component system required for cationic antimicrobial peptide sensing and resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 56, n. 2, p. 1047-1058, 2012.

51 STUDIÉ, F. W. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. **Protein Expression and Purification**, Amsterdam, v. 41, n. 1, p. 207–234, 2005.

52 KABSCH, W. XDS. **Acta Crystallographica Section D – Biological Crystallography**. Chester, v. 66, n. 2, p. 125-132, 2010.

53 MERCK MILLIPORE. pET-28a-c(+) Vectors. In:____ **pET *E. coli* T7 expression vectors**. Darmstadt, 2013. Disponível em: <http://www.merckmillipore.com.br/life-science-research/vector-table-novagen-pet-vector-table/c_HdSb.s1O77QAAAEhPqsLdcab?PortalCatalogID=merck4biosciences&CountryName=Brazil>. Acesso em: 24 nov. 2013.

54 ANDRADE, M. A.; CHACÓN, P.; MERELO, J. J.; MORÁN, F. Evaluation of secondary structure of proteins from UV circular dichroism using an unsupervised learning neural network. **Protein Engineering**. Oxford, v. 6, n. 4, p. 383-390, 1993.

Referências

55 PALAZZO, I. C. V.; REHDER, A.; DARINI, A. L. C. Quantitative disk diffusion as a convenient method for determining minimum inhibitory concentrations of Oxacillin for staphylococci strains. **Journal of Microbiological Methods**, Columbia, v. 71, n. 3, p. 186–190, 2007.

56 FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Full prescribing information – Tygacil. In: ____ **Highlights of prescribing information**. Silver Spring, 2010. Disponível em: <http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2010/021821s0271bl.pdf>. Acesso em: 15 Jan. 2013.

57 SCHWARZ, S.; SILLEY, P.; SIMJEE, S.; WOODFORD, N.; VAN DUIJKEREN, E.; JOHNSON, A. P.; GAASTRA, W. Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Birmingham, v. 65, n. 4, p. 601-604, 2010. Editorial.

58 HIRAMATSU, K.; ARITAKA, N.; HANAKI, H.; KAWASAKI, S.; HOSODA, Y.; HORI, S.; FUKUCHI, Y.; KOBAYASHI, I. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. **Lancet**, London, v. 350, n. 9092, p. 1670-1673, 1997.

59 WOOTTON, M.; HOWE, R. A.; HILLMAN, R.; WALSH, T. R.; BENNETT, P. M.; MACGOWAN, A. P. A modified population analysis profile (PAP) method to detect hetero-resistance to vancomycin in *Staphylococcus aureus* in a UK hospital. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Birmingham, v. 47, n. 4, p. 399-403, 2001.

60 KONDO, Y.; ITO, T.; MA, X. X.; WATANABE, S.; KREISWIRTH, B. N.; ETIENNE, J.; HIRAMATSU, K. Combination of multiplex PCRs for Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* type assignment: rapid identification system for *mec*, *ccr*, and major differences in junkyard regions. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 51, n. 1, p. 264–274, 2007.

61 MLST HOMEPAGE. Organism specific information. In: ____ **Databases: *Staphylococcus aureus***. London, 2013. Disponível em: <<http://saureus.mlst.net/misc/info.asp>>. Acesso em: 19 nov. 2013.

62 FEIL, E. J. eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 186, n. 5, p. 1518-1530, 2004.

63 TENOVER, F. C.; ARBEIT, R. D.; GOERING, R. V.; MICKELSEN, P. A.; MURRAY, B. E.; PERSING, D. H.; SWAMINATHAN, B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 33, n. 9, p. 2233-2239, 1995.

64 MCDOUGAL, L. K. STEWARD, C. D.; KILLGORE, G. E.; CHAITRAM, J. M.; MCALLISTER, S. K.; TENOVER, F. C. Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, n. 11, p. 5113-5120, 2003.

65 MCCLURE, J. A.; CONLY, J. M.; ELSAYED, S.; ZHANG, K. Multiplex PCR assay to facilitate identification of the recently described Staphylococcal cassette chromosome mec type VIII. **Molecular and Cellular Probes**, Columbia, v. 24, n. 4, p. 229-232, 2010.

66 LINA, G.; PIÉMONT, Y; GODAIL-GAMOT, F.; BES, M.; PETER M. O.; GAUDUCHON, V.; VANDENESCH, F.; ETIENNE J. Involvement of Pantone-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. **Clinical Infectious Diseases**, Arlington, v. 29, n. 5, p. 1128-1132, 1999.

67 KURODA, M.; KUWAHARA-ARAI, K.; HIRAMATSU, K. Identification of the up- and down-regulated genes in Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* strains Mu3 and Mu50 by cDNA differential hybridization method. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Amsterdam, v. 269, n. 2, p. 485-490, 2000.

68 BAYER, A. S.; SCHNEIDER, T.; SAHL, H. G. Mechanisms of daptomycin resistance in *Staphylococcus aureus*: role of the cell membrane and cell wall. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1277, p. 139-158, 2013.

69 CUI, L.; ISII, T.; FUKUDA, M.; OCHIAI, T.; NEOH, H. M.; CAMARGO, I. L.; WATANABE, Y.; SHOJI, M.; HISHINUMA, T.; HIRAMATSU, K. An RpoB mutation confers dual heteroresistance to daptomycin and vancomycin in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 54, n. 12, p. 5222-5233, 2010.

70 BARBIERI, C. M.; MACK, T. R.; ROBINSON, V.; MILLER, M. T.; STOCK, A. M. Regulation of response regulator autophosphorylation through interdomain contacts. **Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 285, n. 42, p. 32325-32335, 2010.

71 KING-SCOTT, J.; NOWAK, E.; MYLONAS, E.; PANJIKAR, S.; ROESSLE, M.; SVERGUN, D. I.; TUCKER, P. A. The structure of a full-length response regulator from *Mycobacterium tuberculosis* in a stabilized three-dimensional domain-swapped, activated state. **Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 282, n. 52, p. 37717-37729, 2007.

Referências

72 GREENFIELD, N.; FASMAN, G. D. Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. **Biochemistry**, Washington, v. 8, n. 10, p. 4108-4116, 1969.

73 TAPPAREL, C.; MONOD, A.; KELLEY, W. L. The DNA-binding domain of the *Escherichia coli* CpxR two-component response regulator is constitutively active and cannot be fully attenuated by fused adjacent heterologous regulatory domains. **Microbiology**. London, v. 152, n. 2, p. 431-441, 2006.

74 LECLERCQ, R.; NANTAS, L.; SOUSSY, C. J.; DUVAL, J. Activity of RP 59500, a new parenteral semisynthetic streptogramin, against staphylococci with various mechanisms of resistance to macrolide–lincosamide–streptogramin antibiotics. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Birmingham, v. 30, p. 67–75, 1992. Supplement A.

75 YANG S. J.; XIONG, Y. Q.; BOYLE-VAVRA, S.; DAUM, R.; JONES, T.; BAYER, A. S. Daptomycin-oxacillin combinations in treatment of experimental endocarditis caused by daptomycin-nonsusceptible strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with evolving oxacillin susceptibility (the "seesaw effect"). **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. Washington, v. 54, n. 8, p. 3161-3169, 2010.

76 MEHTA, S.; CUIROLO, A. X.; PLATA, K. B.; RIOSA, S.; SILVERMAN, J. A.; RUBIO, A.; ROSATO, R. R.; ROSATO, A. E. VraSR two-component regulatory system contributes to *mprF*-mediated decreased susceptibility to daptomycin in in vivo-selected clinical strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. Washington, v. 56, n. 1, p. 92-102, 2012.

77 MEHTA, S.; SINGH, C.; PLATA, K. B.; CHANDA, P. K.; PAUL, A.; RIOSA, S.; ROSATO, R. R.; ROSATO, A. E. β -Lactams increase the antibacterial activity of daptomycin against clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains and prevent selection of daptomycin-resistant derivatives. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. Washington, v. 56, n. 12, p. 6192-6200, 2012.

78 VERKADE, E. J. M.; VERHULST, C. J. M. M.; HUIJSDENS, X. W.; KLUYTMANS, J. A. J. W. In vitro activity of tygeciline against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, including livestock-associated strains. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, Heidelberg, v. 29, n. 5, p. 503-507, 2010.

79 FERNÁNDEZ-MAZARRASA, C.; MAZARRASA, O.; CALVO, J.; DEL ARCO, A.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L. High concentrations of manganese in Mueller-Hinton Agar increase MICs of Tygeciline determined by Etest®. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 47, n. 3, p. 827-829, 2009.

- 80 FISCHER, A.; YANG, S. J.; BAYER, A. S.; VAEZZADEH, A. R.; HERZIG, S.; STENZ, L.; GIRARD, M.; SAKOULAS, G.; SCHERL, A.; YEAMAN, M. R.; PROCTOR, R. A.; SCHRENZEL, J.; FRANÇOIS, P. Daptomycin resistance mechanisms in clinically derived *Staphylococcus aureus* strains assessed by a combined transcriptomics and proteomics approach. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Birmingham, v. 66, n. 8, p. 1696-1711, 2011.
- 81 KAATZ, G. W.; LUNDSTROM, T. S.; SEO, S. M. Mechanisms of daptomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Oxford, v. 28, n. 4, p. 280–287, 2006.
- 82 YANG, W.; MOORE, I. F.; KOTEVA, K. P.; BAREICH, D. C.; HUGHES, D. W.; WRIGHT, G. D. TetX is a flavin-dependent monooxygenase conferring resistance to tetracycline antibiotics. **Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 279, n. 50, p. 52346-52352, 2004.
- 83 DEAN, C. R.; VISALLI, M. A.; PROJAN, S. J.; SUM, P. E.; BRADFORD, P. A. Efflux-mediated resistance to tigecycline (GAR-936) in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 47, n. 3, p. 972-978, 2003.
- 84 KUWAHARA-ARAI, K.. et al. Evaluation of in vitro antimicrobial activity of GAR-936 against community acquired MRSA (C-MRSA) and hospital acquired MRSA (H-MRSA) including strains resistant to vancomycin (VRSA or VISA). In: INTERSCIENCE CONFERENCE ON ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, 42., 2002, San Diego. **Abstracts...** San Diego: American Society for Microbiology, 2002. E-1137.
- 85 GALES, A. C.; JONES, R. N.; ANDRADE, S. S.; PEREIRA, A. S.; SADER, H. S. In vitro activity of tigecycline, a new glycylcycline, tested against 1,326 clinical bacterial strains isolated from Latin America. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 9, n. 5, p. 348-356, 2005.
- 86 ZORGANI, A.; ELAHMER, O.; ZIGLAM, H.; GHENGHESH, K. S. *In-vitro* activity of tigecycline against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from wounds of burn patients in Tripoli-Libya. **Journal of Microbiology and Infectious Diseases**, Diyarbakir, v. 2, n.3, p. 109-112, 2012.
- 87 SARAVOLATZ, L. D.; PAWLAK, J.; JOHNSON, L. B. In vitro susceptibilities and molecular analysis of vancomycin-intermediate and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. **Clinical Infectious Diseases**, Arlington, v. 55, n. 4, p. 582-586, 2012.

Referências

88 HAWSER, S. P.; BOUCHILLON, S. K.; HACKEL, M.; CHEN, M.; KIM, E. C. Trending 7 years of in vitro activity of tigecycline and comparators against Gram-positive and Gram-negative pathogens from the Asia-Pacific region: Tigecycline Evaluation Surveillance Trial (TEST) 2004-2010. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Oxford, v. 39, n. 6, p. 490-495, 2012.

89 KRUZEL, M. C.; LEWIS, C. T.; WELSH, K. J.; LEWIS, E. M.; DUNDAS, N. E.; MOHR, J. F.; ARMITIGE, L. Y.; WANGER, A. Determination of Vancomycin and Daptomycin MICs by different testing methods for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 49, n. 6, p. 2272-2273, 2011.

90 SADER, H. S.; JONES, R. N.; STILWELL, M. G.; DOWZICKY, M. J.; FRITSCHÉ, T. R. Tigecycline activity tested against 26,474 bloodstream infection isolates: a collection from 6 continents. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, North Liberty, v. 52, n. 3, p. 181-186, 2005.

91 FRITSCHÉ, T. R.; SADER, H. S.; STILWELL, M. G.; DOWZICKY, M. J.; JONES, R. N. Antimicrobial activity of tigecycline tested against organisms causing community-acquired respiratory tract infection and nosocomial pneumonia. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, North Liberty, v. 52, n. 3, p. 187-193, 2005.

92 STREIT, J. M.; JONES, R. N.; SADER, H. S. Daptomycin activity and spectrum: a worldwide sample of 6737 clinical Gram-positive organisms. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Birmingham, v. 53, n. 4, p. 669-674, 2004.

93 JONES, R. N.; ROSS, J. E.; FRITSCHÉ, T. R.; SADER, H. S. Oxazolidinone susceptibility patterns in 2004: report from the Zyvox® Annual Appraisal of Potency and Spectrum (ZAAPS) Program assessing isolates from 16 nations. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Birmingham, v. 57, n.2, p. 279-287, 2006.

94 WILLEMS, R. J. L.; HANAGE, W. P.; BESSEN, D. E.; FEIL, E. J. Population biology of Gram-positive pathogens: high-risk clones for dissemination of antibiotic resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, Delft, v. 35, n. 5, p. 872-900, 2011.

95 SMITH, E. M.; GREEN, L. E.; MEDLEY, G. F.; BIRD, H. E.; FOX, L. K.; SCHUKKEN, Y. H.; KRUZE, J. V.; BRADLEY, A. J.; ZADOKS, R. N.; DOWSON, C. G. Multilocus sequence typing of intercontinental bovine *Staphylococcus aureus* isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 43, n. 9, p. 4737-4743, 2005.

96 QUE, Y. A.; FRANÇOIS, P.; HAEFLIGER, J. A.; ENTENZA, J. M.; VAUDAUX, P.; MOREILLON, P. Reassessing the role of *Staphylococcus aureus* clumping factor and fibronectin-binding protein by expression in *Lactococcus lactis*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 69, n. 10, p.6296-6302, 2001.

97 BURKE, F. M.; MCCORMACK, N.; RINDI, S.; SPEZIALE, P.; FOSTER, T. J. Fibronectin-binding protein B variation in *Staphylococcus aureus*. **BMC Microbiology**, London, v. 10, p.160, 2010. doi:10.1186/1471-2180-10-160.

98 LEE, L. Y.; MIYAMOTO, Y. J.; MCINTYRE, B. W.; HÖÖK, M.; MCCREA, K. W.; MCDEVITT, D.; BROWN, E. L. The *Staphylococcus aureus* Map protein is an immunomodulator that interferes with T cell-mediated responses. **Journal of Clinical Investigation**, Ann Arbor, v. 110, n. 10, p.1461-1471, 2002.

99 CARNEIRO, C. R. W.; POSTOL, E.; NOMIZO, R.; REIS, L. F. L.; BRENTANI, R. R. Identification of enolase as a laminin-binding protein on the surface of *Staphylococcus aureus*. **Microbes and Infection**, Amsterdam, v. 6, n. 6, p. 604–608, 2004.

100 DOWNER, R.; ROCHE, F.; PARK, P. W.; MECHAM, R. P.; FOSTER, T. J. The elastin-binding protein of *Staphylococcus aureus* (EbpS) is expressed at the cell surface as an integral membrane protein and not as a cell wall-associated protein. **Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 277, n. 1, p. 243-250, 2002. doi: 10.1074/jbc.M107621200.

101 CLARKE, S. R.; HARRIS, L. G.; RICHARDS, R. G.; FOSTER, S. J. Analysis of EbpA, a 1.1-megadalton cell wall-associated fibronectin-binding protein of *Staphylococcus aureus*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 70, n. 12, p. 6680–6687, 2002.

102 HAIR, P. S.; WARD, M. D.; SEMMES, O. J.; FOSTER, T. J.; CUNNION, K. M. *Staphylococcus aureus* clumping factor A binds to complement regulator factor I and increases factor I cleavage of C3b. **Journal of Infectious Diseases**, Oxford, v. 198, n. 1, p. 125-133, 2008.

103 RICKLIN, D.; RICKLIN-LICHTSTEINER, S. K.; MARKIEWSKI, M. M.; GEISBRECHT, B. V.; LAMBRIS, J. D. Cutting edge: members of the *Staphylococcus aureus* extracellular fibrinogen-binding protein family inhibit the interaction of C3d with complement receptor 2. **Journal of Immunology**, Bethesda, v. 181, n. 11, p. 7463-7467, 2008.

104 DE HAAS, C. J.; VELDKAMP, K. E.; PESCHEL, A.; WEERKAMP, F.; VAN WAMEL, W. J.; HEEZIUS, E. C.; POPPELIER, M. J.; VAN KESSEL, K. P.; VAN STRIJP, J. A. Chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus*, a bacterial antiinflammatory agent. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 199, n. 5, p. 687-695, 2004.

Referências

- 105 MAKRIS, G.; WRIGHT, J. D.; INGHAM, E.; HOLLAND, K. T. The hyaluronate lyase of *Staphylococcus aureus* - a virulence factor? **Microbiology**, London, v. 150, n. 6, p. 2005-2013, 2004.
- 106 WIECKOWSKA-SZAKIEL, M.; SADOWSKA, B.; RÓZALSKA, B. Staphylokinase production by clinical *Staphylococcus aureus* strains. **Polish Journal of Microbiology**, Bydgoszcz, v. 56, n. 2, p. 97-102, 2007.
- 107 WATANABE, S.; ITO, T.; SASAKI, T.; LI, S.; UCHIYAMA, I.; KISHII, K.; KIKUCHI, K.; SKOV, R. L.; HIRAMATSU, K. Genetic diversity of staphylocoagulase genes (*coa*): insight into the evolution of variable chromosomal virulence factors in *Staphylococcus aureus*. **PLoS One**, San Francisco, v. 4, n. 5, p. e5714, 2009.
- 108 XUE, H.; LU, H.; ZHAO, X. Sequence diversities of serine-aspartate repeat genes among *Staphylococcus aureus* isolates from different hosts presumably by horizontal gene transfer. **PLoS One**, San Francisco, v. 6, n. 5, p. e20332, 2011.
- 109 DINGES, M. M.; ORWIN, P. M.; SCHLIEVERT, P. M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 13, n. 1, p. 16-34, 2000.
- 110 SKAAR, E. P.; SCHNEEWIND, O. Iron-regulated surface determinants (Isd) of *Staphylococcus aureus*: stealing iron from heme. **Microbes and Infection**, Amsterdam, v. 6, n. 4, p. 390-397, 2004.
- 111 LINA, G.; QUAGLIA, A.; REVERDY, M. E.; LECLERCQ, R.; VANDENESCH, F.; ETIENNE, J. Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins among staphylococci. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 43, n. 5, p. 1062-1066, 1999.
- 112 LINDSAY, J. A. Hospital-associated MRSA and antibiotic resistance – What have we learned from genomics? **International Journal of Medical Microbiology**, Amsterdam, v. 303, n. 6-7, p. 318-323, 2013.

ANEXOS

SHORT REPORT

Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* resistant to tigecycline and daptomycin isolated in a hospital in Brazil

A. N. G. DABUL AND I. L. B. C. CAMARGO*

Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, Brasil

Received 26 February 2013; Final revision 3 May 2013; Accepted 3 May 2013;
first published online 29 May 2013

SUMMARY

We report the molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) with resistance to tigecycline and to daptomycin isolated from intensive-care-unit patients in Brazil over a 6-month period. Thirty-six isolates (25 from infection sites, 11 from nasal sites) recovered from 23 patients who presented with MRSA infection during this period were characterized by pulsed-field gel electrophoresis, multilocus sequence typing, staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) typing, and antimicrobial susceptibility profiling. Ten isolates from six patients and two isolates from different patients were resistant to tigecycline and daptomycin, respectively. Eight pulsotypes were identified and one, type A, accounted for 21 isolates from 12 patients; type A isolates were SCC*mec*II as were a further nine isolates of other pulsotypes. All but four of the total isolates were sequence type (ST) 5 or ST105 and classified as clonal complex (CC) 5; the historically prevalent lineage in Brazil, ST239-SCC*mec*III, was identified in only three patients. Tigecycline-resistant strains were all ST105-SCC*mec*II and two patients were nasally colonized by strains of the same pulsotype found in infection sites. Two ST5-SCC*mec*II were daptomycin resistant after 48 h incubation. The origin and mechanism of these resistant strains remains unknown and further studies are warranted to determine whether such clones are becoming endemic in Brazilian hospitals and to assess their impact on infection control practice.

Key words: Antibiotic resistance, bacterial typing, *Staphylococcus aureus*.

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is a major nosocomial pathogen throughout the world but in Brazil it accounts for more than half of all *S. aureus* isolates in most hospitals [1].

Several clones of MRSA have spread globally. The prevalent clone in Brazil and wider Latin America [Brazilian epidemic clone (BEC), sequence type

239-staphylococcal cassette chromosome *mec*III (ST239-SCC*mec*III)] has been identified in 19 Brazilian cities, and in 14 different states between 1995 and 1997 [2], although several other international lineages have also been identified in Brazil [3].

A wide range of resistance to several antimicrobial agents is a hallmark of MRSA but most isolates remain susceptible to vancomycin, teicoplanin and linezolid and these are the primary drugs of choice for the treatment of MRSA infections in Brazil [4]. Two new compounds, tigecycline and daptomycin, were approved for use in Brazil in 2005 and 2008, respectively, for the treatment of complicated skin

* Author for correspondence: Dr I. L. B. C. Camargo, Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 400, Trabalhador são-carlense, 13566-590 – São Carlos, Brasil.
(Email: ilanacamargo@ifsc.usp.br)

and skin structure infections and intra-abdominal infections caused by MRSA. Daptomycin is a cyclic lipopeptide targeting the bacterial cell membrane and several diverse mechanisms have been implicated in the development of resistance [5]. Tigecycline, by contrast, belongs to the class of glycylicyclines which have a high affinity for the bacterial ribosome and resistance is apparently linked to overexpression of an efflux pump protein [6].

Two recent surveys of antimicrobial resistance of a large number of bacterial isolates from Latin America and worldwide have confirmed an extremely low frequency or complete absence of tigecycline resistance in *S. aureus* including MRSA [7, 8]; daptomycin resistance is similarly reported to be uncommon [9]. Tigecycline is not recommended for susceptibility testing of *S. aureus* by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [10], although it is listed by the European Committee on Antimicrobial Susceptibility testing (EUCAST) [11]. Since most clinical laboratories in Brazil follow the CLSI recommendations, susceptibility testing is normally restricted to Gram-negative isolates. The finding reported here, of a cluster of MRSA isolates with reduced susceptibility to tigecycline and daptomycin was therefore considered to be significant – warranting further investigation of the antimicrobial resistance and molecular characteristics of the isolates.

The Rizoleta Tolentino Neves Hospital in Belo Horizonte city, capital of Minas Gerais state and the sixth most populous city in Brazil, has 333 beds with a 30-bed adult intensive care unit (ICU) and a five-bed infantile ICU. Twenty-three patients were infected by MRSA between June and December 2009 yielding 25 isolates from infection sites (blood, soft tissues, bone, etc.) and 11 nasal colonizing isolates. All isolates were identified by the Vitek[®] 2 system (bioMérieux, France) and confirmed as MRSA by *mecA* PCR and SCC*mec* element subtyping [12]. Isolates were also screened for Pantone–Valentine leukocidin (PVL) by PCR as described previously [13].

The minimum inhibitory concentration (MIC) of oxacillin, tigecycline, teicoplanin, quinupristin-dalfopristin, linezolid, daptomycin and vancomycin for all isolates was determined by Etest[®] (bioMérieux). In addition, the MIC of vancomycin (Sigma-Aldrich Co., USA), daptomycin (Hospira Inc., USA) and tigecycline (Pfizer Inc., USA) were also evaluated by the broth microdilution method and susceptibility breakpoints for vancomycin and daptomycin were interpreted according to CLSI [10].

Tigecycline interpretive criteria were those established for staphylococci by EUCAST [11], i.e. MIC ≤ 0.5 mg/l indicating susceptibility.

All isolates were screened for heterogenous vancomycin-intermediate *S. aureus* (hVISA) phenotype by one-point population analysis. Overnight cultures in brain heart infusion (BHI) broth were adjusted to 0.5 McFarland turbidity and 100- μ l aliquots were spread onto BHI agar plates containing 4 mg/l vancomycin. The plates were read after 24 h and 48 h incubation at 37 °C. Isolates were interpreted as being VISA if more than 1000 colonies grew within 48 h and as hVISA if fewer than 1000 colonies grew. Isolates recovered from the screening medium were cultured in BHI broth at 37 °C overnight and cells were diluted in saline to the 0.5 McFarland standard; 100 μ l of this suspension and serial tenfold dilutions were spread on BHI agar plates with various concentrations of vancomycin (0–8 mg/l) and colonies were counted after 48 h at 37 °C.

Isolates were subjected to multilocus sequence typing (MLST) as previously described [14], and the resulting sequences of the seven housekeeping genes were compared to those deposited in the MLST database (<http://saureus.mlst.net/site>). Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) of *Sma*I DNA digests was performed and interpreted according to Tenover *et al.* [15] and analysed with Bionumerics v. 6.5 software (Applied Maths, Belgium) using the unweighted pair-group method with arithmetic mean based on Dice coefficients. Optimization and tolerance values were set to 0.5% and 1.25%, respectively. Isolates were considered to be the same pulsotype if profiles showed greater than 80% similarity with others.

All isolates were resistant to oxacillin and harboured the *mecA* gene. There was universal susceptibility to linezolid, teicoplanin and vancomycin. Sixteen isolates were classified as intermediately susceptible to quinupristin-dalfopristin (from both infection and carriage sites), and 10 and two isolates, respectively, were resistant to tigecycline and daptomycin (Fig. 1). The latter daptomycin-resistant isolates (MIC 2 mg/l) were isolated from infection sites of different patients and it is of note that they were not detected on subculture of microdilution assays before 48 h incubation although CLSI recommends reading of plates at 24 h. Six patients harboured tigecycline-resistant strains, four with single isolates from infected sites (blood, joint, bone), and two with three and four isolates from both nasal colonization and infections.

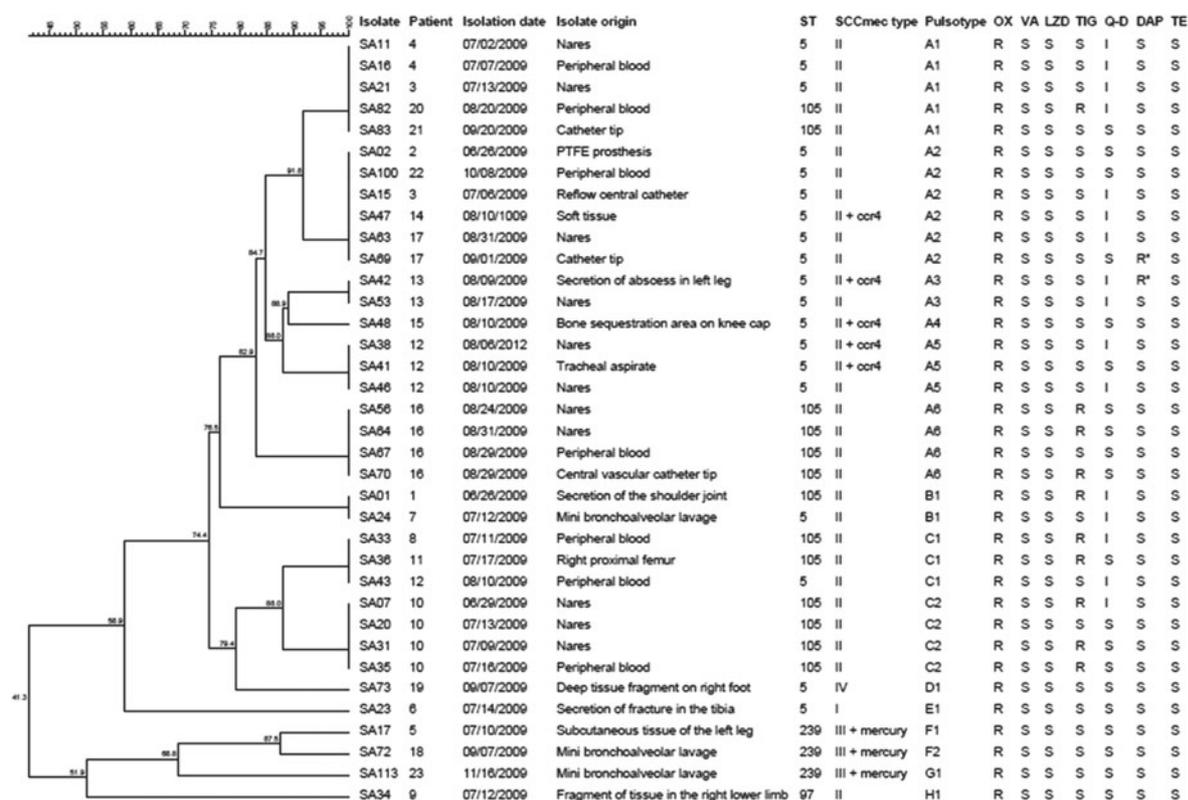


Fig. 1. Dendrogram of the PFGE patterns, clinical source, sequence type and SCCmec element, and antimicrobial resistance of MRSA study isolates. ST, Sequence type; OX, oxacillin; VA, vancomycin; LZD, linezolid; TIG, tigecycline; Q-D, quinupristin-dalfopristin; DAP, daptomycin; TE, teicoplanin; R, resistant; I, intermediate level of resistance; S, susceptible; R*, resistant after 48 h; +ccr4, presence of an extra-SCCmec recombinase 4; +mercury, presence of SCC mercury.

Two isolates showed growth on the hVISA screening assay but were not confirmed as the hVISA phenotype on subsequent testing on a range of vancomycin concentrations by comparison with the positive control strain Mu3 of MRSA.

PFGE analysis differentiated the 36 isolates into eight pulsotypes, A–H (Fig. 1). Pulsotype A accounted for 21 (53.8%) isolates from 12 patients and this type was further discriminated into six subtypes by cluster analysis within the 80% similarity index. All pulsotype A isolates were SCCmecII, as were a further nine isolates of other pulsotypes, and were allocated to two closely related sequence types ST5 and ST105 of clonal complex (CC) 5 which also accounted for isolates of pulsotypes B and C. Pulsotypes D and E were also grouped as CC5 lineages, but were of assorted SCCmec types. Tigecycline-resistant strains were all of ST105-SCCmecII and distributed among three pulsotypes from six different patients, two of whom were colonized by strains of the same pulsotype as the infecting strain. Strain genotypes corresponding to international strain lineages were

12 isolates of ST5-SCCmecII (New York/Japan clone), single isolates of ST5-SCCmecI (Cordobes/Chilean clone) and ST5-SCCmecIV (paediatric clone) and three ST239-SCCmecIII isolates (BEC). None of the isolates harboured the genes encoding for PVL.

Although this study involves only one Brazilian hospital, the results reflect the decline in the prevalence of the BEC lineage and its replacement by other international clones, notably CC5 [3]. However, unlike other studies, we have identified a significant aggravating factor of clonal expansion of CC5 strains resistant to tigecycline but markedly less so to daptomycin. Indeed, reports of susceptibility studies of large series of MRSA isolates both within Latin America and worldwide, have identified none or very few isolates to be resistant to tigecycline [7–9]. Therefore the finding of almost one-third of isolates from ICU patients with a MIC of >0.5 mg/l for this drug over just 6 months is strongly suggestive of a nosocomial outbreak within the unit, which to our knowledge has not been previously reported.

The two cases of decreased susceptibility to daptomycin merit comment. Several mechanisms have been cited for daptomycin resistance but Camargo *et al.* [16] observed that a laboratory-generated strain of *S. aureus* with reduced susceptibility to daptomycin *in vitro*, had an altered membrane and cell wall and grew more slowly than the parental strain. Here, daptomycin resistance was detected only after 48 h of incubation which is consistent with a slower growth of such strains.

In the present study, molecular typing showed that at least two patients (nos. 10 and 16, Fig. 1) were first colonized in the nares with tigecycline-resistant strains prior to their recovery in samples from clinical infection. This indicates that colonization with these strains persists and emphasizes the importance and value of surveillance cultures from patients on entry into the ICU in order that efficient control management can be applied by the Infection Control Committee in the nosocomial environment. Further, this could be interpreted as suggesting *de novo* acquisition of the organisms from other patients or the hospital environment, but the fact that most were CC5 lineages would imply very widespread contamination of the ward environment and there is no evidence to support this.

This study has two significant limitations. First, although there is no evidence that this lineage spread to other units of the hospital, no isolates except for those presented here were available for comparison. Second, it was not possible to investigate whether tigecycline resistance arose as a consequence of treatment with other agents owing to the lack of clinical data. However, given the fact that most isolates were susceptible to the standard agents used to treat MRSA, e.g. linezolid and teicoplanin, it is unlikely that the observed resistance to tigecycline was due to prior antibiotic treatment.

In conclusion, cases of infection by MRSA strains resistant to the newest drugs available and their dissemination are of major concern. Although the mechanisms of resistance remain to be elucidated, this study has enabled the identification of predominant lineages of MRSA associated with infection and colonization and gives an insight into the emergence of clinically significant resistance. Further studies into the prevalent MRSA clones in the wider hospital and region are therefore necessary to determine the potential disease burden and impact on infection control practices and antimicrobial usage to limit their spread.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Hoberdan Pereira and Hyllo Baeta Marcello Júnior from Geraldo Lustosa Laboratório Médico for sending the MRSA isolates and Simoni Camila Bogni, Waldomiro Thiago Corsi and Rani Hale Dabul for technical assistance. This work was supported by Novartis S.A. and Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo (2010/02619-0 and A.N.G.D. 2010/11890-9). This study was approved by the Ethics Committee at FCFRP-USP (CEP/FCFRP no. 46/2011).

DECLARATION OF INTEREST

None.

REFERENCES

1. **Carvalho KS, Mamizuka EM, Gontijo Filho PP.** Methicillin/oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a hospital and public health threat in Brazil. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 2010; **14**: 71–76.
2. **Oliveira GA, et al.** Characterization of the Brazilian endemic clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from hospitals throughout Brazil. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 2001; **5**: 163–170.
3. **Schuenck RP, et al.** *Staphylococcus aureus* isolates belonging to different multilocus sequence types present specific virulence gene profiles. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 2012; **65**: 501–504.
4. **Brazilian Health Surveillance Agency (ANVISA).** (http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo3/gramp_staphylo4.htm). Accessed 15 January 2013.
5. **Bayer AS, Schneider T, Sahl HG.** Mechanisms of daptomycin resistance in *Staphylococcus aureus*: role of the cell membrane and cell wall. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2013; **1277**: 139–158.
6. **McAleese F, et al.** A novel MATE family efflux pump contributes to the reduced susceptibility of laboratory-derived *Staphylococcus aureus* mutants to tigecycline. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2005; **49**: 1865–1871.
7. **Sader HS, Flamm RK, Jones RN.** Tigecycline activity tested against antimicrobial resistant surveillance subsets of clinical bacteria collected worldwide (2011). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* (in press).
8. **Garza-González E, Dowzicky MJ.** Changes in *Staphylococcus aureus* susceptibility across Latin America between 2004 and 2010. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 2013; **17**: 13–19.
9. **Zhanell GG, et al.** Antimicrobial susceptibility of 22746 pathogens from Canadian hospitals: results of the CANWARD 2007–11 study. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2013; **68** (Suppl. 1): i7–i22.

10. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 20th Informational Supplement. CLSI document M100-S20. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2010.
11. **European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing.** (http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/Breakpoint_table_v_2.0_120221.pdf). Accessed 15 January 2013.
12. **Kondo Y, et al.** Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome *mec* type assignment: rapid identification system for *mec*, *ccr*, and major differences in junkyard regions. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2007; **51**: 264–274.
13. **Lina G, et al.** Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clinical Infectious Diseases* 1999; **29**: 1128–1132.
14. **Enright MC, et al.** Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology* 2000; **38**: 1008–1015.
15. **Tenover FC, et al.** Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology* 1995; **33**: 2233–2239.
16. **Camargo IL, et al.** Serial daptomycin selection generates daptomycin-nonsusceptible *Staphylococcus aureus* strains with a heterogeneous vancomycin-intermediate phenotype. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2008; **52**: 4289–4299.

Draft Genome Sequence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strain SA16, Representative of an Endemic Clone from a Brazilian Hospital

Andrei Nicoli G. Dabul,^a Veronica N. Kos,^{b,c} Michael S. Gilmore,^{b,c} Ilana L. B. C. Camargo^a

Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, São Paulo, Brazil^a; Departments of Ophthalmology and of Microbiology and Immunobiology, Harvard Microbial Sciences Initiative, Harvard Medical School, Massachusetts Eye and Ear Infirmary, Boston, Massachusetts, USA^b; The Broad Institute, Cambridge, Massachusetts, USA^c

Here we report the draft genome sequence of a bloodstream isolate of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain SA16. Strain SA16 is a sequence type 5 (ST5)-staphylococcal cassette chromosome *mec* type II (SCC*mec* II) clone and was the most prevalent isolate at a Brazilian hospital during the second half of 2009.

Received 20 August 2013 Accepted 21 August 2013 Published 19 September 2013

Citation Dabul ANG, Kos VN, Gilmore MS, Camargo ILBC. 2013. Draft genome sequence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain SA16, representative of an endemic clone from a Brazilian hospital. *Genome Announc.* 1(5):e00754-13. doi:10.1128/genomeA.00754-13.

Copyright © 2013 Dabul et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 3.0 Unported license](https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/).

Address correspondence to Ilana L. B. C. Camargo, ilanacamargo@ifsc.usp.br.

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is an important nosocomial pathogen for which tracking is required to detect outbreaks.

An epidemiological study of MRSA isolated from infection sites in patients at a hospital in Belo Horizonte, Brazil, between July and December 2009 revealed the presence of an endemic sequence type 5 (ST5)-staphylococcal cassette chromosome *mec* type II (SCC*mec* II) clone (1) that is different from the ST239-SCC*mec* III strains typically encountered in Brazilian hospitals (2). The aim of this study was to characterize by whole-genome sequencing a MRSA isolate representative of this circulating clone. Strain SA16 was isolated from a patient's blood and identified as MRSA by use of the Vitek 2 (bioMérieux) system. Use of the Kirby-Bauer protocol showed this strain to be susceptible to vancomycin, amikacin, and gentamicin but resistant to oxacillin, ciprofloxacin, clindamycin, erythromycin, and penicillin. According to an Etest (bioMérieux), SA16 was also susceptible to daptomycin (MIC, 1 mg/liter), teicoplanin (MIC, 3 mg/liter), linezolid (MIC, 0.75 mg/liter), and tigecycline (MIC, 0.19 mg/liter) and had intermediate susceptibility to quinupristin-dalfopristin (MIC, 1.5 mg/liter).

Genomic DNA was extracted and purified and then submitted for Illumina HiSeq (Illumina) next-generation sequencing at the Tufts University DNA Core Facility (Boston, MA). Independently, genomic DNA was also subjected to 454 FLX (Roche) analysis at the University at Buffalo Next-Generation Sequencing and Expression Analysis Core (Buffalo, NY) to obtain coverage greater than 10-fold. The reads produced by both platforms were assembled into contigs by mapping them against a reference genome sequence (*S. aureus* N315) using CLC Genomics Workbench v 4.8.

Unmapped reads were then assembled into contigs by *de novo* assembly. The contigs of >200 bp ($n = 74$) were annotated with the Prokaryotic Genome Annotation Pipeline v2.0 (NCBI) for deposition with GenBank. The draft genome sequence consists of

2,961,555 bp, with a GC content of 32.9%. Compared to the reference N315 genome sequence, 99% of the genome sequence was found to be shared.

Sequence analysis allowed classification of the clone as *agr* type II, *cap* type 5, and *spa* type t539. SA16 was found to harbor a typical virulence factor associated with CC5 strains (3–18). SA16 was also found to harbor *msrA*, *msrB*, *ermA*, and *ermC* genes, all related to streptogramin type B resistance (19). This may explain the intermediate level of resistance to quinupristin-dalfopristin. *ermC* is probably located on a plasmid, since it is present on a contig which does not match with the *S. aureus* N315 genome but aligns to various plasmids. SA16 also contains 2 intact phages, ϕ MR25 and ϕ N315. ϕ N315 was also found in the N315 genome.

Sequencing of the *S. aureus* SA16 genome has generated the first draft genome sequence of a representative CC5 strain from Brazil, which provides a reference for further comparative genome analysis for studies of *S. aureus* isolates collected within this region. Also, this strain has been used by our group in the study of novel antimicrobial compounds and the structural study of *S. aureus* proteins.

Nucleotide sequence accession numbers. This whole-genome shotgun project has been deposited at DDBJ/EMBL/GenBank under the accession number [ASZO00000000](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/ASZO00000000). The version described in this paper is version ASZO01000000.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by projects FAPESP 2010/02619-0, NIH/NIAID AI083214, and AI072360. A.N.G.D. was supported by grants from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (2010/11890-9).

REFERENCES

1. Dabul AN, Camargo IL. 2013. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* resistant to tigecycline and daptomycin isolated in a hospital in Brazil. *Epidemiol. Infect.* 29:1–5.
2. Oliveira GA, Faria JB, Levy CE, Mamizuka EM. 2001. Characterization of the Brazilian endemic clone of methicillin-resistant *Staphylococcus au-*

- reus* (MRSA) from hospitals throughout Brazil. *Braz. J. Infect. Dis.* 5:163–170.
3. Que YA, François P, Haefliger JA, Entenza JM, Vaudaux P, Moreillon P. 2001. Reassessing the role of *Staphylococcus aureus* clumping factor and fibronectin-binding protein by expression in *Lactococcus lactis*. *Infect. Immun.* 69:6296–6302.
 4. Burke FM, McCormack N, Rindi S, Speziale P, Foster TJ. 2010. Fibronectin-binding protein B variation in *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiol.* 10:160. doi:10.1186/1471-2180-10-160.
 5. Lee LY, Miyamoto YJ, McIntyre BW, Höök M, McCrean KW, McDevitt D, Brown EL. 2002. The *Staphylococcus aureus* map protein is an immunomodulator that interferes with T cell-mediated responses. *J. Clin. Invest.* 110:1461–1471.
 6. Carneiro CR, Postol E, Nomizo R, Reis LF, Brentani RR. 2004. Identification of enolase as a laminin-binding protein on the surface of *Staphylococcus aureus*. *Microbes Infect.* 6:604–608.
 7. Downer R, Roche F, Park PW, Mecham RP, Foster TJ. 2002. The elastin-binding protein of *Staphylococcus aureus* (EbpS) is expressed at the cell surface as an integral membrane protein and not as a cell wall-associated protein. *J. Biol. Chem.* 277:243–250.
 8. Clarke SR, Harris LG, Richards RG, Foster SJ. 2002. Analysis of EbpA, a 1.1-megadalton cell wall-associated fibronectin-binding protein of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 70:6680–6687.
 9. Hair PS, Ward MD, Semmes OJ, Foster TJ, Cunnion KM. 2008. *Staphylococcus aureus* clumping factor A binds to complement regulator factor I and increases factor I cleavage of C3b. *J. Infect. Dis.* 198:125–133.
 10. Ricklin D, Ricklin-Lichtsteiner SK, Markiewski MM, Geisbrecht BV, Lambris JD. 2008. Cutting edge: members of the *Staphylococcus aureus* extracellular fibrinogen-binding protein family inhibit the interaction of C3d with complement receptor 2. *J. Immunol.* 181:7463–7467.
 11. de Haas CJ, Veldkamp KE, Peschel A, Weerkamp F, Van Wamel WJ, Heezius EC, Poppelier MJ, Van Kessel KP, van Strijp JA. 2004. Chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus*, a bacterial anti-inflammatory agent. *J. Exp. Med.* 199:687–695.
 12. Makris G, Wright JD, Ingham E, Holland KT. 2004. The hyaluronate lyase of *Staphylococcus aureus*—a virulence factor? *Microbiology* 150:2005–2013.
 13. Wieckowska-Szakiel M, Sadowska B, Rózsalska B. 2007. Staphylokinase production by clinical *Staphylococcus aureus* strains. *Pol. J. Microbiol.* 56:97–102.
 14. Watanabe S, Ito T, Sasaki T, Li S, Uchiyama I, Kishii K, Kikuchi K, Skov RL, Hiramatsu K. 2009. Genetic diversity of staphylocoagulase genes (*coa*): insight into the evolution of variable chromosomal virulence factors in *Staphylococcus aureus*. *PLoS One* 4:e5714. doi:10.1371/journal.pone.0005714.
 15. Xue H, Lu H, Zhao X. 2011. Sequence diversities of serine-aspartate repeat genes among *Staphylococcus aureus* isolates from different hosts presumably by horizontal gene transfer. *PLoS One* 6:e20332. doi:10.1371/journal.pone.0020332.
 16. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Rev.* 13:16–34.
 17. Skaar EP, Schneewind O. 2004. Iron-regulated surface determinants (Isd) of *Staphylococcus aureus*: stealing iron from heme. *Microbes Infect.* 6:390–397.
 18. Johnson M, Cockayne A, Morrissey JA. 2008. Iron-regulated biofilm formation in *Staphylococcus aureus* Newman requires *ica* and the secreted protein Emp. *Infect. Immun.* 76:1756–1765.
 19. Lina G, Quaglia A, Reverdy ME, Leclercq R, Vandenesch F, Etienne J. 1999. Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins among staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:1062–1066.

Clonal complexes of *Staphylococcus aureus*: all mixed and together

Andrei N.G. Dabul & Ilana L.B.C. Camargo

Laboratório de Epidemiologia e Microbiologia Molecular (LEMiMo), Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

Correspondence: Ilana. L.B.C. Camargo, Av. João Dagnone, 1100 - Jd Santa Angelina - São Carlos/SP, 13563-120 – Brazil.
Tel.: +55(16)3373 8654;
fax: +55(16)3373 9881;
e-mail: ilanacamargo@ifsc.usp.br

Received 11 November 2013; revised 9 December 2013; accepted 9 December 2013. Final version published online 6 January 2014.

DOI: 10.1111/1574-6968.12358

Editor: Jan-Ingmar Flock

Keywords

typing method; molecular epidemiology; sequence typing.

As gene sequence data continues to accumulate, it could have been predicted that the main human pathogenic lineages of *Staphylococcus aureus* would become connected by EBURST (Feil *et al.*, 2004) when run on Multi-locus sequence typing (MLST) database. Following the introduction of strain A08151 in the MLST database (<http://saureus.mlst.net/>), CC1, CC5, CC8, CC15 and CC97 now form the largest group of *S. aureus* lineages, comprising 911 different sequence types. Figure 1 shows the link between these clonal complexes (CCs).

CC1, CC5, CC8, CC15 and CC97 were previously the five largest and most important *S. aureus* CCs. CC1 is known to contain various community-associated methicillin-resistant *S. aureus* (CA-MRSA) including the first PVL-positive strain MW2. CC5 is present all over the world, sometimes being pandemic, and comprises both CA- and hospital-associated MRSA (HA-MRSA). Another pandemic CC is CC8, which includes the ancestral MRSA ST250-SCCmecI. ST239, a very widespread lineage, is part of CC8 but has gained a large DNA fragment from CC30, and has been categorized as a separate CC. CC15 is also a large CC but consists mainly of methicillin-sensitive *S. aureus*. The same is true for CC97, but most isolates of this lineage are from animals (Monecke *et al.*, 2011).

Abstract

In this manuscript, we show that the most important clonal complexes of *Staphylococcus aureus*, CC1, CC5, CC8, CC15 and CC97, are now all connected by EBURST when run on the Multi-locus sequence typing (MLST) database. The seven loci suggested for the MLST scheme of *S. aureus* are not enough to separate the most important clones such as New York/Japan and Brazilian Epidemic Clone (BEC). They now all belong to the same clonal complex and this may be the time to think about a new way to discriminate them.

Convergence of these lineages began to occur after the introduction of strain BJ0192 into the MLST database. This strain is an MRSA ST2139 from Beijing, China, isolated in 2009 from a healthy female. It linked CC1 to CC97. The second link occurred between CC1/97 and CC15, which were connected by strain 12-18207 isolated in 2012 in Australia, an MRSA ST2605. The last and largest link was made by the addition of strain A08151, a vancomycin-intermediate *S. aureus* (VISA) isolated in 2012 in Iowa, USA, from a heel wound of a 91-year-old female. This strain connected CC1/97/15 to CC8 and CC5.

Understanding the relationships between strains is important for tracking epidemiology and for understanding the pathogenesis of *S. aureus* infection. For example, CC5 has been spreading in hospitals in several countries, and is represented by the clone New York/Japan ST5-SCCmecII (Monecke *et al.*, 2011). Our group has just reported the occurrence of this clone and the single locus variant ST105-SCCmecII as prevalent in infections from patients in a Brazilian hospital. This seems to have replaced BEC (ST239-SCCmecIII), a CC8 strain frequently isolated in Brazil (Dabul & Camargo, 2013). Ironically, these now belong to the same CC.

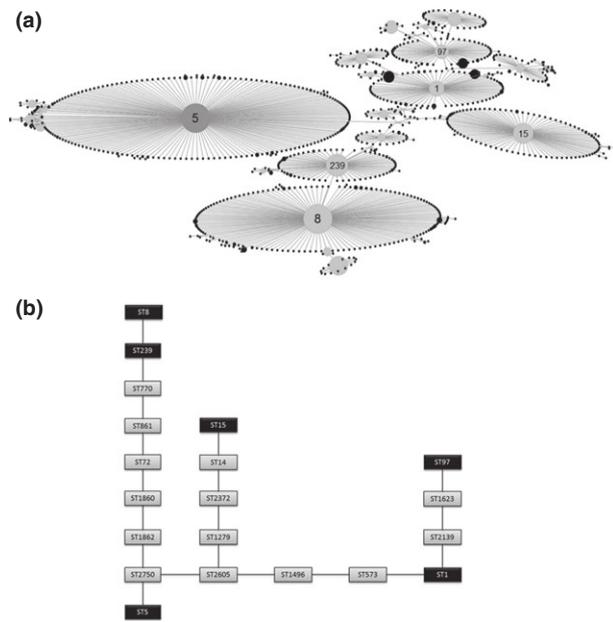


Fig. 1. Linkage of the main *Staphylococcus aureus* clonal complexes. (a) Picture produced with eBURST v3 on *S. aureus* MLST database. The main clonal complexes which are now linked are marked CC1, CC5, CC8 (and ST239), CC15 and CC97. (b) ST of the lineages forming the connections between these CCs.

It is important to mention that there are many unsampled genotypes and other CCs might by now also be connected.

The connection of these CCs raises the question of what represents an ideal mechanism for discrimination and

categorization of *S. aureus* isolates. We appear to have entered the genomics era (Pérez-Losada *et al.*, 2013) and in the near future it may be necessary to compare the entire core genome as a whole instead of only seven loci. As this approach is not yet available in many laboratories, in contrast to the MLST scheme, maybe just inclusion of other loci or even substituting different ones would be enough to continue discriminating these important CCs, given such usefulness in molecular epidemiology.

References

- Dabul ANG & Camargo ILBC (2013) Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* resistant to tigecycline and daptomycin isolated in a hospital in Brazil. *Epidemiol Infect* **29**: 1–5.
- Feil EJ, Li BC, Aanensen DM, Hanage WP & Spratt BG (2004) eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *J Bacteriol* **186**: 1518–1530.
- Monecke S, Coombs G, Shore AC *et al.* (2011) A field guide to pandemic, epidemic and sporadic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS One* **6**: e17936.
- Pérez-Losada M, Cabezas P, Castro-Nallar E & Crandall KA (2013) Pathogen typing in the genomics era: MLST and the future of molecular epidemiology. *Infect Genet Evol* **16**: 38–53.