

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DE PORTO ALEGRE - UFCSPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA
SAÚDE**

Adriana Medianeira Rossato

**Análise molecular de *Staphylococcus aureus*
resistente à meticilina com
heterorresistência à vancomicina oriundos
de Porto Alegre**

UFCSPA
Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre

**Porto Alegre
2021**

Adriana Medianeira Rossato

**Análise molecular de *Staphylococcus aureus*
resistente à meticilina com
heterorresistência à vancomicina oriundos
de Porto Alegre**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências da Saúde da Universidade Federal de
Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito
para a obtenção do grau de Doutora em Ciências
da Saúde

Orientador: Dr. Pedro Alves d'Azevedo
Coorientadores: Dr. Cícero Armídio Gomes
Dra. Keli Cristine Reiter

**Porto Alegre
2021**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Rossato, Adriana Medianeira

Análise molecular de *Staphylococcus aureus* resistente à metilina com heterorresistência à vancomicina oriundos de Porto Alegres / Adriana Medianeira Rossato. - 2021.

102 p. : il.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Ciências da Saúde, 2021.

Orientador: Pedro Alves d'Azevedo.

Coorientadores: Cícero Armídio Gomes e Keli Cristine Reiter.

1. *Staphylococcus aureus* resistente à metilina. 2. hVISA. 3. Sistema *agr*
4. Tipagem SCCmec. 5. TCRS. I. d'Azevedo, Pedro Alves. II. Gomes, Cícero Armídio. III. Reiter, Keli Cristine. IV. Título.

Agradecimentos

Ao meu orientador Pedro Alves d' Azevedo, pela orientação no mestrado e no doutorado, pelas discussões proporcionadas, pelo conhecimento compartilhado, pela dedicação e cooperação indispensável.

Aos meus coorientadores Cícero Gomes e Keli Reiter, pela presença incontestável na execução deste trabalho e, acima de tudo, pelas sugestões e críticas de editores.

A pós-doutoranda Muriel Primon-Barros, pela parceria pessoal e científica, pelos momentos de apreensão e de conquistas, pelas discussões e sugestões concedidas e, sobretudo, pelo incentivo ininterrupto à pesquisa.

A minha colega de doutorado Lisiane Rocha, pela parceria pessoal e profissional, pelos momentos de angústia e de comemoração, pelos cafés com discussões e pelos vínculos de trabalhos futuros.

A todos os colegas do Laboratório de Microbiologia da UFCSPA. Em especial ao Cezar Riche e a Rebeca Inhoque, pela parceria pessoal, pelos jantares com debates científicos e pelo apoio na realização do doutorado.

Aos colegas do Laboratório de Análises Clínicas do HCSJ. Em especial ao biomédico Estevão Belinaso, pela parceria profissional, pela compreensão nos momentos de inquietação e vibração nos momentos de êxito; e as auxiliares do laboratório Mara Baptista, Gabriella Lindner e a Tamires Souza, pela parceria nos plantões noturnos, pela sanidade mental em meio ao caos, pelo apoio familiar e psicológico.

Aos meus pais, Aldo Rossato e Eva Rossato, e a minha irmã Andrea Rossato, pelo apoio incessante na vida pessoal, acadêmica e profissional, pela responsabilidade e confiança a mim depositada.

Ao meu namorado, Adenir Stefanello, pelo incentivo ininterrupto a todos os desafios do dia-a-dia. Simplesmente, muito obrigada.

Enfim, a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução dessa Tese de doutorado.

RESUMO

Staphylococcus aureus resistente à meticilina (MRSA) é uma das causas mais frequentes de infecções comunitárias e relacionadas a assistência à saúde, cuja principal opção terapêutica é a vancomicina. Contudo, o uso constante desse antimicrobiano contribuiu com a emergência de MRSA com reduzida suscetibilidade à vancomicina (hVISA e VISA), comumente associados com bacteremia persistente, hospitalização prolongada e falha terapêutica. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi analisar as características moleculares de MRSA com heterorresistência à vancomicina oriundos de hospitais de Porto Alegre. Este estudo observacional transversal foi realizado com 217 MRSA isolados entre 2014 e 2019 de hospitais em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. A suscetibilidade aos antimicrobianos foi avaliada pelo método de disco-difusão e microdiluição em caldo Mueller-Hinton. A detecção dos genes de resistência e a tipagem do SCCmec foram determinadas por PCR convencional e PCR multiplex, respectivamente. A triagem para hVISA foi conduzida em ágar BHI contendo 6 µg/mL de vancomicina (BHIA-6V) e a confirmação do fenótipo foi determinada através da Análise do Perfil Populacional - Área Abaixo da Curva (PAP-AUC). O tipo de *agr* e a funcionalidade do sistema do *agr* foram determinados por PCR multiplex e atividade da delta-hemolisina, respectivamente. A expressão de *graSR*, *vraSR* e *walKR* - TCRS (do inglês *Two Component Regulatory Systems*) em isolados clínicos de hVISA submetidos a sub-CIM de vancomicina foi quantificada por qRT-PCR. Altas taxas de resistência foram observadas para eritromicina, ciprofloxacino e clindamicina, e baixas taxas para gentamicina, tetraciclina e sulfametoxazol-trimetoprima. Completa suscetibilidade foram verificadas para linezolida e vancomicina. A frequência dos genes de resistência *aac(6')/aph(2'')*, *aph(3')-IIIa*, *dfrG*, *ermA* e *tetM* foi alta entre os MRSA. Em contrapartida, baixas taxas foram observadas para os genes *ant(4')-Ia*, *dfrA*, *ermB*, *ermC*, *linA*, *linB*, *msrA*, *msrB* e *tetK*. Os MRSA SCCmec tipo IV foram mais suscetíveis aos antimicrobianos ($p < 0,001$). Ao contrário, os MRSA SCCmec tipo III exibiram maior resistência ($p < 0,001$). Todos os MRSA foram suscetíveis à vancomicina, porém 9,9% apresentaram heterorresistência à vancomicina (hVISA). A proporção de MRSA com $CIM_{VAN} \geq 1,0$ µg/mL no *agr* grupo II foi significativamente maior do que nos grupos I e III ($p = 0,002$). A disfunção do *agr* foi observada especialmente em MRSA com $CIM_{VAN} \geq 1,0$ µg/mL ($p < 0,001$). Além disso, a disfunção no *agr* foi significativa em isolados com o fenótipo hVISA ($p < 0,001$). Os níveis de transcrição de *graSR*, *vraSR* e *walKR* foram significativamente positiva em quatro, sete e cinco hVISA expostos à

vancomicina, respectivamente. Em contraste, três hVISA apresentaram regulação negativa de *graSR* quando exposto à vancomicina, e os níveis de transcrição de *vraSR* e *walKR* foram regulados negativamente em apenas um isolado. Os hVISA 199SA e 203SA apresentaram a expressão gênica regulada positivamente para todos os TCRS testados, e o 68SA exibiu regulação negativa para *graSR* e *walKR* TCRS. Os dados do estudo fornecem informações sobre o perfil de resistência de isolados clínicos de MRSA do Sul do Brasil, que concomitante com os dados das condições clínicas dos pacientes, podem contribuir para a tomada de uma decisão clínica mais acertada. Além disso, os dados mostram que a disfunção do sistema *agr* em MRSA está associado a $CIM_{VAN} \geq 1,0 \mu\text{g/mL}$ e ao fenótipo hVISA, o que sugere que a disfunção do *agr* pode conferir vantagens potenciais ao MRSA para a sobrevivência em infecções invasivas. Por fim, a expressão de *graSR/ vraSR/ walKR* foi variável nos isolados clínicos de hVISA, que reflete a complexidade molecular do fenótipo de heteroresistência à vancomicina.

Palavras-chave: MRSA; hVISA; sistema *agr*; tipagem SCC*mec*; TCRS.

ABSTRACT

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is one of the most frequent causes of community-acquired and healthcare-associated infections, whose main therapeutic option is vancomycin. However, the constant use of this antimicrobial has contributed to the emergence of MRSA with reduced susceptibility to vancomycin (hVISA and VISA), commonly associated with persistent bacteremia, prolonged hospitalization and therapeutic failure. Therefore, the aim of this study was to analyze the molecular characteristics of MRSA with vancomycin heteroresistance from hospitals of Porto Alegre. This cross-sectional observational study was conducted with 217 MRSA isolated between 2014 and 2019 from hospitals of Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. The susceptibility to antimicrobials was evaluated by the disk diffusion method and microdilution in Mueller-Hinton broth. The detection of resistance genes and SCCmec typing were determined by conventional PCR and multiplex PCR, respectively. The screening for hVISA was conducted in BHI agar containing 6 µg/mL of vancomycin (BHIA-6V) and the phenotype confirmation was determined through Population Analysis Profile-Area Under the Curve (PAP-AUC). The type of *agr* and the functionality of the *agr* system were determined by multiplex PCR and delta-hemolysin activity, respectively. The expression of *graSR*, *vraSR* e *walKR* - TCRS (Two Component Regulatory Systems) in hVISA clinical isolates submitted sub-MIC of vancomycin was quantified by qRT-PCR. High rates of resistance were observed for erythromycin, ciprofloxacin and clindamycin, and low rates for gentamicin, tetracycline and trimethoprim sulfamethoxazole. Complete susceptibility was verified for linezolid and vancomycin. The frequency of resistance genes *aac(6')/aph(2'')*, *aph(3')-IIIa*, *dfrG*, *ermA* and *tetM* was high among MRSA. In contrast, low rates were observed for *ant(4')-Ia*, *dfrA*, *ermB*, *ermC*, *linA*, *linB*, *msrA*, *msrB* and *tetK* genes. MRSA SCCmec type IV were more susceptible to antimicrobials ($p < 0.001$). In contrast, MRSA SCCmec type III exhibited greater resistance ($p < 0.001$). All MRSAs were susceptible to vancomycin, however 9.9% presented heteroresistance to vancomycin (hVISA). The proportion of MRSA with $MIC_{VAN} \geq 1.0$ µg/mL in *agr* group II was significantly higher than in groups I and III ($p = 0.002$). *agr* dysfunction was observed especially in MRSA with $MIC_{VAN} \geq 1.0$ µg/mL ($p < 0.001$). In addition, *agr* dysfunction was significant in isolates with the hVISA phenotype ($p < 0.001$). The transcription levels of *graSR*, *vraSR* and *walKR* were significantly positive in four, seven and five hVISA exposed to vancomycin, respectively. In contrast, three hVISA showed negative regulation of *graSR* when exposed to vancomycin, and the transcription levels of

vraSR and *walKR* were negatively regulated in only one isolate. The hVISA 199SA and 203SA showed upregulated gene expression for all tested TCRS, and 68SA showed downregulation for *graSR* and *walKR* TCRS. The study data provide information regarding the resistance profile of MRSA isolates from South Brazil, and along with data on the clinical conditions of the patients, it can contribute to the better clinical decision-making. Furthermore, the data show that the *agr* system dysfunction in MRSA is associated with vancomycin MIC ≥ 1.0 $\mu\text{g/mL}$ and the hVISA phenotype, which suggests that *agr* dysfunction may confer potential advantages on MRSA for survival in invasive infections. Finally, the expression of *graSR*/*vraSR*/*walKR* was variable in hVISA clinical isolates, which reflects the molecular complexity of the vancomycin heteroresistance phenotype.

Keywords: MRSA; hVISA; *agr* system; SCC*mec* typing; TCRS.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura do sistema <i>agr</i> em <i>Staphylococcus aureus</i>	13
Figura 2 - Linha do tempo da descoberta ao desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos.	15
Figura 3 - Estrutura geral do elemento <i>SCCmec</i>	17
Figura 4 - Características genéticas dos elementos <i>SCCmec</i>	20
Figura 5 - Mecanismo de ação da vancomicina em VSSA.	26
Figura 6 - Mecanismo de resistência da vancomicina em VRSA.	37

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Especificações dos tipos de SCC <i>mec</i> ^a	21
Tabela 2 - Antimicrobianos ativos contra <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilina ^a	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABCs	<i>Active Bacterial Core Surveillance</i>
<i>agr</i>	<i>accessory gene regulator</i>
AgrA	Proteína AgrA
AgrB	Proteína AgrB
AgrC	Proteína AgrC
AgrD	Proteína AgrD
<i>agrI</i>	Polimorfismo do <i>agr</i> tipo I
<i>agrII</i>	Polimorfismo do <i>agr</i> tipo II
<i>agrIII</i>	Polimorfismo do <i>agr</i> tipo III
<i>agrIV</i>	Polimorfismo do <i>agr</i> tipo IV
AIP	<i>Autoinducing peptide</i>
AMEs	<i>Aminoglycoside-modifying enzymes</i>
<i>attBsc</i>	<i>SCCmec attachment site</i>
BHIA-6V	Ágar BHI contendo 6 µg/mL de vancomicina
BSI	<i>Bloodstream infections</i>
CA	<i>Community-acquired</i>
CAP	<i>Community-acquired pneumonia</i>
CAMP	<i>Cationic antimicrobial peptide</i>
CA-MRSA	<i>Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>
CAUTI	<i>Catheter-associated urinary tract infection</i>
CLABSI	<i>Central line-associated bloodstream infection</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CmK	<i>Cytidine monophosphate kinase</i>
Cna	<i>Collagen-binding protein</i>
CfIA	<i>Clumping factor proteins A</i>
CfIB	<i>Clumping factor proteins B</i>
CRSA	<i>Ceftaroline-resistant Staphylococcus aureus</i>
DHFR	<i>Dihydrofolate reductase</i>
DHPS	<i>Dihydropteroate synthetase</i>

<i>erm</i>	<i>Erythromycin ribosome methylase</i>
ETs	<i>Staphylococcal exfoliative toxins</i>
FnbpA	<i>Fibronectin-binding protein A</i>
FnbpB	<i>Fibronectin-binding protein B</i>
HAI	<i>Healthcare associated infection</i>
HACO	<i>Healthcare-associated community-onset</i>
HA-MRSA	<i>Healthcare-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>
HAP	<i>Hospital-onset</i>
HO	<i>Hospital-acquired pneumonia</i>
hVISA	<i>Heterogeneous vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus</i>
INICC	<i>International Nosocomial Infection Control Consortium</i>
Região J	<i>Região junkyard</i>
LA-MRSA	<i>Livestock-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>
<i>lnu</i>	<i>Lincosamide nucleotidyltransferase</i>
LRSA	<i>Linezolid-resistant Staphylococcus aureus</i>
MGEs	<i>Mobile genetic elements</i>
MLS _B	<i>Macrolide, lincosamides and streptogramin B</i>
MSSA	<i>Methicillin-susceptible Staphylococcus aureus</i>
MRSA	<i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
<i>msr</i>	<i>Macrolides streptogramins resistance</i>
MSCRAMMs	<i>Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules</i>
NHSN	<i>National Healthcare Safety Network</i>
ORFs	<i>Open reading frames</i>
PAP-AUC	<i>Population analysis profile - area under the curve</i>
PBPs	<i>Penicillin binding proteins</i>
PBP2a	<i>Penicillin binding protein 2a</i>
PRSA	<i>Penicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>
PVL	<i>Panton-Valentine leucocidin</i>
QS	<i>Quorum sensing</i>
rRNA	<i>Ribosomal ribonucleic acid</i>
SEs	<i>Staphylococcal enterotoxins</i>
SAB	<i>Staphylococcus aureus bacteremia</i>

SAP	<i>Staphylococcus aureus pneumonia</i>
SCCmec	<i>Staphylococcal cassette chromosome mec</i>
SCCmec I	<i>Staphylococcal cassette chromosome mec</i> tipo I
SCCmec II	<i>Staphylococcal cassette chromosome mec</i> tipo II
SCCmec III	<i>Staphylococcal cassette chromosome mec</i> tipo III
SCCmec IV	<i>Staphylococcal cassette chromosome mec</i> tipo IV
SCCmec V	<i>Staphylococcal cassette chromosome mec</i> tipo V
SCCmec VI	<i>Staphylococcal cassette chromosome mec</i> tipo VI
SCCmec VII	<i>Staphylococcal cassette chromosome mec</i> tipo VII
SCCmec VIII	<i>Staphylococcal cassette chromosome mec</i> tipo VIII
SCCmec IX	<i>Staphylococcal cassette chromosome mec</i> tipo IX
SCCmec X	<i>Staphylococcal cassette chromosome mec</i> tipo X
SCCmec XI	<i>Staphylococcal cassette chromosome mec</i> tipo XI
SCCmec XII	<i>Staphylococcal cassette chromosome mec</i> tipo XII
SCCmec XIII	<i>Staphylococcal cassette chromosome mec</i> tipo XIII
SSI	<i>Surgical site infection</i>
SSTI	<i>Skin and soft tissue infection;</i>
SpA	<i>Staphylococcal protein A</i>
TCRS	<i>Two component regulatory systems</i>
tRNA	<i>Transfer ribonucleic acid</i>
TSST-1	<i>Toxic-shock syndrome toxin-1</i>
UTI	Unidade de terapia intensiva
VAP	<i>Ventilator-associated pneumonia</i>
VISA	<i>Vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus</i>
VS-MRSA	<i>Vancomycin-susceptible MRSA</i>
VSSA	<i>Vancomycin-susceptible Staphylococcus aureus</i>
VRE	<i>Vancomycin-resistance Enterococcus faecalis</i>
VRSA	<i>Vancomycin-resistance Staphylococcus aureus</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
WTA	<i>Wall teichoic acid</i>

SUMÁRIO

RESUMO	5
1 REVISÃO DA LITERATURA	9
1.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	9
1.2 Patogenicidade	9
1.3 Fatores de virulência	10
1.3.1 Regulador gene acessório.....	12
1.4 Resistência aos antimicrobianos	15
1.4.1 Resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos	16
1.4.1.1 Resistência à penicilina	16
1.4.1.2 Resistência à metilina	16
1.4.1.2.1 Cassete cromossômico estafilocócico <i>mec</i>	17
1.4.1.2.2 CA-MRSA, HA-MRSA e LA-MRSA	21
1.4.1.2.3 Relevância clínica	23
1.4.2 Resistência aos antimicrobianos não beta-lactâmicos.....	24
1.4.2.1 Resistência aos glicopeptídeos	25
1.4.2.1.1 Reduzida suscetibilidade à vancomicina	25
1.4.2.1.1.1 Heterorresistência ou resistência intermediária à vancomicina	26
1.4.2.1.1.1.1 Heterorresistência à vancomicina.....	27
1.4.2.1.1.1.1.1 Determinantes genéticos de resistência	28
1.4.2.1.1.1.1.1.1 Mutação em genes da regulação transcricional.....	29
1.4.2.1.1.1.1.1.2 Mutação em genes da síntese da parede celular, hidrólise e síntese do ácido teicoico.....	31
1.4.2.1.1.1.1.1.3 Mutação em genes envolvidos no metabolismo estafilocócico.....	32
1.4.2.1.1.1.1.1.4 Mutação em genes de modificação pós-traducional	33
1.4.2.1.1.1.1.2 Implicações clínicas	34
1.4.2.1.1.2 Resistência à vancomicina	36
1.4.2.2 Resistência aos aminoglicosídeos.....	38
1.4.2.3 Resistência aos macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas B.	39
1.4.2.4 Resistência as fluoroquinolonas	40
1.4.2.5 Resistência as tetraciclinas	40

1.4.2.6 Resistência as sulfonamidas	41
1.5 Outras alternativas terapêuticas	42
2 REFERÊNCIAS	44
3 JUSTIFICATIVA	58
4 OBJETIVO	59
4.1 Objetivo geral.....	59
4.1.1 Objetivos específicos.....	59
5 MANUSCRITOS CIENTÍFICOS.....	60
5.1 Manuscrito I	60
5.2 Manuscrito II.....	60
5.3 Manuscrito III	60
6 CONCLUSÕES.....	61
7 ANEXOS	63
7.1 Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UFCSPA.....	63
7.2 Outras publicações científicas.....	63
7.2.1 Publicação de 2017.....	63
7.2.2 Publicação de 2018.....	64
7.2.3 Publicação de 2019.....	64
7.2.4 Publicação de 2020.....	65
7.3 Manuscritos I, II e III	65

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 *Staphylococcus aureus*

Microrganismos do gênero *Staphylococcus* são cocos gram-positivos pertencentes à família *Staphylococcaceae*, imóveis, não formadores de esporos, com diâmetro aproximado de 0,5 a 1,5 μm . Quando observados em microscopia óptica, aparecem como células únicas, em pares ou agrupadas (KONEMAN et al., 2018; MADIGAN et al., 2016).

Até o momento, o gênero *Staphylococcus* possui 54 espécies e 28 subespécies (LPSN, 2019), sendo *S. aureus* a espécie de maior relevância clínica (DWEBA, ZISHIRI e EL ZOWALATY, 2018; LEE et al., 2018). Esta foi identificada pela primeira vez em 1880, no Reino Unido, pelo cirurgião escocês Alexandre Ogston, em pus de abscessos cirúrgicos (KONEMAN et al., 2018).

O *S. aureus* cresce em meios de cultura não seletivo com colônias lisas, arredondadas e brilhantes, em condição ótima de crescimento a 37°C, podendo variar sua coloração de clara a dourada dependendo da temperatura de cultivo. Possui alta capacidade de adaptação, podendo sobreviver e se multiplicar em ambientes hostis. É anaeróbico facultativo, apresenta crescimento em ágar sal manitol, provoca beta-hemólise em ágar sangue, produz as enzimas catalase, coagulase e DNase (INGRAHAM e INGRAHAM, 2011; KONEMAN et al., 2018).

Como microrganismo oportunista, comporta-se tanto como comensal quanto como patógeno (DWEBA, ZISHIRI e EL ZOWALATY, 2018). É encontrado colonizando a microbiota normal da pele e de outros sítios anatômicos como a nasofaringe, axila, períneo e trato gastrointestinal (BELKUM, 2016; GAGNAIRE, 2017), podendo se tornar patogênico e causar diversas infecções, quando ocorre ruptura da barreira cutânea ou diminuição da imunidade (LEE et al., 2018).

1.2 Patogenicidade

Staphylococcus aureus é uma das causas mais frequentes de infecções comunitárias e relacionadas à assistência à saúde, as quais apresentam taxas significativas de morbidade e mortalidade (ZHANG et al., 2015; PENG et al., 2018; TURNER et al., 2019). Sua transmissão ocorre por contato direto com indivíduos colonizados ou infectados, ou por contato indireto

com superfícies ou itens previamente contaminados (KHAN, AHMAD e MEHBOOB, 2015; PEARSON et al., 2019).

A maioria das infecções estafilocócicas resulta de portadores assintomáticos, em que o indivíduo pode ser colonizado por período indeterminado, causando doença quando há comprometimento do sistema imunológico (KARANIKA et al., 2016; GOLDMANN e MEDINA, 2018). Na população, cerca de 20% das pessoas são portadoras persistentes, 60% são colonizadas de forma intermitente e o restante da população não alberga *S. aureus* (JENKINS et al., 2015; HASSOUN, LINDEN e FRIEDMAN, 2017; MOREMI et al., 2019). A colonização aumenta o risco de infecção em 25% e as cepas colonizadoras correspondem geneticamente às cepas infectantes em 50% a 80% dos casos (TURNER et al., 2019).

O maior problema do portador assintomático é que, mesmo não apresentando sinais ou sintomas clínicos de doença, representa potencial fonte de infecção, e pode estar disseminando o patógeno pelos ambientes em que circula (LEE et al., 2018). O estado de portador assintomático é ainda mais preocupante, quando este é um profissional da saúde, visto que infecções relacionadas à assistência à saúde podem ser adquiridas indiretamente através do contato com as mãos contaminadas das equipes assistenciais (MOREMI et al., 2019).

A versatilidade desse patógeno, torna-o responsável por causar uma gama de infecções que se caracterizam pela variedade de manifestações clínicas, incluindo desde quadros localizados até doenças sistêmicas de alta letalidade (KAHL, BECKER e LÖFFLER, 2016; DWEBBA, ZISHIRI e EL ZOWALATY, 2018). Dentre as síndromes infecciosas, podemos elencar três tipos principais: infecções superficiais, como infecções de pele e tecidos moles; infecções sistêmicas, como bacteremia, osteomielite, pneumonia, endocardite e meningite; e infecções associadas às toxinas estafilocócicas, como intoxicação alimentar, síndrome da pele escaldada e síndrome do choque tóxico (BIEN, SOKOLOVA e BOZKO, 2011; TONG et al., 2015; OLIVEIRA, BORGES e SIMÕES, 2018).

1.3 Fatores de virulência

A patogenicidade e complexidade das infecções causadas por *S. aureus* estão relacionadas a um arsenal de fatores de virulência que auxiliam na colonização, adesão às células hospedeiras, evasão do sistema imune, invasão dos tecidos, produção de toxinas e disseminação do patógeno, os quais contribuem para o estabelecimento e a permanência do processo infeccioso (LIU et al., 2015; YU et al., 2015).

A infecção estafilocócica se inicia com a adesão às superfícies, mediada por adesinas denominadas coletivamente de componentes da superfície microbiana que reconhecem moléculas de matriz adesiva (MSCRAMMs, do inglês *microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*). Integram os MSCRAMMs: a proteína A (SpA, do inglês *staphylococcal protein A*) que se liga à região Fc da imunoglobulina G inibindo a opsonização e a fagocitose; as proteínas de ligação à fibronectina (FnbpA, do inglês *fibronectin-binding protein A* e FnbpB, do inglês *fibronectin-binding protein B*); a proteína de ligação ao colágeno (Cna, do inglês *collagen-binding protein*); e os fatores de agregação (CflA, do inglês *clumping factor proteins A* e CflB, do inglês *clumping factor proteins B*) que se ligam ao fibrinogênio conferindo propriedades antifagocíticas (BIEN, SOKOLOVA e BOZKO, 2011; DAYAN et al., 2016; WARYAH et al., 2016).

Alguns componentes estruturais também são determinantes de virulência, tais como os polissacarídeos capsulares que impedem a fagocitose e promovem a adesão às células hospedeiras; o ácido teicoico que estimula a produção de interleucina-1; e o peptideoglicano capaz de ativar o sistema complemento e aumentar a quimiotaxia das células polimorfonucleares (KONEMAN et al., 2018).

Junto aos fatores supracitados, também produz toxinas como as enterotoxinas estafilocócicas (SEs, do inglês *staphylococcal enterotoxins*) que estão associadas a quadros de intoxicação alimentar; a leucocidina de Pantón-Valentine (PVL, do inglês *Panton-Valentine leucocidin*) responsável pela formação de poros na membrana dos leucócitos induzindo à citólise, fator importante em pneumonia necrotizante; a toxina 1 da síndrome do choque tóxico estafilocócico (TSST-1, do inglês *toxic-shock syndrome toxin-1*), a qual estimula a proliferação de linfócitos T, causando a síndrome do choque tóxico; a toxina esfoliativa estafilocócica (ETs, do inglês *staphylococcal exfoliative toxins*) que induz eritema e esfoliação da pele, fenômeno observado na síndrome da pele escaldada; e a alfa, beta e delta-hemolisina que apresentam atividade hemolítica (KONG, NEOH e NATHAN, 2016; MURRAY, ROSENTHAL e PFALLER, 2017; KONEMAN et al., 2018).

Da mesma maneira, pode secretar: enzimas extracelulares como a catalase, que inativa o peróxido de hidrogênio no interior de células fagocíticas; a coagulase, que catalisa a conversão de fibrinogênio em fibrina; a fibrinolisinase, que degrada coágulos de fibrina facilitando a disseminação do patógeno; a hialuronidase, que promove a disseminação dos microrganismos pelos tecidos, por meio da degradação do ácido hialurônico; a lipase, que degrada lipídeos facilitando sua disseminação nos tecidos cutâneos e subcutâneos; e a

fosfolipase, que destrói os fosfolipídios da membrana citoplasmática do hospedeiro, acarretando na lise das células (MURRAY, ROSENTHAL e PFALLER, 2017; KONEMAN et al., 2018).

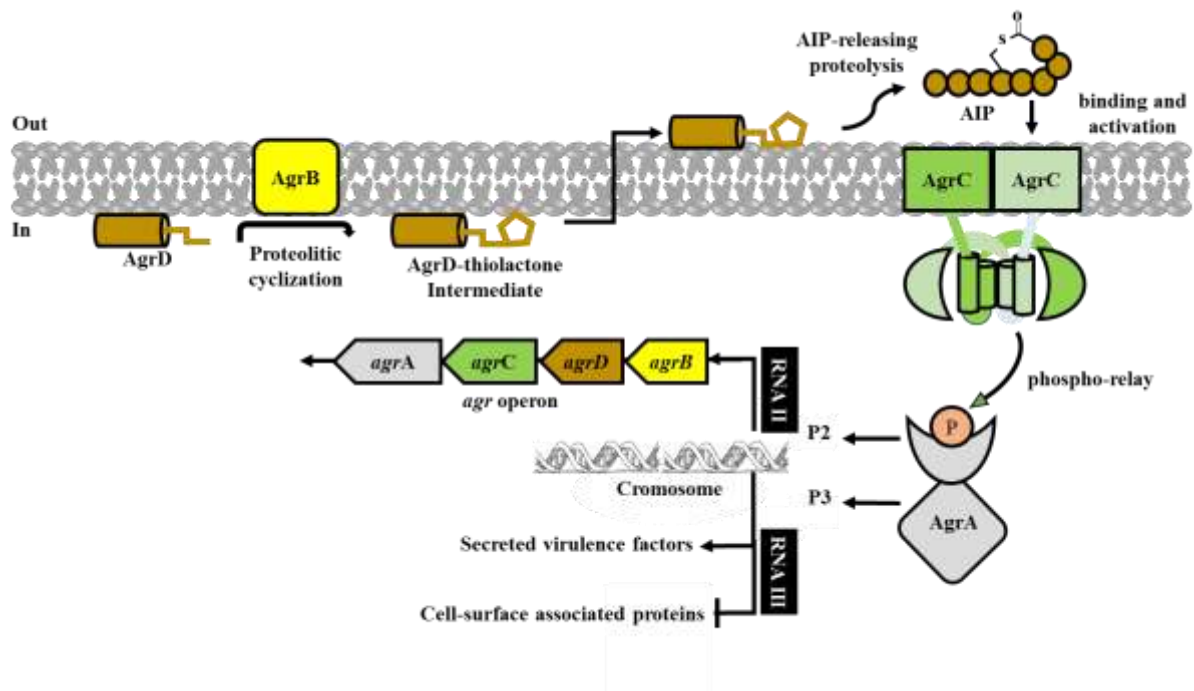
Uma variedade desses fatores de virulência é necessária para estabelecer e sustentar a doença infecciosa e a sua produção depende da fase de crescimento. Durante a fase de latência e início da exponencial, o *S. aureus* produz fatores associados à parede celular que auxiliam na adesão aos tecidos e na evasão do sistema imune, contribuindo com o acúmulo do patógeno no sítio de infecção. Ao atingir a fase exponencial tardia, começa a secretar exoproteínas, incluindo proteases, hemolisinas e superantígenos, e ao mesmo tempo ocorre a diminuição da regulação de fatores associados à parede celular, facilitando a disseminação da infecção (WANG e MUIR, 2016).

A transição entre essas duas fases ocorre através de um processo de comunicação celular chamado *quorum sensing* (QS), que controla a expressão de genes em resposta à densidade celular bacteriana através da produção e detecção de sinais extracelulares (KONG, NEOH e NATHAN, 2016; ABISADO et al., 2018). Os sinais deste sistema são pequenos peptídeos autoindutores (AIP, do inglês *autoinducing peptide*). As bactérias geram continuamente o AIP, começando em baixas concentrações quando há baixa densidade populacional bacteriana. À medida que a densidade celular aumenta, os AIPs se acumulam em concentrações críticas, o que ativa o regulador transcricional. Este, por sua vez, regula a expressão de genes, os quais incluem vários fatores de virulência (ABISADO et al., 2018; PADDER, PRASAD e SHAH, 2018).

1.3.1 Regulador gene acessório

O *locus* cromossômico responsável pela atividade QS em *S. aureus* é denominado regulador gene acessório (*agr*, do inglês *accessory gene regulator*). No *locus agr* (**Figura 1**), dois *operons* são transcritos de forma divergente, a partir dos promotores, P2 e P3, que produzem RNA II e RNA III, respectivamente. O operon P2, que codifica o RNA II, é composto por quatro genes, *agrBDCA*, que codificam fatores necessários para sintetizar o AIP e ativar a cascata reguladora. O operon P3, que codifica o RNA III, que regula fatores de virulência e também contém o gene *hld* responsável pela síntese da delta-hemolisina (CÁZARES-DOMÍNGUEZ et al., 2015; KONG, NEOH e NATHAN, 2016; YAMAZAKI, NAKAMURA e NÚÑEZ, 2017; SALAMA e QUAVE, 2018; TAN et al., 2018; COSGRIFF et al., 2019).

Figura 1 - Estrutura do sistema *agr* em *Staphylococcus aureus*.



Fonte: adaptada de WANG e MUIR (2016).

Os produtos dos genes *agrB* e *agrD*, respectivamente as proteínas AgrB e AgrD, unem-se formando o AIP, que é liberado para o meio extracelular. O AgrD, o precursor do AIP, é primeiro processado proteoliticamente por uma peptidase ligada à membrana, o AgrB, para gerar um intermediário tiolactona. Este intermediário é exportado através da membrana, e então submetido a uma segunda clivagem para liberar o AIP no espaço extracelular (KONG, NEOH e NATHAN, 2016; WANG e MUIR, 2016; JENUL e HORSWILL, 2019).

Em concentrações críticas, AIP é detectado pelo AgrC, o sensor de histidina quinase ligado à membrana. A ligação do AIP ao receptor AgrC leva à autofosforilação da histidina, e esse sinal é retransmitido para o receptor de aspartato no regulador de resposta, AgrA. A proteína AgrA fosforilada, como indutor do promotor P2, regula a transcrição do RNA II e, consequentemente, a síntese das quatro proteínas Agr fundamentais na síntese do AIP. AgrA, como indutor do promotor P3, regula a transcrição do RNA III, um RNA mensageiro (mRNA) que funciona como indutor ou repressor de genes acessórios (KONG, NEOH e NATHAN, 2016; WANG e MUIR, 2016; JENUL e HORSWILL, 2019).

O RNA III ativa a expressão de genes que codificam fatores de virulência secretados pela célula, que incluem as exoproteínas (alfa, beta e delta-hemolisinas e leucocidinas), enterotoxinas e toxina da síndrome do choque tóxico estafilocócico. Além disso, reduz a

expressão de fatores de virulência associados à célula, tais como a coagulase, proteína A, proteína de ligação à fibronectina e adesinas de superfície (KONG, NEOH e NATHAN, 2016; WANG e MUIR, 2016; TAN et al., 2018).

O polimorfismo do *agr* em *S. aureus* resulta em quatro grupos, *agrI*, *agrII*, *agrIII* e *agrIV*, baseados na ligação específica do AIP com o receptor AgrC. O polimorfismo nos genes *agrC* e *AgrD* resulta em alteração na sequência de aminoácidos do AIP e no correspondente receptor AgrC, sendo a ligação da AIP com seu receptor específica para cada grupo alélico. Quando ocorre ligação de um AIP de um grupo alélico ao receptor AgrC de um outro grupo, o AIP não produz fator intrínseco e não produz o sinal através da proteína AgrC, funcionando, portanto, como um antagonista. Um AIP somente é agonista para seu próprio grupo alélico, de forma que bactérias de grupo *agr* diferentes interferem na regulação de proteínas acessórias uma com a outra (WANG e MUIR, 2016; TAN et al., 2018).

Apesar da importância do *agr* na virulência estafilocócica, alguns estudos sugerem que a disfunção no *agr* confere vantagens de sobrevivência para o *S. aureus* em ambiente hospitalar (YANG et al., 2019) e piores desfechos clínicos, como bacteremia persistente e aumento da mortalidade (GOMES-FERNANDES et al., 2017; THOMPSON e BROWN, 2017; ABDULGADER, 2020). No estudo conduzido por Kang e colaboradores (2017), a disfunção no *agr* foi relatada como um fator de risco independente para mortalidade em pacientes com bacteremia persistente. Em 2014, Viedma e colaboradores (2014) avaliaram a relação entre disfunção no *locus agr* e reduzida suscetibilidade para vancomicina, e os resultados mostraram correlação significativa. Corroborando com este resultado, Chong e colaboradores (2013), ao avaliar 639 pacientes com bacteremia por *S. aureus*, observaram uma significativa associação entre disfunção do *agr* e heterorresistência à vancomicina.

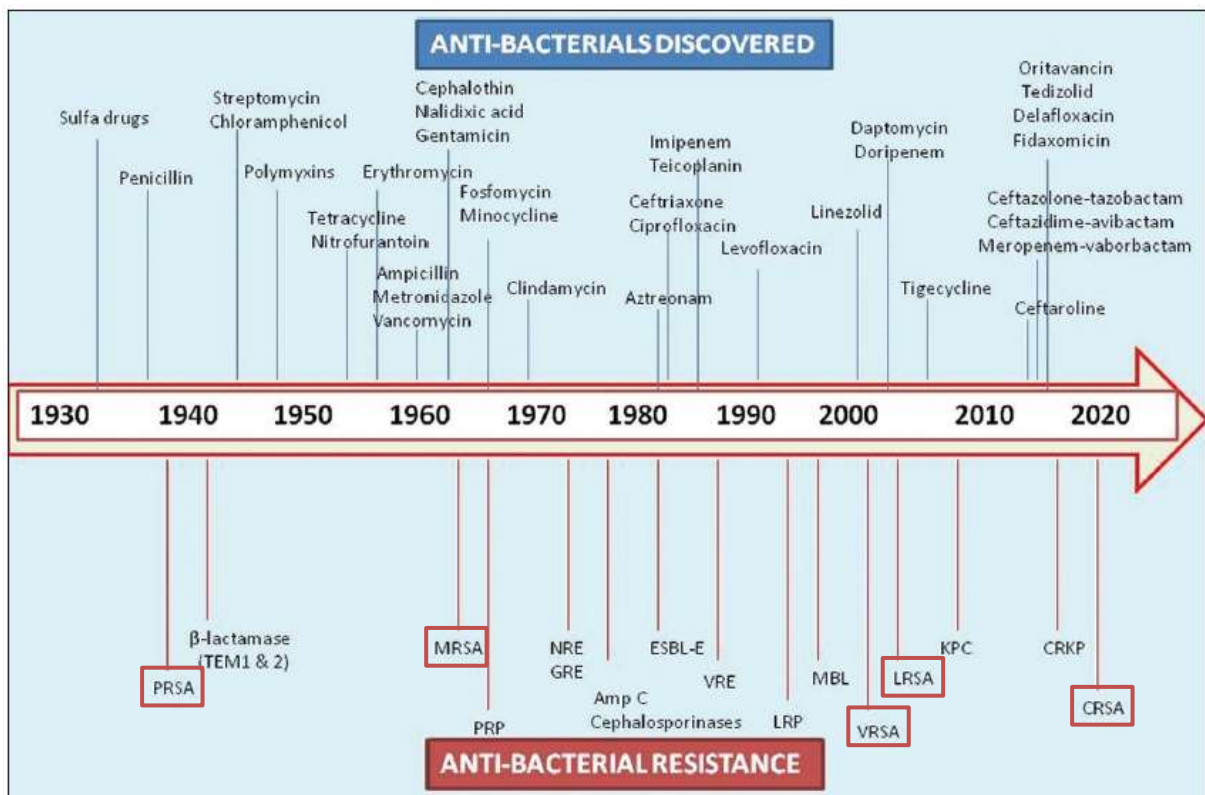
Além da importância do *agr* para a patogenicidade estafilocócica, vários estudos têm mostrado uma relação entre polimorfismo do grupo *agr* e reduzida suscetibilidade à vancomicina. Alguns dados têm demonstrado que *agrII* está frequentemente associado à reduzida suscetibilidade e falhas no tratamento com vancomicina (PARK et al., 2015; CECHINEL et al., 2016). Além disso, Cechinel e colaboradores (2016) relataram que o risco de morte aumenta 12,6 vezes em pacientes com bacteremia por MRSA que expressa o *agrII* quando comparado com aqueles com bacteremia por MRSA que expressa *agrI*. No estudo conduzido por Cázares-Domínguez e colaboradores (2015), o polimorfismo do *agr* tipo II foi o mais prevalente entre isolados de MRSA resistente a múltiplos antimicrobianos. Em 2015, Park e colaboradores (2015), ao avaliar 188 MRSA de cultura sanguínea, observaram que entre os

MRSAs com CIM de 2 µg/mL a presença do *agrII* foi significativa em comparação com outros tipos de *agr*.

1.4 Resistência aos antimicrobianos

A era moderna dos antimicrobianos começou com a descoberta da penicilina por Alexander Fleming. Desde então, inúmeras doenças infecciosas se tornaram tratáveis com o uso de antimicrobianos, incluindo as infecções estafilocócicas. No entanto, a rápida aquisição de resistência por *S. aureus* se tornou um problema clínico significativo ao limitar a antibioticoterapia de infecções comunitárias e relacionadas à assistência à saúde (MCGUINNESS, MALACHOWA e DELEO, 2017; GAJDÁCS, 2019). A **Figura 2** ilustra a linha do tempo da descoberta ao desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos, em destaque as resistências observadas em *Staphylococcus aureus*.

Figura 2 - Linha do tempo da descoberta ao desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos.



Fonte: adaptada de SARAN, RAO e AZIM (2020).

PRSA: Penicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; MRSA: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; VRSA: Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*; LRSA: Linezolid-resistant *Staphylococcus aureus*; CRSA: Ceftaroline-resistant *Staphylococcus aureus*.

A capacidade do *S. aureus* de resistir a ação dos antimicrobianos se deve a presença de elementos genéticos móveis (MGEs, do inglês *mobile genetic elements*) no genoma acessório, que desempenha um papel essencial na adaptabilidade bacteriana, virulência e sobrevivência. As cepas de *S. aureus* contêm uma variedade de MGEs, tais como bacteriófagos, plasmídeos, transposons, cassetes cromossômicos e ilhas de patogenicidade, que são adquiridos por transferência horizontal (TURNER et al., 2019). O cassete cromossômico estafilocócico e o transposon Tn1546, em particular, confere resistência aos beta-lactâmicos e à vancomicina (LEE et al., 2018; CONG, YANG e RAO, 2020).

1.4.1 Resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos

1.4.1.1 Resistência à penicilina

A penicilina foi descoberta em 1928, pelo médico Alexander Fleming, sendo o fármaco de escolha para o tratamento de infecções estafilocócicas no início de 1940. No entanto, já em 1942 foi descrito o primeiro caso de *S. aureus* resistente à penicilina (PRSA, do inglês *penicillin-resistant Staphylococcus aureus*), devido à produção de beta-lactamase (penicilinase) codificada pelo gene *blaZ*. Esta enzima degrada o anel beta-lactâmico da penicilina, tornando-a assim incapaz de inibir a síntese da parede celular bacteriana. Atualmente, mais de 95% dos isolados são resistentes a esse antimicrobiano (PEACOCK e PATERSON, 2015; ALDMAN, SKOVBY e PAHLMAN, 2017; LOBANOVSKA e PILLA, 2017; MCGUINNESS, MALACHOWA e DELEO, 2017; DA COSTA et al., 2018; GAJDÁCS, 2019).

1.4.1.2 Resistência à metilina

A introdução da metilina, penicilina semissintética resistente à penicilinase, na década de 1960, surgiu como alternativa terapêutica para infecções por PRSA. Os antimicrobianos beta-lactâmicos inibem a biosíntese da parede celular através das proteínas de ligação à

penicilina (PBPs, do inglês *penicillin binding proteins*). Ao interagir com essa enzima, o beta-lactâmico impede a formação completa da camada de peptidoglicano, desencadeando a lise bacteriana (PEACOCK e PATERSON, 2015; FOSTER, 2017; HARKINS et al., 2017).

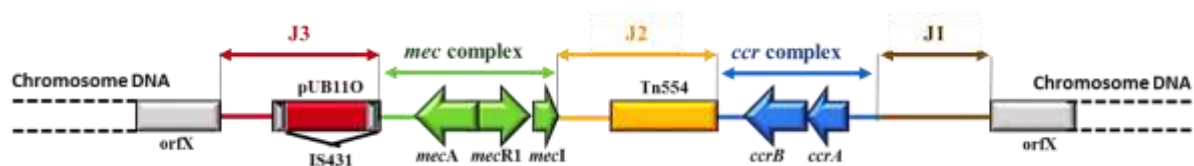
Contudo, em 1961, logo após sua introdução na clínica foi identificado o primeiro isolado de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA, do inglês *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*). A resistência à meticilina ocorre devido à aquisição do gene *mecA* (2,1Kb), que codifica uma proteína de ligação à penicilina alterada (PBP 2a ou PBP2'; 77 kDa). Esta apresenta baixa afinidade ao anel beta-lactâmico, o que possibilita a síntese da parede celular de maneira íntegra, tornando-se assim resistente a todos os antimicrobianos beta-lactâmicos, com exceção das cefalosporinas de quinta geração, como a ceftarolina (PEACOCK e PATERSON, 2015; FOSTER, 2017; LOBANOVSKA e PILLA, 2017; DA COSTA et al., 2018; LEE et al., 2018).

O gene *mecA* é parte integrante de um elemento genético móvel denominado cassette cromossômico estafilocócico *mec* (SCC*mec*, do inglês *staphylococcal cassette chromosome mec*), que se encontra localizado em uma região específica do genoma, denominada *attBsc*, na extremidade 3' do gene *orfX* (PEACOCK e PATERSON, 2015; GAJDÁCS, 2019; TURNER et al., 2019). Além do *mecA*, a resistência à meticilina ocorre pela aquisição do gene *mecC*, que codifica uma proteína homóloga à PBP 2a (PBP2a_{LGA}). O *mecC* faz parte do SCC*mec* XI, possui 70% de homologia nucleotídica com o *mecA* e está relacionado à transmissão zoonótica de MRSA (DUPIEUX et al., 2017; LEE et al., 2018; GAJDÁCS, 2019).

1.4.1.2.1 Cassete cromossômico estafilocócico *mec*

O gene *mecA* está localizado no elemento genético móvel denominado SCC*mec* (**Figura 3**), que é constituído basicamente pela presença de repetições diretas e invertidas, pelo complexo do gene *mec* e do gene *ccr*, e pelas regiões de junção (J, do inglês *junkyard*) (TURLEJ, HRYNIEWICZ e EMPEL, 2011; ITO et al., 2014).

Figura 3 - Estrutura geral do elemento SCC*mec*.



Fonte: adaptada de HIRAMATSU et al. (2013).

As sequências de repetições terminais flanqueiam o SCC*mec* no genoma bacteriano, especificado pela complementariedade de bases. O complexo *mec* contém o gene de resistência à meticilina (*mecA*) e seus reguladores (*mecR1* e *mecI*), que codificam a proteína transdutora (MecR1) e repressora (MecI), respectivamente. Quando o gene *mecR1* é truncado pelas sequências de inserção (IS431 ou IS1272), os complexos *mec* são diferentes e categorizados pelas classes A, B, C₁, C₂ e E. O complexo *ccr* é composto por genes de recombinases, responsáveis por integrar ou excisar o SCC*mec* no genoma, e por regiões de leitura aberta (ORFs, do inglês *open reading frames*). As regiões variáveis do SCC*mec* são as regiões J (J1, J2 e J3), que estão localizadas estruturalmente entre e ao redor dos complexos (*mec* e *ccr*) (TURLEJ, HRYNIEWICZ e EMPEL, 2011; ITO et al., 2014; LAWUNG et al., 2014; MONECKE et al., 2016).

A expressão do gene *mecA* é controlada pelo sistema de genes regulatórios *mecI* e *mecR1*, presentes no genoma do MRSA. O gene *mecI*, codifica a proteína repressora (MecI), que reprime a transcrição do gene *mecA* e seus reguladores *mecR1* e *mecI* na ausência dos beta-lactâmicos, através da ligação à região operadora destes genes. Isso significa que na ausência do beta-lactâmico no ambiente em que a bactéria está exposta, não ocorrerá transcrição do gene *mecA* e nem de seus genes reguladores. Já o *mecR1*, codifica proteína indutora (MecR1), que na presença do beta-lactâmico cliva a proteína repressora MecI, que está ligada à região operadora do *mecA*, permitindo assim a transcrição do gene *mecA* e subsequente síntese da proteína de ligação à penicilina alterada (IWG-SCC, 2009; TURLEJ, HRYNIEWICZ e EMPEL, 2011).

A integração e a excisão do SCC*mec* no cromossomo são mediadas pelas recombinases da família invertase/resolvase e, por isso, são responsáveis pela mobilidade do SCC*mec*. As recombinases são codificadas por três genes *ccr* filogeneticamente distintos, *ccrA*, *ccrB* e *ccrC*, com similaridade nucleotídica abaixo de 50%. Em geral, genes *ccr* com identidade nucleotídica maior que 85% são designados ao mesmo alótipo, enquanto que genes *ccr* de diferentes alótipos têm identidade nucleotídica entre 60% e 82%. Os genes *ccrA*, *ccrB* e *ccrC* são diferenciados em quatro (*ccrA1*, *ccrA2*, *ccrA3* e *ccrA4*), cinco (*ccrB1*, *ccrB2*, *ccrB3*, *ccrB4* e *ccrB6*) e dois (*ccrC1* e *ccrC2*) alótipos, respectivamente. Com base nas diferenças e combinações dos alótipos *ccr*, oito tipos do complexo *ccr* já foram descrito em *S. aureus* (IWG-SCC, 2009; WU et al., 2015; BAIG et al., 2018).

Além dos complexos *mec* e *ccr*, o SCC*mec* contém três regiões J, designadas J1, J2 e J3. A região J1 se situa à direita do complexo *ccr*, a J2 entre os complexos *ccr* e *mec*, e a J3 do

complexo *mec* até a *orfX*. Com exceção dos SCC*mec* VII, IX, XII e XIII, o complexo *ccr* está posicionado entre as regiões J3 e J2 e o complexo *mec* entre as regiões J2 e J1 (**Figura 4**). Apesar de as regiões J serem consideradas menos importantes em termos de funções do SCC*mec*, estas são epidemiologicamente significativas, uma vez que podem servir como alvos para plasmídeos (pUB110 e pT181) ou transposons (Tn4001, Tn554 e Ψ Tn554), os quais podem carregar determinantes adicionais de resistência e virulência (TURLEJ, HRYNIEWICZ e EMPEL, 2011; ITO et al., 2014; BAIG et al., 2018).

Os tipos de SCC*mec* são definidos pela combinação da classe do complexo *mec* e o tipo de complexo *ccr*, e os subtipos de acordo com as diferenças nas regiões J (TURLEJ, HRYNIEWICZ e EMPEL, 2011; LAWUNG et al., 2014; WU et al., 2015). Até o momento, existem treze tipos de SCC*mec* (I-XIII) (BAIG et al., 2018), e esta classificação é muito utilizada na tipagem molecular de MRSA (NAGASUNDARAM e SISTLA, 2019).

O primeiro tipo de SCC*mec* foi identificado no Japão, na cepa de MRSA N315, em 1999. Outros dois tipos de SCC*mec* foram determinados num curto intervalo de tempo, obtidos a partir de diferentes cepas de MRSA, denominados como SCC*mec* do tipo II e III (ITO et al., 2001). Desde então, foram descobertos o SCC*mec* IV (MA et al., 2002), SCC*mec* V (ITO et al., 2004), SCC*mec* VI (OLIVEIRA, MILHEIRIÇO e DE LENCASTRE, 2006), SCC*mec* VII (BERGLUND et al., 2008), SCC*mec* VIII (ZHANG et al., 2009), SCC*mec* IX e X (MCCARTHY e LINDSAY, 2010), SCC*mec* XI e XII (WU et al., 2015), e SCC*mec* XIII (BAIG et al., 2018). As especificações de cada tipo de elemento SCC*mec* estão listadas na **Tabela 1**.

Tabela 1 - Especificações dos tipos de SCC*mec*^a.

SCC <i>mec</i>	Complexo <i>mec</i>	Estrutura do complexo <i>mec</i>	Complexo <i>ccr</i>
I	B	IS431- <i>mecA</i> - Δ <i>mecR1</i> -IS1272	1 (A1B1)
II	A	IS431- <i>mecA</i> - <i>mecR1</i> - <i>mecI</i>	2 (A2B2)
III	A	IS431- <i>mecA</i> - <i>mecR1</i> - <i>mecI</i>	3 (A3B3)
IV	B	IS431- <i>mecA</i> - Δ <i>mecR1</i> -IS1272	2 (A2B2)
V	C2 ^c	IS431- <i>mecA</i> - Δ <i>mecR1</i> -IS431	5 (C1)
VI	B	IS431- <i>mecA</i> - Δ <i>mecR1</i> -IS1272	4 (A4B4)
VII	C1 ^b	IS431- <i>mecA</i> - Δ <i>mecR1</i> -IS431	5 (C1)
VIII	A	IS431- <i>mecA</i> - <i>mecR1</i> - <i>mecI</i>	4 (A4B4)
IX	C2 ^c	IS431- <i>mecA</i> - Δ <i>mecR1</i> -IS431	1 (A1B1)
X	C1 ^b	IS431- <i>mecA</i> - Δ <i>mecR1</i> -IS431	7 (A1B6)
XI	E ^d	<i>blaZ</i> - <i>mecA</i> _{LGA251} - <i>mecR1</i> _{LGA251} - <i>mecI</i> _{LGA251}	8 (A1B3)
XII	C2 ^c	IS431- <i>mecA</i> - Δ <i>mecR1</i> -IS431	9 (C2)
XIII	A	IS431- <i>mecA</i> - <i>mecR1</i> - <i>mecI</i>	9 (A)

^aTabela adaptada de WU et al. (2015), BAIG et al. (2018) e IWG-SCC (2020).

^bClasse C1: IS431 *upstream* e *downstream* do *mecA* são organizados na mesma direção.

^cClasse C2: IS431 *upstream* e *downstream* do *mecA* são organizados em direção oposta.

^dClasse E do complexo *mec* possui o gene *mecC*, um homólogo do *mecA*.

1.4.1.2.2 CA-MRSA, HA-MRSA e LA-MRSA

Staphylococcus aureus resistentes à meticilina surgiram na década de 60, após a introdução da meticilina na prática clínica, e rapidamente se disseminaram, sendo reponsáveis por numerosos surtos hospitalares em todo o mundo. Já na década de 90, foram reportados casos

de infecções fora do ambiente hospitalar causadas por linhagens específicas de MRSA, denominadas MRSAs adquiridos na comunidade (CA-MRSA, do inglês *community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus*), que possuíam maior suscetibilidade aos antimicrobianos e virulência associada, quando comparadas com as linhagens hospitalares (HA-MRSA, do inglês *hospital-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus*) (KONG, JOHNSON e JABRA-RIZK, 2016; CHOO, 2017; PENG et al., 2018; TURNER et al., 2019).

CA-MRSAs são obtidos de pacientes ambulatoriais ou em até 48 horas após a admissão no hospital, que não apresentam histórico de infecção ou colonização por MRSA, sem relatos de internação prévia ou submissão a procedimentos invasivos no último ano. Normalmente estão associados a infecções de pele e tecidos moles e a infecções fulminantes, como pneumonia necrotizante e fascíte necrosante. Apresentam suscetibilidade a antimicrobianos não beta-lactâmicos e carregam elementos SCC*mec* menores, tipos IV ou V. Na maioria dos casos, carregam genes codificadores da PVL, *lukS*-PV e *lukF*-PV, que conferem aos CA-MRSA maior virulência (KALE e DHAWAN, 2016; KONG, JOHNSON e JABRA-RIZK, 2016; CHOO, 2017; DWEBA, ZISHIRI e EL ZOWALATY, 2018; KATEETE et al., 2019).

HA-MRSAs, por sua vez, são mais prevalentes em pacientes com doenças graves, hospitalização prolongada, internação em unidade de terapia intensiva (UTI), exposição a antimicrobianos, colonização e/ou infecção por MRSA. Acometem principalmente idosos, neonatos, imunocomprometidos e pacientes sob hemodiálise, pós-cirurgia ou em uso de dispositivos invasivos. Causam infecções sistêmicas, como bacteremia, endocardite e pneumonia; infecções por dispositivos médicos, como cateteres intravasculares e próteses ortopédicas; e, menos comuns, infecções de pele e de tecidos moles, particularmente quando submetidos a procedimentos invasivos. Normalmente albergam elementos SCC*mec* maiores, tipos I, II ou III, que possuem genes de resistência aos não beta-lactâmicos, e tendem a ter resistência a múltiplos antimicrobianos (KONG, JOHNSON e JABRA-RIZK, 2016; CHOO, 2017; DWEBA, ZISHIRI e EL ZOWALATY, 2018; KATEETE et al., 2019).

Por longo período, as linhagens de MRSA foram classificadas como CA-MRSA ou HA-MRSA, de acordo com a sua patogenicidade, resistência aos antimicrobianos e características moleculares. No entanto, a distinção entre estes dois grupos epidemiológicos se tornou difícil, devido à crescente frequência de CA-MRSA no ambiente hospitalar, bem como de HA-MRSA na comunidade. Além disso, cepas de CA-MRSA podem causar infecções hospitalares e HA-MRSA infecções comunitárias, principalmente quando pacientes com CA-MRSA necessitam

de hospitalização (POPOVICH et al., 2017; LAKHUNDI e ZHANG, 2018; LEE et al., 2018; ROSSATO et al., 2019).

Além do CA-MRSA e HA-MRSA, foi identificada uma nova estirpe de MRSA, com potencial zoonótico, tendo sido designada de MRSA associado a animais de produção (LA-MRSA, do inglês *livestock-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus*). O LA-MRSA se originou em humanos como *S. aureus* suscetível à meticilina, tendo se disseminado, posteriormente, para os animais de produção, onde adquiriu resistência à meticilina. Dados sugerem que a transmissão de humanos para os animais foi acompanhada por uma diminuição da capacidade de colonização, transmissão e virulência (SMITH, 2015; VAN CLEEF et al., 2016; DWEBE, ZISHIRI e EL ZOWALATY, 2018; BERNIER-LACHANCE et al., 2020).

O LA-MRSA tem sido associado a infecções localizadas, como infecções de pele e tecidos moles, bem como infecções graves e invasivas, como bacteremia, endocardite, osteomielite e pneumonia. Predominantemente, coloniza e infecta cuidadores de animais, como avicultores, fazendeiros e veterinários, e seus familiares através da transmissão direta. No entanto, acredita-se que a colonização depende da frequência e intensidade do contato com os animais e a duração da exposição, pois o gado é colonizado temporariamente e não permanentemente. No entanto, há relatos de LA-MRSA em indivíduos sem contato com animais, e nesses casos, foram questionadas a propagação por contaminação ambiental e, menos comum, a transmissão de origem alimentar (LARSEN et al., 2015; BANGERTER et al., 2016; BECKER et al., 2017; GOERGE et al., 2017; LEE et al., 2018; ANJUM et al., 2019).

1.4.1.2.3 Relevância clínica

O MRSA é um desafio importante na terapia estafilocócica, não apenas por ser causador de infecções comunitárias e relacionadas à assistência à saúde, mas também por apresentar resistência a múltiplos antimicrobianos, o que o torna um dos microrganismos multirresistentes de alta prioridade para a pesquisa e desenvolvimento de novos antimicrobianos (LEE et al., 2018; TURNER et al., 2019).

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (WHO, do inglês *World Health Organization*) obtidos no primeiro relatório global de resistência aos antimicrobianos, a prevalência de MRSA em todas as regiões estudadas foi maior que 20%, e em algumas excedia 80%. Além disso, nos pacientes com infecções por MRSA houve um aumento significativo na

mortalidade ($p < 0,00001$), na progressão para choque séptico ($p < 0,0001$) e no prolongamento da permanência hospitalar ($p < 0,00001$) em comparação às infecções por MSSA (WHO, 2014).

No estudo realizado durante o ano de 2015, em três estados dos Estados Unidos, o Sistema de Vigilância Núcleo Bacteriano Ativo (ABCs, do inglês *Active Bacterial Core Surveillance*) reportou o número de casos e a taxa de mortalidade (em 100.000 habitantes por ano) em doenças invasivas causadas por MRSA. Os casos de doenças foram epidemiologicamente classificados em: infecção de início hospitalar (HO, do inglês *hospital-onset*), infecção associada à assistência à saúde com início comunitário (HACO, do inglês *healthcare-associated community-onset*) e infecção associada à comunidade (CA, do inglês *community-acquired*). O número de casos e a taxa de mortalidade em HO, HACO e CA causados por MRSA foram, respectivamente: 439 e 0,5; 1.678 e 1,4; e 560 e 0,4 (CDC, 2015).

No estudo realizado pelo Consórcio Internacional de Controle de Infecções Nosocomiais (INICC, do inglês *International Nosocomial Infection Control Consortium*) em 45 países da África, Europa, América Latina, Sudeste da Ásia, Mediterrâneo Oriental e Pacífico Ocidental, entre 2012 e 2017, a prevalência de MRSA em UTI com infecção de corrente sanguínea associada a cateter central (CLABSI, do inglês *central line-associated bloodstream infection*), infecção do trato urinário associada a cateter (CAUTI, do inglês *catheter-associated urinary tract infection*) e pneumonia associada à ventilação (VAP, do inglês *ventilator-associated pneumonia*) foram, respectivamente: 64,7%, 57,1% e 41,8% (ROSENTHAL et al., 2019).

Em 2017, segundo o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC, do inglês *Centers for Disease Control and Prevention*), 323.700 pacientes hospitalizados apresentaram infecções por MRSA, sendo que 10.600 casos resultaram em morte nos EUA (CDC, 2019). Entre 2015 e 2017, 311.897 infecções hospitalares (HAI, do inglês *healthcare associated infection*) ocorridas em 5.626 hospitais foram reportadas para a Rede de Segurança Nacional de Saúde (NHSN, do inglês *National Healthcare Safety Network*). Neste estudo, *S. aureus* foi o segundo patógeno mais frequente em HAI em adultos, o mais prevalente em CLABSI em enfermaria (15,5%) e em VAP em UTI (28,8%). Além disso, este patógeno é a principal causa de infecções de sítios cirúrgicos (SSI, do inglês *surgical site infection*), especialmente em cirurgias ortopédicas (38,6%), obstétricas/ginecológicas (15,2%) e cardíacas (WEINER-LASTINGER et al., 2020).

1.4.2 Resistência aos antimicrobianos não beta-lactâmicos

1.4.2.1 Resistência aos glicopeptídeos

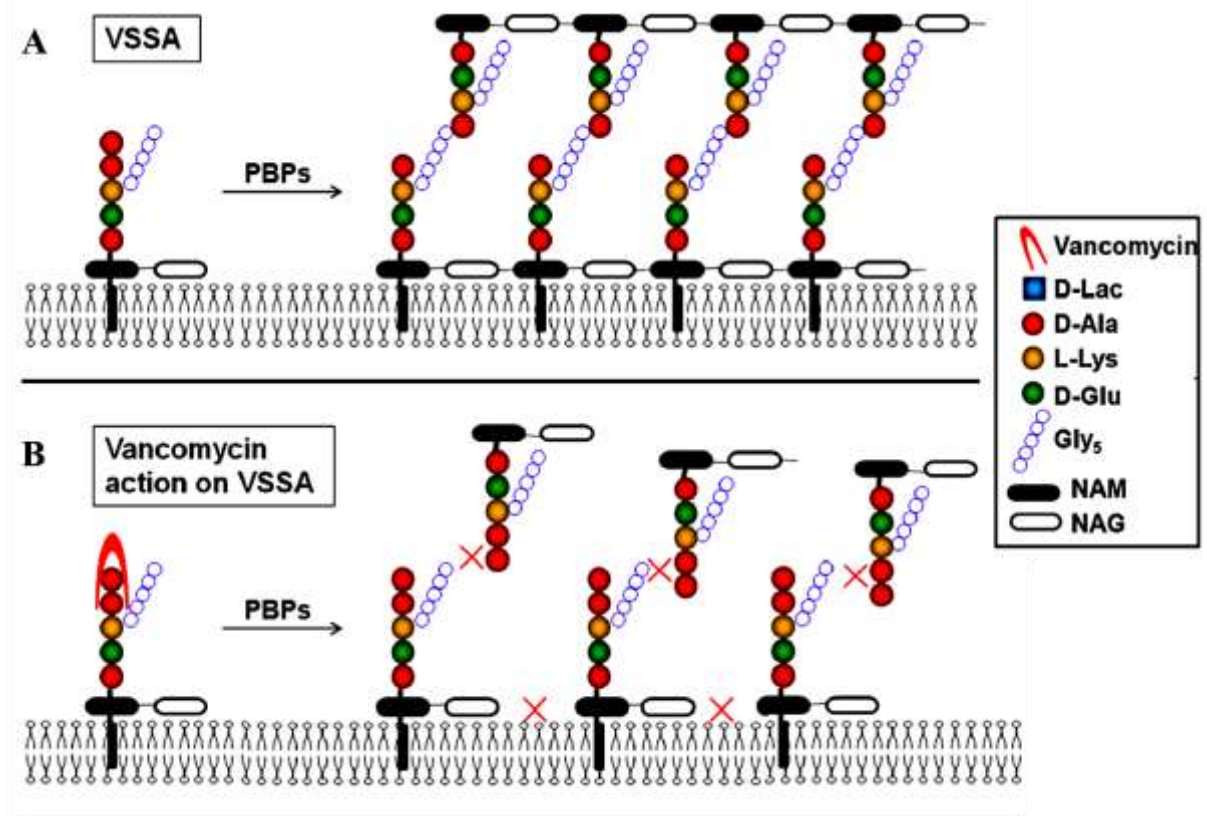
1.4.2.1.1 Reduzida suscetibilidade à vancomicina

A vancomicina, antimicrobiano da classe dos glicopeptídeos, foi aprovada em 1958 para o tratamento de infecções causadas por PRSA. No entanto, a meticilina, primeira penicilina semissintética, foi aprovada no mesmo ano com menor grau de toxicidade. Devido à nefrotoxicidade e à ototoxicidade, o uso da vancomicina ficou restrito a pacientes alérgicos aos betalactâmicos ou com infecções causadas por microrganismos resistentes aos novos antimicrobianos (LEVINE, 2006). Atualmente, a vancomicina é a principal opção terapêutica para infecções causadas por MRSA e para tratamento de pacientes alérgicos a penicilinas ou cefalosporinas (RUBINSTEIN e KEYNAN, 2014).

A vancomicina inibe a síntese da parede celular em gram-positivos ao se ligar ao terminal carboxílico de resíduos D-alanina-D-alanina (D-Ala-D-Ala) dos precursores peptídicos, formando um complexo não covalente estável, impedindo a elongação do peptideoglicano na parede celular (HOWDEN et al., 2010; HU, PENG e RAO, 2016). Resumidamente, na multiplicação bacteriana a estrutura da parede celular (peptideoglicano) precisa ser sintetizada. Para isso, o precursor é adicionado ao peptideoglicano crescente via transglicosilação e transpeptidação pelas PBPs (**Figura 5A**). A molécula hidrofílica da vancomicina forma interações de ligação de hidrogênio com as porções terminais D-Ala-D-Ala do precursor peptídico. Esta ligação provoca alterações conformacionais que impedem a incorporação do precursor à cadeia crescente de peptideoglicano e a subsequente transpeptidação, levando à decomposição da parede celular e à lise bacteriana (**Figura 5B**) (HU, PENG e RAO, 2016; CONG, YANG e RAO, 2020).

A suscetibilidade à vancomicina, em *S. aureus*, é classificada em três fenótipos pelo manual do Instituto Norte-Americano de Padrões Clínicos e Laboratoriais (CLSI, do inglês *Clinical and Laboratory Standards Institute*): sensível à vancomicina com CIM menor ou igual a 2 µg/mL (VSSA), intermediário com CIM entre 4 e 8 µg/mL (VISA), e resistente com CIM maior ou igual a 16 µg/mL (VRSA) (CLSI, 2020). Além disso, existe o fenótipo hVISA, que são isolados sensíveis à vancomicina (CIM ≤ 2mg/L), tanto de MSSA quanto de MRSA, mas com uma subpopulação de células (10^{-5} a 10^{-6}), que apresenta níveis intermediários de resistência (CIM ≥ 4 mg/L) (DI GREGORIO et al., 2015; KOH et al., 2016; OTHMAN et al., 2019).

Figura 5 - Mecanismo de ação da vancomicina em VSSA.



Fonte: adaptada de CONG, YANG e RAO (2020).

(A) Síntese do peptidoglicano na parede celular. (B) Mecanismo de ação da vancomicina em VSSA. D-Ala: D-Alanina; D-lac: D-lactato; L-Lys: L-Lysina; D-Glu: D-glutamato; Gly₅: Pentaglicina; NAM: ácido N-acetilmurâmico; NAG: N-acetylglucosamine.

1.4.2.1.1.1 Heterorresistência ou resistência intermediária à vancomicina

O uso da vancomicina em infecções hospitalares e, por conseguinte, o aumento da pressão seletiva, trouxeram como consequência em 1996, no Japão, o aparecimento de *Staphylococcus aureus* com suscetibilidade intermediária à vancomicina (VISA, do inglês *vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus*), denominado Mu50 (HIRAMATSU et al., 1997b). No ano seguinte, também no Japão, foi isolado o primeiro *Staphylococcus aureus* com resistência heterogênea à vancomicina (hVISA, do inglês *heterogeneous vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus*), conhecido como Mu3 (HIRAMATSU et al., 1997a). A resistência desses fenótipos à vancomicina ocorre principalmente pela hiperprodução de resíduos D-ala–D-ala, alvo de ligação para os glicopeptídeos, que provoca espessamento da parede celular bacteriana e aprisionamento das moléculas de vancomicina e, assim, reduz o

acesso a seu sítio de ação, localizado no septo da divisão celular (DEVI et al., 2015; MCGUINNESS, MALACHOWA e DELEO, 2017).

1.4.2.1.1.1 Heterorresistência à vancomicina

A heterorresistência à vancomicina é caracterizada pela presença de uma população de células heterogêneas, derivadas da mesma cepa de *S. aureus*, com uma subpopulação que exibe níveis aumentados de resistência em comparação com a população original (ANDERSSON, NICOLOFF e HJORT, 2019). Em geral, os hVISA são sensíveis à vancomicina quando analisados por métodos convencionais, mas com uma subpopulação que apresentam níveis intermediários de resistência (DI GREGORIO et al., 2015). Acredita-se que os hVISA sejam precursores do fenótipo VISA, que possui resistência homogênea à vancomicina, uma vez que a exposição prolongada ao glicopeptídeo pode promover a seleção da subpopulação de células heterorresistentes (DEVI et al., 2015; MCGUINNESS, MALACHOWA e DELEO, 2017).

Os fenótipos hVISA/VISA se caracterizam pela baixa taxa de crescimento, parede celular espessa com reticulação reduzida do peptidoglicano, reduzida atividade autolítica de enzimas responsáveis pela renovação da parede celular, diminuição da atividade hemolítica, atenuada virulência, e, frequentemente, apresentam disfunção do sistema *agr* (DEVI et al., 2015; ZHU et al., 2015; MCGUINNESS, MALACHOWA e DELEO, 2017). Os principais preditores de infecção por hVISA/VISA são: infecção ou colonização prévia por MRSA, por no mínimo três meses; exposição prévia à vancomicina, em média por seis meses; bacteremia persistente, por mais de sete dias; e utilização de dispositivos médicos de longa permanência (HOWDEN, PELEG e STINEAR, 2014; GOMES, WARD e LAPLANTE, 2015).

Desde a descoberta do primeiro isolado no Japão, a presença de hVISA entre isolados de MRSA tem sido reportada em todo o mundo, com frequência variável. Em revisão sistemática, Zhang e colaboradores (2015) analisaram a prevalência de hVISA entre os isolados de MRSA de diferentes períodos de estudo, amostras clínicas e *backgrounds* genéticos. Quanto aos diferentes períodos de estudo, a prevalência de hVISA aumentou consideravelmente de 4,68% antes de 2006 para 5,38% entre 2006 e 2009, atingindo 7,01% entre 2010 e 2014. Em relação às amostras clínicas, a prevalência de hVISA foi maior em amostras de cultura de sangue, com 9,81%. No que diz respeito ao *background* genético, o SCCmec II (48,16%) foi o mais prevalente em hVISA, seguido do SCCmec IV (18,07%), do SCCmec III (17,99%) e do SCCmec I (2,12%).

Na revisão sistemática e metanálise publicada em 2020, Shariati e colaboradores (2020) avaliaram a prevalência de hVISA entre os isolados de MRSA de diferentes períodos de estudo e localidades. Quanto aos diferentes períodos de estudo, a prevalência de hVISA aumentou consideravelmente de 4,0% antes de 2010 para 5,3% entre 2010 e 2019. No que se refere às diferentes localidades, a prevalência de hVISA foi de 4,7% na Ásia, de 4,4% na Europa, de 5,2% na América, de 4,0% na África e de 11,2% na Oceania.

A significativa discrepância dos dados epidemiológicos, apesar de refletir a variação geográfica, é, em grande parte, resultado da inconsistência metodológica do processo de detecção deste fenótipo, da ausência de padronização, da variação na interpretação dos resultados, e dos diferentes determinantes genéticos associados com a reduzida suscetibilidade à vancomicina. Outros fatores, como o sítio de coleta da amostra clínica, a população de pacientes, o número de amostras, a terapia prévia com vancomicina e a presença de doenças concomitantes são também importantes interferentes nas taxas observadas nos estudos (VAN HAL e PATERSON, 2011; ZHANG et al., 2015).

O método de triagem mais utilizado para detecção do fenótipo hVISA é o ágar suplementado com vancomicina, em que colônias resistentes são selecionadas a partir do crescimento em ágar BHI contendo 6 µg/mL de vancomicina (BHIA-6V) (CLSI, 2020). O método confirmatório, considerado padrão-ouro para a detecção do hVISA, é a análise do perfil populacional - área abaixo da curva (PAP-AUC, do inglês *population analysis profile - area under the curve*). Porém, este é um método demorado, trabalhoso e caro para ser aplicado na rotina dos laboratórios de microbiologia clínica (CHONG et al., 2015; DI GREGORIO et al., 2015). Esta metodologia baseia-se em calcular a área sob a curva (AUC) gerada após o crescimento de diferentes densidades celulares (10^{-1} e 10^{-7} UFC/mL), em ágar BHI contendo várias concentrações de vancomicina. Quando a razão entre a AUC do isolado em relação ao controle hVISA (Mu3) for entre 0,9 e 1,3, o isolado é considerado hVISA (SATOLA et al, 2011).

1.4.2.1.1.1.1.1 Determinantes genéticos de resistência

Os mecanismos moleculares subjacentes ao desenvolvimento do hVISA e do VISA não estão completamente definidos (HU, PENG e RAO, 2016; CONG, YANG e RAO, 2020). Para esclarecer isso, várias análises foram feitas para identificar os determinantes genéticos associados à resistência intermediária à vancomicina por meio de genômica comparativa,

transcriptômica, e proteômica do VISA e seu VSSA isogênico. Essas abordagens genéticas possibilitaram a identificação de múltiplas mutações nos genes associados à formação do fenótipo VISA (HOWDEN et al., 2011; GARDETE e TOMASZ, 2014; HU, PENG e RAO, 2016).

A resistência de hVISA e VISA, não está relacionada a um mecanismo genético pontual, mas sim a várias mutações em múltiplos genes, principalmente em sistemas reguladores de dois componentes (TCRS, do inglês *two component regulatory systems*), *graSR*, *vraRS* e *walKR*, e no gene que codifica a subunidade beta da RNA polimerase, *rpoB* (GARDETE e TOMASZ, 2014; HIRAMATSU et al., 2014; DEVI et al., 2015; HU, PENG e RAO, 2016). O desenvolvimento desses fenótipos em VSSA ocorre de maneira gradual, adquirindo mutações que se acumulam e desempenham um papel na redução da suscetibilidade à vancomicina (MCGUINNESS, MALACHOWA e DELEO, 2017).

Experimentalmente, quatro categorias de mutações genéticas estão associadas com a evolução de VISA: a primeira categoria contém mutações em genes reguladores da transcrição, *graSR*, *vraSR*, *walKR* e *rpoB* (HOWDEN et al., 2014); a segunda categoria inclui mutações em genes associados à síntese, hidrólise ou remodelação da parede celular, *sle1* e *msrR* (KATAYAMA et al., 2016); a terceira categoria contém mutações em genes metabólicos, *cmk* e *fdh2* (MATSUO et al., 2014; KATAYAMA et al., 2016); e a quarta categoria inclui mutações em genes de modificação pós-traducional, *stp1* e *clpP* (SHOJI et al., 2011; CAMERON et al., 2012).

1.4.2.1.1.1.1.1.1 Mutação em genes da regulação transcricional

Centenas de genes, aproximadamente 10% do genoma de *S. aureus*, de várias categorias funcionais são expressos de forma diferente em VSSA e VISA. Estudos prévios identificaram diretamente mutações em genes reguladores da transcrição que são os principais determinantes genéticos da resistência à vancomicina em isolados de hVISA e VISA. A maioria das mutações no *graSR*, *vraRS*, *walKR* e *rpoB* foram comprovadas experimentalmente como responsável pela promoção da resistência à vancomicina em VISA (GARDETE e TOMASZ, 2014; HIRAMATSU et al., 2014; HU, PENG e RAO, 2016).

O GraSR é um TCRS composto pelo sensor de quinase (*graS*) e pelo regulador de resposta (*graR*) associado à resistência aos glicopeptídeos. A proteína GraSR interage com o GraX e o transportador VraFG ABC para formar um sistema de cinco componentes que controla

a resistência de peptídeo antimicrobiano catiônico (CAMP, do inglês *cationic antimicrobial peptide*). A resistência a CAMPs é mediada pela D-alanilação de ácidos teicoicos da parede celular pelas enzimas DltABC e a lisinilação de fosfatidilglicerol na membrana celular dependente de MprF (FALORD et al., 2012). O sistema GraSR regula positivamente o operon da cápsula, que leva ao aumento da biossíntese da cápsula; o operon *dlt*, que codifica enzimas envolvidas na alanilação do ácido teicoico; o gene *mprF/fmtC*, que altera a carga da parede celular; e o regulador *rot*, que atua como repressor de toxinas. E regula negativamente o *agr*, que controla a expressão de genes associados à virulência estafilocócica (MCGUINNESS, MALACHOWA e DELEO, 2017). Além de tudo, mutações no sistema GraSR como GraS-R232K, GraS-T136I e GraR-N197S aumentam os níveis de resistência à vancomicina e, conseqüentemente, contribuem com o desenvolvimento dos fenótipos hVISA/VISA (HU, PENG e RAO, 2016; WANG et al., 2017; PENG et al., 2018).

O TCRS *vraSR*, composto pelos genes sensor de quinase (*vraS*) e regulador de resposta (*vraR*), constitui o operon *vraU-vraT/yvqF-vraS-vraR*. O gene *vraT/yvqF* é essencial para a função do *vraSR*, como regulador do estresse da parede celular. Mutações no *vraT/yvqF* ativam tanto o *vraS* como o *vraR* e promovem a regulação excessiva da síntese da parede celular, que contribui com o aumento da resistência à vancomicina (BOYLE-VAVRA et al., 2013; DEVI et al., 2015). A via de transdução de sinal mediada pelo *VraSR* é ativada pela exposição ao antimicrobiano e por deleções de genes que inibem a síntese da parede celular (TAJBAKSHSH e GOLEMI-KOTRA, 2019). Com o dano na parede celular, o *VraR* ativa o *vra* operon e outros 46 genes que regulam o estresse da parede celular; alguns desses genes, como *pbpB* e *fmtA*, codificam proteínas de síntese da parede celular (HU, PENG e RAO, 2016). Após o estresse celular, o *VraS* é ativado através de um evento de autofosforilação. Posteriormente, a histidina quinase transfere o grupo fosforil, quase instantaneamente, para *VraR*. Após sua fosforilação, o *VraR* dimeriza no domínio N-terminal. A dimerização induzida por fosforilação expande e aprimora a ligação do *VraR* ao seu próprio promotor e, conseqüentemente, aumenta a expressão do operon *vraSR* (TAJBAKSHSH e GOLEMI-KOTRA, 2019). A regulação positiva do *VraSR*, dependente do estímulo de estresse da parede celular, aumenta a resistência à vancomicina. Por outro lado, a transdução de sinal mediada pelo *VraSR* é redefinida na ausência de estresse através da atividade fosfatase do *VraS* em relação ao *VraR*, aumentando a suscetibilidade à vancomicina (HU, PENG e RAO, 2016; TAJBAKSHSH e GOLEMI-KOTRA, 2019). Além do mais, as mutações *VraT-Y220C*, *VraS-I5N*, *VraS-S329L* e *VraS-L114S-D242G* aumentam a

síntese da parede celular e a resistência à vancomicina (HU, PENG e RAO, 2016; WANG et al., 2017).

O TCRS *walKR* (ortólogo YycFG), constituído pelo sensor histidina quinase (*walK*) e pelo regulador de resposta (*walR*), regula genes envolvidos no metabolismo da parede celular. Após a ativação pelo WalK, o WalR se liga à sequência do promotor e aumenta a expressão de autolisinas estafilocócicas (*atlA*, *sle1* e *lytM*), importantes na renovação da parede celular (CAMERON et al., 2016). Neste caso, mutações pontuais no *walRK* (WalK-G223D) medeiam a resistência à vancomicina ao diminuir a expressão dos genes da autolisina (HU et al., 2015b). Além disso, a inserção de IS256 no promotor do *walKR* mostrou que a regulação positiva da expressão da *walKR* diminui os níveis de resistência à vancomicina, enquanto a regulação negativa da expressão do *walKR* aumenta os níveis de resistência da vancomicina, indicando que o *walKR* é um regulador negativo da resistência à vancomicina (HU, PENG e RAO, 2016). Outras mutações, WalR-K208R, WalK-I594M e WalR-A111T, também foram associadas com o aumento da resistência à vancomicina e com os fenótipos hVISA/VISA (HU, PENG e RAO, 2016; WANG et al., 2017).

O gene *rpoB*, que codifica a subunidade beta da RNA polimerase, também desempenha um papel importante na evolução do hVISA/ VISA (DEVI et al., 2015). Em experimentos de substituição alélica, a mutação H481Y no *rpoB* foi responsável por aumentar a resistência à vancomicina durante o desenvolvimento do fenótipo VISA na cepa Mu3 (hVISA) (MATSUO et al., 2011). A mutação RpoB-H481Y causa alterações transcricionais globais, o que leva à regulação positiva da produção de cápsula, com atenuada virulência e reduzida suscetibilidade a peptídeos antimicrobianos (GAO et al., 2013). Mutações em outras subunidades da RNA polimerase, como RpoC ou RpoD, também foram encontradas em isolados VISA (MATSUO et al., 2014). No estudo de Wang et al. (2017), duas mutações (H481N e L466S) no *rpoB* foram significativamente associadas com aumento da CIM de vancomicina, importantes no desenvolvimento de hVISA e VISA.

1.4.2.1.1.1.1.2 Mutação em genes da síntese da parede celular, hidrólise e síntese do ácido teicoico

Em fenótipos de reduzida suscetibilidade à vancomicina, a acelerada síntese da parede celular e a diminuída autólise são vias alternativas para o espessamento da parede celular (HU, PENG e RAO, 2016). Sle1, N-acetilmuramoil-L-alanina amidase, é a hidrolase de

peptidoglicano envolvida na divisão do septo durante a multiplicação celular de *S. aureus*. Várias mutações estão associadas com VISA, uma destas é no gene *sle1*, *Sle1* ($\Delta 67aa$). A deleção da sequência de 67 aminoácidos, localizada no domínio LysM do gene *sle1* [*sle1* (67aa)], que codifica a hidrolase da N-acetilmuramoil-L-alanina amidase no peptidoglicano, diminui drasticamente a atividade autolítica e converte o espessamento induzido da parede celular em espessamento constitutivo (KATAYAMA et al., 2016). Mutações de perda de função nos genes de hidrólise da parede celular, como o *sle1*, podem contribuir diretamente para a resistência à vancomicina no VISA (HU, PENG e RAO, 2016).

MsrR é um membro da família LytR – CpsA – Psr (LCP), que liga o ácido teicoico da parede (WTA, do inglês *wall teichoic acid*) à camada de peptidoglicano (CHAN et al., 2013). A superexpressão do *msrR* reduz a suscetibilidade aos glicopeptídeos e, assim, contribui com a evolução de cepas VSSA para hVISA/VISA (HU, PENG e RAO, 2016). A deleção do *msrR* reduz a ligação do WTA no peptidoglicano e aumenta o tamanho e a agregação das células na formação de biofilme (KATAYAMA et al., 2016). O WTA controla a autólise estafilocócica ao impedir a ligação da autolisina à parede celular. A mutação *MsrR-E164K*, uma das identificadas em VISA (Mu50), promove a ligação do WTA à camada de peptidoglicano e impede a ligação da autolisina à parede celular, diminuindo assim a autólise da parede celular e a suscetibilidade à vancomicina (HU, PENG e RAO, 2016).

1.4.2.1.1.1.1.3 Mutações em genes envolvidos no metabolismo estafilocócico

A síntese da parede celular consome altas quantidades de substrato e energia. Para construir uma parede celular espessa, a demanda por precursores da parede celular é aumentada no VISA, o que requer o ajuste do metabolismo celular (HU, PENG e RAO, 2016). No estudo de Alexander et al. (2014), o fenótipo VISA foi associado com alterações metabólicas específicas e reversíveis. Além disso, a abundância de seis metabólitos do ciclo da ureia, da via pentose fosfato e do ciclo do ácido tricarbóxico também foi observada em cepas de VISA geneticamente distintas (ALEXANDER et al., 2014). Esses metabólitos alterados estão direta ou indiretamente ligados à biossíntese de precursores da parede celular. Mutações nos genes metabólicos podem ajustar diretamente o metabolismo celular para apoiar a síntese da parede celular (HU, PENG e RAO, 2016).

O produto do gene *cmk*, que codifica a citidina monofosfato quinase (CmK, do inglês *cytidine monophosphate kinase*) atua na via de síntese da pirimidina. A diminuição na atividade

de Cmk aumenta o UTP, que é necessário para a síntese de um intermediário do peptidoglicano (UDP-GlcNAc) (MATSUO et al., 2014). No estudo de Matsuo et al. (2014), duas formas mutadas do gene *cmk* foram introduzidas no hVISA (Mu3), convertendo assim o hVISA em VISA. Um mutante possuía a mutação Cmk-A20G e o outro a mutação T-to-A na sequência Shine-Dalgarno (SD) do Cmk. A mutação Cmk-A20G diminuiu a atividade Cmk, enquanto a mutação na sequência SD diminuiu a tradução de Cmk. A diminuição na atividade Cmk ou nos níveis de proteína Cmk causaram maior resistência à vancomicina, aumentando o suprimento do intermediário da biossíntese de parede celular (UDP-GlcNAc) (MATSUO et al., 2014).

Fdh2 é um formato desidrogenase, codificado pelo gene *fdh2*. No estudo de Katayama et al. (2016), a introdução de uma mutação Fdh2-A297V no VSSA (N315) com o Sle1 (Δ 67aa) converteu o espessamento indutível da parede celular em espessamento constitutivo. Portanto, mutações nos genes metabólicos podem influenciar diretamente a síntese da parede celular e contribuir para a resistência à vancomicina no VISA. Várias outras proteínas metabólicas mutadas foram identificadas em isolados VISA, incluindo proteínas envolvidas na tradução, metabolismo de nucleotídeos e biossíntese de aminoácidos. Essas proteínas também podem ajustar diretamente o metabolismo celular para apoiar a síntese da parede celular em VISA.

1.4.2.1.1.1.1.4 Mutação em genes de modificação pós-traducional

Além do controle transcricional, os processos de fosforilação e degradação de proteínas são amplamente utilizados como mecanismos reguladores. A fosforilação reversível e a desfosforilação de proteínas por Stk1/Stp1 têm papéis importantes em diferentes processos celulares de *S. aureus*. Além disso, a protease ClpP dependente de ATP envolvida na proteólise intracelular desempenha papéis importantes na resposta ao estresse, metabolismo e síntese da parede celular. Mutações em *stp1* ou *clpP* foram associadas à resistência à vancomicina no VISA (HU, PENG e RAO, 2016).

Stk1 é uma proteína ligada à membrana, enquanto Stp1 é uma proteína citosólica. O domínio N-terminal de Stk1 dentro do citoplasma está associado à atividade de quinase, enquanto o domínio C-terminal de Stk1 possui os domínios de proteína de ligação à penicilina e os associados à serina/treonina quinase, que responde a sinais da parede celular (RUGGIERO et al., 2012). Em estudos que analisaram o papel da proteína Stp1 em VISA, a perda de função da Stp1 por meio de mutações, que envolve a exclusão ou a inserção de aminoácidos, foi associada com maiores níveis de resistência à vancomicina (CAMERON et al., 2012;

PASSALACQUA et al., 2012). A análise do transcriptoma de isolados com deleção no gene *stk1* revelou que a Stk1 pode regular muitos genes envolvidos na biossíntese de nucleotídeos, metabolismo da parede celular e autólise. Além disso, vários estudos demonstraram que Stk1/Stp1 pode interferir na função de TCSs e outros fatores de transcrição (HU, PENG e RAO, 2016).

ClpP é uma subunidade proteolítica da protease Clp dependente de ATP. Um núcleo proteolítico é formado por ClpP e é flanqueado por várias ATPases, incluindo ClpC, ClpX, ClpB e ClpL. As ClpP e Clp ATPases estão envolvidas na resposta ao estresse, virulência, metabolismo e resistência aos antimicrobianos (FREES et al., 2014). No estudo de Shoji et al. (2011), uma deleção de 144 pb no gene *clpP* causou a perda de função da ClpP, que mediou a resistência à vancomicina em um VISA derivado de laboratório. Essa deleção afeta também a expressão de vários genes reguladores, como *agr*, *sigB*, *sarT* e *walkR*. A análise proteômica mostrou que inúmeras proteínas são substratos de ClpC ou ClpP, incluindo as envolvidas na síntese da parede celular (PBP2, FemA e FemB), na autólise (Sle1 e Atl) e na regulação da transcrição (CcpA, HprK e CodY) (FENG et al., 2013; FREES et al., 2014). Os efeitos de proteínas proteolíticas, como ClpP, na resistência à vancomicina no VISA pode ocorrer por meio de sua função reguladora nos fatores de transcrição (FALORD et al., 2011).

1.4.2.1.1.1.2 Implicações clínicas

Apesar de o impacto clínico do fenótipo hVISA não estar definitivamente esclarecido (JACOB e DIAZGRANADOS, 2013; KALIL et al., 2014), alguns estudos sugerem que a presença de hVISA está comumente associada com infecções invasivas recorrentes por MRSA, bacteremia persistente, prolongada permanência no hospital, tratamento por longa duração com glicopeptídeos e falha no tratamento com vancomicina (GOMES, WARD e LAPLANTE, 2015; MCGUINNESS, MALACHOWA e DELEO, 2017).

No estudo de coorte publicado em 2013, Casapao e colaboradores (2013) analisaram os desfechos de pacientes com infecções na corrente sanguínea (BSI, do inglês *bloodstream infections*) causadas por hVISA e MRSA suscetível à vancomicina (VS-MRSA, do inglês *vancomycin-susceptible MRSA*). Os resultados mostraram que as taxas de falhas no tratamento com vancomicina foram 11 vezes maiores em pacientes com BSI causada por hVISA (82%) do que por VS-MRSA (32,8%; $p < 0,001$). Pacientes com BSI por hVISA também apresentaram mais chances de ter bacteremia persistente (59% vs. 21,3%, respectivamente; $p < 0,001$),

infecções recorrentes (25,5% vs. 1,9%, respectivamente; $p < 0,001$), e prolongada permanência no hospital (183 dias vs. 16 dias, respectivamente; $p = 0,022$). Corroborando com estes resultados o estudo de Yang et al. (2018) sugere que o fenótipo hVISA é um potencial fator de risco para prever falha no tratamento com vancomicina.

Em 2016, Koh e colaboradores (2016) analisaram o impacto clínico de hVISA em pacientes com bacteremia por *S. aureus* (SAB, do inglês *Staphylococcus aureus bacteremia*) ou pneumonia (SAP, do inglês *Staphylococcus aureus pneumonia*). Os resultados mostraram que isolados de hVISA não foram associados com falhas no tratamento com vancomicina em pacientes com SAB ($p = 0,054$) e que foram significativamente associados com falhas no tratamento em pacientes com SAP ($p = 0,014$). A presença de hVISA em pacientes com SAB e SAP não apresentou associação com a mortalidade de 30 dias relacionada a estas infecções. Em contrapartida, no estudo retrospectivo conduzido por Hu e colaboradores (2015), a mortalidade foi significativamente maior em pacientes com BSI causada por hVISA do que por VSSA (92,9% vs. 72,9%; $p = 0,046$).

Outros estudos têm reportado o aumento de falhas no tratamento com vancomicina e na mortalidade por isolados de MRSA susceptíveis à vancomicina, particularmente aqueles com CIM de 1,5 ou 2 $\mu\text{g/mL}$ (VAN HAL, LODISE e PATERSON, 2012; JACOB e DIAZGRANADOS, 2013). Takesue e colaboradores (2011), analisando 128 MRSA de bacteremia, observaram que a eficácia da vancomicina foi de 78,8% em pacientes infectados por MRSA com CIM de 1 $\mu\text{g/mL}$, enquanto que a eficácia foi de apenas 30,0% em pacientes infectados por MRSA com CIM de 2 $\mu\text{g/mL}$. Em metanálise realizada por Jacob e colaboradores (2013), ao avaliarem os desfechos clínicos em pacientes com infecções por MRSA com baixa CIM para vancomicina ($< 1,5 \mu\text{g/mL}$) e alta CIM para vancomicina ($\geq 1,5 \mu\text{g/mL}$), foi constatado que o risco de falhas no tratamento e de mortalidade aumenta em infecções por MRSA com alta CIM quando em comparação àqueles de baixa CIM.

Na revisão sistemática publicada em 2014, Kalil e colaboradores (2014) avaliaram a associação entre a concentração inibitória mínima da vancomicina e a mortalidade entre pacientes com bacteremia por *Staphylococcus aureus* (SAB). A taxa de mortalidade foi de 30,7% entre pacientes com SAB por hVISA com alta CIM para vancomicina ($\geq 1,5 \text{ mg/L}$) comparada com a de 35,4% entre pacientes com SAB por hVISA com baixa CIM para vancomicina ($< 1,5 \mu\text{g/mL}$). Em 2011, Chen e colaboradores (2011), ao avaliar 554 MRSA, observaram um acréscimo na incidência de hVISA quando o CIM para vancomicina aumentava de 1 para 2 $\mu\text{g/mL}$, sendo de 40% a incidência de hVISA nos isolados com CIM de 2 $\mu\text{g/mL}$.

Em 2015, Hu e colaboradores (2015a), analisando pacientes com SAB por hVISA, constataram que alta CIM para vancomicina está estatisticamente associada com o desenvolvimento de hVISA ($p < 0,001$). Corroborando com este resultado, outros estudos sugerem que a proporção de hVISA é diretamente relacionada com o aumento da concentração inibitória mínima para a vancomicina (CHEN et al., 2011; RICHTER et al., 2011; CASAPÃO et al., 2013).

1.4.2.1.1.2 Resistência à vancomicina

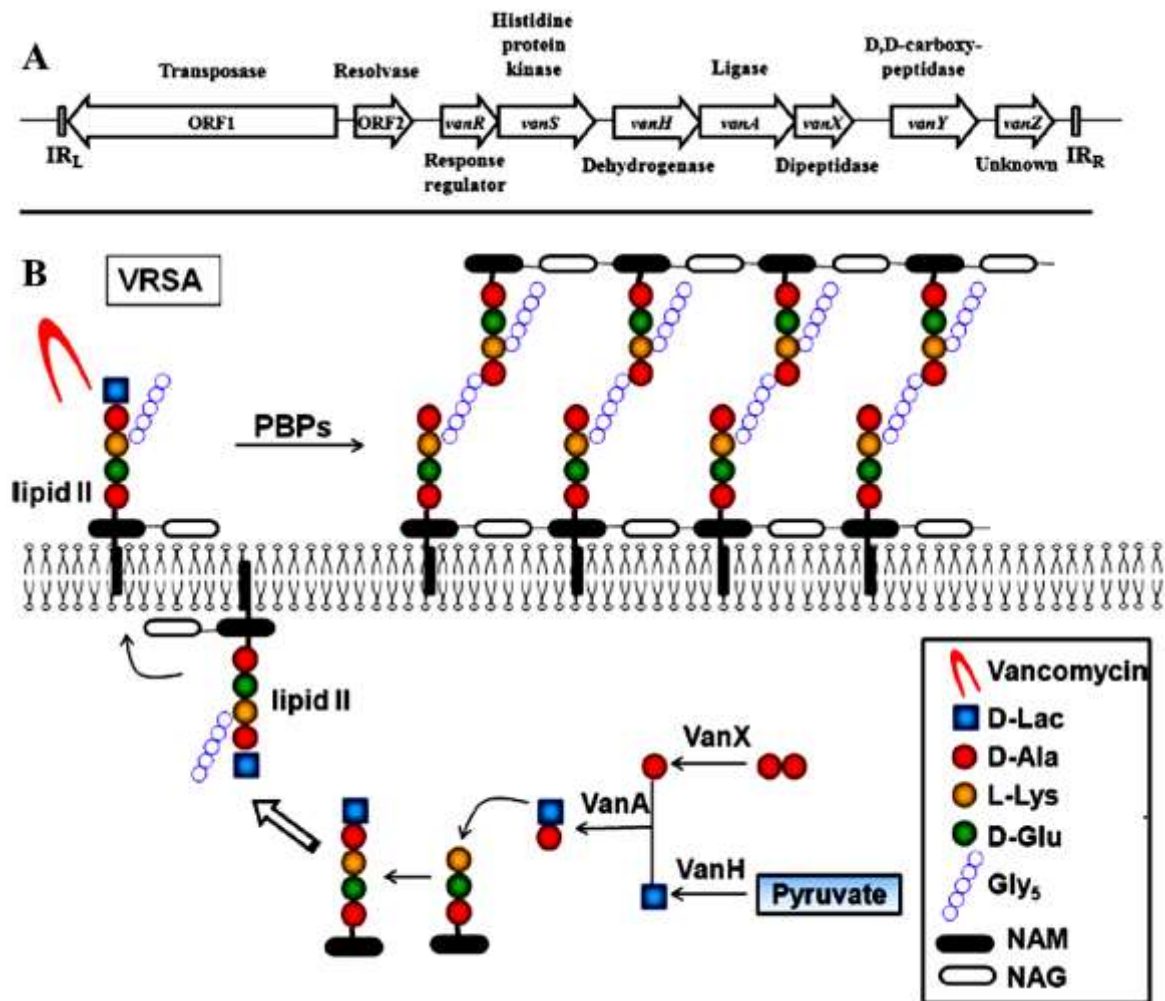
No ano de 2002, nos Estados Unidos, foi descrita a primeira infecção clínica por *Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina (VRSA, do inglês *vancomycin-resistance Staphylococcus aureus*), aproximadamente cinco décadas após sua aprovação para a terapêutica de infecções por PRSA. Desde então, um total de 52 cepas de VRSA foram relatadas no mundo, incluindo 14 isolados nos EUA, 16 na Índia, 11 no Irã, 9 no Paquistão, 1 no Brasil e 1 em Portugal (CONG, YANG e RAO, 2020).

A resistência completa à vancomicina em *S. aureus* é mediada pelo operon *vanA*, codificado no transposon *Tn1546*, adquirido por conjugação de *Enterococcus faecalis* resistente à vancomicina (VRE, do inglês *vancomycin-resistance Enterococcus faecalis*). Essa resistência é mantida pela retenção de um plasmídeo enterocócico ou pela transposição de *Tn1546* do plasmídeo enterocócico para o estafilocócico. Além disso, duas etapas são fundamentais para a resistência à vancomicina mediada pelo operon *vanA*: a hidrólise do dipeptídeo D-Ala-D-Ala dos precursores peptídicos e a síntese dos precursores de peptideoglicano D-Ala-D-Lac, que substitui D-Ala-D-Ala na síntese do peptideoglicano (MCGUINNESS, MALACHOWA e DELEO, 2017; CONG, YANG e RAO, 2020).

O operon *vanA* (**Figura 6A**) codifica sete proteínas (VanS, VanR, VanH, VanA, VanX, VanY e VanZ) essenciais para a resistência à vancomicina. VanS e VanR formam um sistema de dois componentes que detecta a presença de vancomicina e que ativa a transcrição do operon, respectivamente. VanH, VanA e VanX modificam os precursores do suscetível D-Ala-D-Ala ao resistente D-Ala-D-Lac. Para isso, VanH serve como uma desidrogenase que reduz o piruvato para formar D-Lac. A VanX atua como uma D, D-dipeptidase que hidrolisa o D-Ala-D-Ala. VanA liga D-Lac a D-Ala para produzir o resistente D-Ala-D-Lac, que substitui D-Ala-D-Ala na síntese do peptideoglicano. VanY é uma D, D-carboxilpeptidase que facilita a clivagem do dipeptídeo D-Ala-D-Ala no terminal carboxílico das estruturas pentapeptídicas. A função da VanZ não é bem conhecida, mas confere resistência à teicoplanina. A substituição

do dipeptídeo terminal D-Ala–D-Ala pelo D-Ala–D-Lac, reduz a afinidade da vancomicina no alvo de ligação e, conseqüentemente, sua ação bactericida (**Figura 6B**) (HU, PENG e RAO, 2016; MCGUINNESS, MALACHOWA e DELEO, 2017; CONG, YANG e RAO, 2020).

Figura 6 - Mecanismo de resistência da vancomicina em VRSA.



Fonte: adaptada de CONG, YANG e RAO (2020).

(A) Organização do *cluster vanA*. (B) Mecanismo de resistência da vancomicina em VRSA. D-Ala: D-Alanina; D-lac: D-lactato; L-Lys: L-Lysina; D-Glu: D-glutamato; Gly₅: Pentaglicina; NAM: ácido N-acetilmurâmico; NAG: N-acetylglucosamine.

Na revisão publicada em 2020, Cong e colaboradores (2020), ao analisar 52 casos de infecções por VRSA, observaram algumas características em comum entre os casos: coinfeção e co-colonização de VRE e MRSA, frequente em pacientes de unidade de terapia intensiva e de unidade de longa permanência; uso prévio de vancomicina, nos três meses anteriores ao isolamento do VRSA; doenças precursoras de infecções por VRSA, como diabetes,

insuficiência renal em estágio avançado, feridas gangrenosas e cirúrgicas; linhagem filogenética CC5, a maioria dos isolados de VRSA pertenciam ao complexo clonal 5 (CC5); antibioticoterapia eficaz para VRSA, a daptomicina e a linezolida são os antimicrobianos de escolha no tratamento dessas infecções estafilocócicas.

1.4.2.2 Resistência aos aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos tem papel importante na terapêutica antibacteriana, especialmente no tratamento de infecções estafilocócicas complicadas. Estes possuem potente ação bactericida, amplo espectro de atividade e alta eficácia sinérgica quando usado em combinação com antimicrobianos beta-lactâmicos ou glicopeptídeos, que inibem a síntese da parede celular bacteriana (GOUDARZI et al., 2019; ELFEKY et al., 2020). Atualmente, na prática clínica, a amicacina, a gentamicina e a tobramicina são os aminoglicosídeos usualmente prescritos para o tratamento de infecções por *S. aureus* (CLSI, 2020).

Os antimicrobianos da classe dos aminoglicosídeos inibem a síntese de proteínas bacterianas, ao se ligar de forma específica e irreversível, ao sítio A no rRNA 16S da subunidade 30S do ribossomo, alterando sua conformação e promovendo a tradução incorreta do mRNA. A tradução errônea, durante a síntese de proteínas, provoca a incorporação de aminoácidos incorretos na cadeia polipeptídica e essas proteínas ao integrar a membrana citoplasmática bacteriana, altera a permeabilidade seletiva e, conseqüentemente, apresenta efeito bactericida (FOSTER et al., 2017; WATKINS, HOLUBAR e DAVID, 2019).

A resistência aos aminoglicosídeos ocorre por três mecanismos distintos: inativação enzimática por enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (AMEs, do inglês *aminoglycoside-modifying enzymes*) que diminui a capacidade do antimicrobiano de aderir aos ribossomos; redução da captação intracelular devido a absorção reduzida do antimicrobiano e/ou a sistemas de efluxo; inibição da ligação do antimicrobiano ao alvo do rRNA por mutações em genes que codificam proteínas ribossômicas (GARNEAU-TSODIKOVA e LABBY, 2016; GOUDARZI et al., 2019).

A inativação do antimicrobiano pelas AMEs, através da acetilação, adenilação ou fosforilação, é o mecanismo mais comum de resistência aos aminoglicosídeos em MRSA (FOSTER et al., 2017; WATKINS, HOLUBAR e DAVID, 2019). Três AMEs, a aminoglicosídeo-4'-O-fosforiltransferase I ([ANT(4')Ia], do inglês *aminoglycoside-4'-O-phosphoryltransferase I*), a aminoglicosídeo-6'-N-acetiltransferase/2"-O-fosforiltransferase

([AAC(6'')/APH(2'')]) do inglês *aminoglycoside-6'-N-acetyltransferase/2''-O-phosphoryltransferase*) e a aminoglicosídeo-3'-O-fosforiltransferase ([APH(3')-III] do inglês *aminoglycoside-3'-O-phosphoryltransferase III*), que são codificadas respectivamente pelos genes *ant(4')-Ia*, *aac(6'')/aph(2'')* e *aph(3')-IIIa*, conferem resistência a um ou mais aminoglicosídeos usados na clínica (KRAUSE et al., 2016; KHOSRAVI, JENABI e MONTAZERI, 2017). Os genes codificadores de AMEs (*ant(4')-Ia*, *aac(6'')/aph(2'')* e *aph(3')-IIIa*), frequentes em isolados clínicos de MRSA, são encontrados em plasmídeos, cromossomos e elementos transponíveis, como transposons (KHOSRAVI, JENABI e MONTAZERI, 2017; GOUDARZI et al., 2019).

1.4.2.3 Resistência aos macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas B.

A eritromicina (macrolídeo) e a clindamicina (lincosamida) são antimicrobianos membro da família de macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas B (MLS_B, do inglês *macrolide, lincosamides and streptogramin B*), que apresentam excelente atividade contra infecções por MSSA e MRSA, frequentemente usados para tratar infecções estafilocócicas de pele e tecidos moles (ADHIKARI et al., 2017; KHASHEI et al., 2018). Estes antimicrobianos inibem a síntese de proteínas por se ligar reversivelmente ao rRNA 23S da subunidade ribossômica 50S, impedindo a ligação do aminoacil RNA transportador (tRNA) ao ribossomo, e assim, bloqueia a elongação da cadeia polipeptídica (FOSTER et al., 2017). Na prática clínica, os macrolídeos (eritromicina) e a lincosamida (clindamicina) são usualmente prescritos para o tratamento de infecções por *S. aureus* (CLSI, 2020).

A resistência aos antimicrobianos MLS_B é classificada em três mecanismos principais: modificação do sítio alvo mediada por genes da eritromicina ribossomo metilase (*erm*, do inglês *erythromycin ribosome methylase*), principalmente o *ermA*, *ermB* e *ermC*, que codificam enzimas que metilam o 23rRNA e conferem resistência induzível (fenótipo iMLS_B) ou constitutiva (fenótipo cMLS_B) aos antimicrobianos MLS_B; bomba de efluxo ativo mediada por genes de resistência aos macrolídeos e estreptograminas (*msr*, do inglês *macrolides streptogramins resistance*), principalmente o *msrA* e *msrB*, que conferem resistência apenas aos macrolídeos e as estreptograminas do tipo B; inativação enzimática do antimicrobiano mediada por genes da lincosamida nucleotidiltransferases (*lnu*, do inglês *lincosamide nucleotidyltransferase*), principalmente o *lnuA* e *lnuB*, que codificam nucleotidiltransferases

que catalisam a adenilação das lincosamidas (ADHIKARI et al., 2017; MISIC et al, 2017; RAZEGHI, SAFFARIAN e GOUDARZI, 2019).

1.4.2.4 Resistência as fluoroquinolonas

As fluoroquinolonas são potentes agentes antibacterianos com amplo espectro de atividade utilizados na terapia de inúmeras infecções comunitárias e hospitalares (JONES et al., 2016). Como mecanismo de ação, inibem a síntese de ácidos nucleicos ao interferir na ação das enzimas bacterianas, DNA topoisomerase II (girase) ou topoisomerase IV, as quais são necessárias para a replicação, recombinação e reparação do DNA. Ambas as enzimas são heterotetrâmeros das subunidades A e B, GyrA e GyrB na DNA girase, ParC e ParE na topoisomerase IV. A subunidade A da topoisomerase IV é o alvo principal das fluoroquinolonas em gram-positivos (WALSH e WENCEWICZ, 2016). Clinicamente, ciprofloxacino, levofloxacino, moxifloxacino e ofloxacino são as fluoroquinolonas comumente prescritas para o tratamento de infecções estafilocócicas (CLSI, 2020).

A resistência as fluoroquinolonas em MSSA e MRSA ocorre por mutações nas topoisomerasas e por superexpressão de bomba de efluxo endógena. Os tipos comuns de alterações mutacionais resultam em substituições de aminoácidos em resíduos que constituem o sítio de ligação, região determinante da resistência as fluoroquinolonas (HOOPER e JACOBY, 2015). Nos estafilococos, ParC é a topoisomerase com maior sensibilidade e, portanto, o alvo principal. Ao contrário, a DNA girase é menos suscetível e é o alvo secundário. Os estafilococos são muito sensíveis às fluoroquinolonas, portanto, para desenvolver resistência que excede o ponto de corte da CIM, são necessárias alterações nas duas enzimas (ANDERSSON e HUGHES, 2014). Isolados altamente resistentes as fluoroquinolonas geralmente superexpressam bombas de efluxo (HOOPER e JACOBY, 2015). Três bombas podem efluir fluoroquinolonas, NorA age com drogas hidrofílicas norfloxacino e ciprofloxacino, enquanto NorB e NorC têm como alvo drogas hidrofóbicas, como moxifloxacino (FOSTER et al., 2017).

1.4.2.5 Resistência as tetraciclina

Os antimicrobianos da classe das tetraciclina são bacteriostáticos de amplo espectro utilizados no tratamento e prevenção de infecções bacterianas (AMOAKO et al., 2019;

GOUDARZI et al., 2019). Como mecanismo de ação, inibem a síntese de proteínas bacterianas por se ligar de forma reversível ao sítio A no rRNA 16S da subunidade 30S do ribossomo, bloqueando a ligação do aminoacil RNA transportador (tRNA) ao complexo ribossomo 30S e mRNA, e assim interfere na adição de aminoácidos às cadeias nascentes polipeptídicas (FOSTER et al., 2017). Clinicamente, a doxiciclina, a minociclina, a tetraciclina e a tigeciclina são as tetraciclinas comumente prescritas para o tratamento de infecções estafilocócicas (CLSI, 2020).

A resistência as tetraciclinas em *S. aureus* ocorre por dois mecanismos principais: o efluxo ativo, resultante da aquisição de genes localizados em plasmídeos, *tetK* e *tetL*; e a proteção ribossômica, mediada por genes localizados em transposons ou em cromossomo, *tetM* ou *tetO* (AMOAKO et al., 2019; GOUDARZI et al., 2019). O gene *tetK*, que é transportado pelo plasmídeo pT181, integrado ao SCCmec III de MRSA, mostrou ser predominante em cepas de CA-MRSA (USA300 e USA400) resistentes à doxiciclina. Os genes *tetM/tetO* são codificados cromossomicamente em transposons conjugativos (*Tn916* e *Tn1545*) e frequentemente encontrados em cepas de MRSA resistentes a tetraciclina e a minociclina (FOSTER et al., 2017; WATKINS, HOLUBAR e DAVID, 2019).

A suscetibilidade a tigeciclina não é afetada pela presença dos determinantes de resistência *tetK* e/ou *tetM/O* (FOSTER et al., 2017; WATKINS, HOLUBAR e DAVID, 2019). Experimentalmente, verificou-se que a resistência à tigeciclina em isolados clínicos de MRSA está associada a mutações no repressor transcricional *mepR*, que leva à desrepressão da bomba de efluxo MepA, aumentando assim o efluxo do antimicrobiano; e a mutações no gene *rpsJ*, que codifica a proteína ribossômica S10, e assim, reduz o acesso da tigeciclina ao sítio de ligação (HAIM et al., 2017; DABUL et al., 2018).

1.4.2.6 Resistência as sulfonamidas

Sulfametoxazol-trimetoprima é uma combinação de dois antimicrobianos antifolatos que agem sinergicamente inibindo duas enzimas essenciais na biossíntese bacteriana do ácido fólico, o sulfametoxazol inibe a di-hidropteroato sintetase (DHPS, do inglês *dihydropteroate synthetase*) e a trimetoprima inibe a di-hidrofolato redutase (DHFR, do inglês *dihydrofolate reductase*) (COELHO, DE LENCASTRE e AIRES-DE-SOUSA, 2017).

A resistência a sulfametoxazol-trimetoprima em *S. aureus* está associada a dois mecanismos genéticos: mutações no gene cromossômico da DHFR (*dfrB*) e aquisição de genes

de resistência que codificam DHFRs variantes (*dfrA*, *dfrG* e *dfrK*) localizados em elementos genéticos móveis. A mutação no gene *dfrB* intrínseco confere resistência de nível intermediário a sulfametoxazol-trimetoprima ($MIC \leq 256 \mu\text{g/mL}$), enquanto que as variantes do gene *dfr* adquirido mediam resistência de alto nível ($MIC \geq 512 \text{ mg/mL}$) (NURJADI et al., 2014; COELHO, DE LENCASTRE e AIRES-DE-SOUSA, 2017).

1.5 Outras alternativas terapêuticas

Com o avanço das infecções estafilocócicas invasivas, a vancomicina se tornou a principal opção terapêutica. Contudo, o seu uso constante contribuiu com a emergência de MRSA com reduzida suscetibilidade à vancomicina, hVISA e VISA. Exceto pela ação da vancomicina, os hVISA/VISA geralmente permanecem suscetíveis a ceftarolina, daptomicina, linezolida, minociclina, sulfametoxazol-trimetoprima e tigeciclina (GOMES, WARD e LAPLANTE, 2015; MCGUINNESS, MALACHOWA e DELEO, 2017; BOSWIHI e UDO, 2018; CONG, YANG e RAO, 2020). A **Tabela 2** oferece um resumo dos antimicrobianos atualmente ativos contra MRSA.

Tabela 2 - Antimicrobianos ativos contra *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina^a.

Antimicrobiano	Espectro de atividade	Indicações clínicas
Ceftarolina	MRSA/hVISA/VISA/VRSA	CAP SSTI complicada
Ceftobiprole	MRSA/hVISA/VISA/VRSA	CAP HAP SSTI complicada
Dalbavancina	MRSA/hVISA/VISA	ABSSSI SSTI
Daptomicina	MRSA/hVISA/VISA/VRSA	Bacteremia Endocardite SSTI complicada
Linezolida	MRSA/hVISA/VISA/VRSA	CAP HAP VAP SSTI complicada e não-complicada
Oritavancina	MRSA/hVISA/VISA/VRSA	SSTI complicada e não-complicada
Tedizolida	MRSA/hVISA/VISA/VRSA	SSTI complicada e não-complicada
Telavancina	MRSA/hVISA/VISA	HAP VAP SSTI complicada e não-complicada
Tigeciclina	MRSA/hVISA/VISA/VRSA	CAP SSTI complicada e não-complicada

^aTabela adaptada de BOSWIHI e UDO (2018), LEE et al. (2018) e TURNER et al. (2019).

SSTI: infecção de pele e tecidos moles, do inglês *skin and soft tissue infection*; CAP: pneumonia adquirida na comunidade, do inglês *community-acquired pneumonia*; HAP: pneumonia adquirida no hospital, do inglês *hospital-acquired pneumonia*; VAP: pneumonia associada à ventilação, do inglês *ventilator-associated pneumonia*.

2 REFERÊNCIAS

ABDULGADER, Shima M. The association between pathogen factors and clinical outcomes in patients with *Staphylococcus aureus* bacteremia in a tertiary hospital, Cape Town. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 91, n. 1, p. 111-118, Feb. 2020.

ABISADO, Rhea G et al. Bacterial quorum sensing and microbial community interactions. **mBio**, v. 9, n. 3, p. e02331-17, May 2018.

ADHIKARI, RP et al. Inducible clindamycin and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in a tertiary care hospital, Kathmandu, Nepal. **BMC Infectious Diseases**, v. 17, n.1, p. 483, July 2017.

ALDMAN, Malin Hagstrand; SKOVBY, Annette; PAHLMAN, Lisa I. Penicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*: susceptibility testing, resistance rates and outcome of infection. **Infectious Diseases**, v. 49, n. 6, p. 454-460, June 2017.

ALEXANDER, Elizabeth L. et al. Intermediate-type vancomycin resistance (VISA) in genetically-distinct *Staphylococcus aureus* isolates is linked to specific, reversible metabolic alterations. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, p. e97137, May 2014.

AMOAKO, Daniel Gyamfi et al. Tet(M) mediates tetracycline resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clinical isolates from the private hospital sector in KwaZulu-Natal (KZN), South Africa. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 51-59, Mar. 2019.

ANDERSSON, Dan I.; HUGHES, Diarmaid. Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 1, p. 465-78, May 2014.

ANDERSSON, Dan I.; NICOLOFF, Hervé; HJORT, Karin. Mechanisms and clinical relevance of bacterial heteroresistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 1, p. 479-496, Aug. 2019.

ANJUM, Muna F. et al. Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from animals and animal products in the UK. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 1-7, Sept. 2019.

BAIG, Sharmin et al. Novel SCCmec type XIII (9A) identified in an ST152 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 61, n. 1, p. 74-76, July 2018.

BANGERTER, Patrick Daniel et al. Longitudinal study on the colonisation and transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farms. **Veterinary Microbiology**, v. 183, p. 125-134, Feb. 2016.

BECKER, Karsten et al. The clinical impact of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of the clonal complex 398 for humans. **Veterinary Microbiology**, v. 200, n. 1, p. 33-38, Feb. 2017.

BELKUM, Alex van. Hidden *Staphylococcus aureus* carriage: overrated or underappreciated? **mBio**, v. 7, n. 1, p. e00079-16, Feb. 2016.

BERGLUND, Carolina et al. Novel type of staphylococcal cassette chromosome *mec* in a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain isolated in Sweden. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 10, p. 3512-3516, Aug. 2008.

BERNIER-LACHANCE, Jocelyn et al. Prevalence and characteristics of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (LA-MRSA) isolated from chicken meat in the province of Quebec, Canada. **PLoS ONE**, v. 15, n. 1, p. e0227183, Jan. 2020.

BIEN, Justyna; SOKOLOVA, Olga; BOZKO, Przemyslaw. Characterization of virulence factors of *Staphylococcus aureus*: novel function of known virulence factors that are implicated in activation of airway epithelial proinflammatory response. **Journal of Pathogens**, v. 2011, n. ID 601905, p. 1-13, July 2011.

BOSWIHI, Samar S.; UDO, Edet E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: An update on the epidemiology, treatment options and infection control. **Current Medicine Research and Practice**, v. 8, n. 1, p. 18-24, Jan. 2018.

BOYLE-VAVRA, Susan et al. *VraT/YvqF* is required for methicillin resistance and activation of the *VraSR* regulon in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 1 p. 83-95, Jan. 2013.

CAMERON, David R., et al. Serine/threonine phosphatase *StpI* contributes to reduced susceptibility to vancomycin and virulence in *Staphylococcus aureus*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 205, n. 11, p. 1677-1687, June 2012.

CAMERON, David R. et al. Vancomycin susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* is mediated by *YycHI* activation of the *WalRK* essential two-component regulatory system. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 30823, Sept. 2016.

CASAPAO, Anthony M. et al. Clinical outcomes in patients with heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* bloodstream infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 9, p. 4252-4259, Sept. 2013.

CÁZARES-DOMÍNGUEZ, Vicenta et al. Vancomycin modifies the expression of the *agr* system in multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. 369, p. 1-12, May 2015.

CECHINEL, Angélica et al. Association between accessory gene regulator polymorphism and mortality among critically III patients receiving vancomycin for nosocomial MRSA bacteremia: a cohort study. **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology**, v. 2016, n. ID 8163456, p. 1-5, Sept. 2016.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). **Antibiotic resistance threats in the United States, 2019**. CDC, 2019. Disponível em:
<<https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/threats-report/2019-ar-threats-report-508.pdf>>
Acesso em: 20 Abr. 2020.

_____ (CDC). **Emerging infections program network report methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, 2015**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/hai/eip/pdf/2015-MRSA-Report-P.pdf>> Acesso em: 20 Abr. 2020.

CHAN, Yvonne G.Y. et al. *Staphylococcus aureus* mutants lacking the LytR-CpsA-Psr family of enzymes release cell wall teichoic acids into the extracellular medium. **Journal of Bacteriology**, v. 195, n. 20, p. 4650-4659, Oct. 2013.

CHEN, Hongbin et al. The incidence of heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* correlated with increase of vancomycin MIC. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 71, n. 3, p. 301-303, Nov. 2011.

CHONG, Yong Pil et al. Accessory gene regulator (*agr*) dysfunction in *Staphylococcus aureus* bloodstream isolates from South Korean patients. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 3, p. 1509-1512, Mar. 2013.

CHOO, Eun Ju. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in nosocomial infections. **Infection Chemotherapy**, v. 49, n. 2, p. 158-159, June. 2017.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. Document supplement M100. 30^a ed. Wayne: PA, 2020. p. 58-66.

COELHO, C.; DE LENCASTRE, H.; AIRES-DE-SOUSA, M. Frequent occurrence of trimethoprim-sulfamethoxazole hetero-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in different African countries. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 36, n. 1, p. 1243-1252, Feb. 2017.

CONG, Yanguang; YANG, Sijin; RAO, Xiancai. Vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* infections: a review of case updating and clinical features. **Journal of advanced research**, v. 21, n. 1, p. 169-176, Jan. 2020.

COSGRIFF, Chance J. et al. Control of *Staphylococcus aureus* quorum sensing by a membrane-embedded peptidase. **Infection and Immunity**, v. 87, n. 5, p. e00019-19, Mar. 2019.

DABUL, Andrei NG. et al. Resistance in in vitro selected tigecycline-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* sequence type 5 is driven by mutations in *mepR* and *mepA*. **Microbial Drug Resistance**, v. 24, n. 5, p. 5519-526, June 2018.

DA COSTA, Thaina M. et al. PBP4: A new perspective on *Staphylococcus aureus* β -Lactam resistance. **Microorganisms**, v. 6, n.3, p. 57-64, June 2018.

DAYAN, Gustavo H. et al. *Staphylococcus aureus*: the current state of disease, pathophysiology and strategies for prevention. **Expert Review of Vaccines**, v. 15, n. 11, p. 1-20, Apr. 2016.

DEVI, Yamuna et al. Challenges in the laboratory diagnosis and clinical management of heteroresistant vancomycin *Staphylococcus aureus* (hVISA). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 4, n. 4, p. 214, Aug. 2015.

DI GREGORIO, Sabrina et al. Clinical, microbiological, and genetic characteristics of heteroresistant vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* bacteremia in a teaching hospital. **Microbial Drug Resistance**, v. 21, n. 1, p. 25-34, Feb. 2015.

DUPIEUX, Céline et al. Detection of mecC-positive *Staphylococcus aureus*: what to expect from immunological tests targeting PBP2a? **Journal of Clinical Microbiology**, v. 55, n. 6, p. 1961-1963, June 2017.

DWEBBA, Cwengile C.; ZISHIRI, Oliver T.; El ZOWALATY, Mohamed E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: livestock-associated, antimicrobial, and heavy metal resistance. **Infection and Drug Resistance**, v. 11, n. 1, p. 2497-2509, Nov. 2018.

ELFEKY, Dalia Saad et al. Effect of ceftaroline, vancomycin, gentamicin, macrolides, and ciprofloxacin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates: an *in vitro* study. **Surgical Infections**, v. 21, n. 2, p. 150-157, Feb. 2020.

FALORD, Mélanie et al. 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**, v. 56, n. 2, p. 1047-1058, Feb. 2012.

FALORD, Mélanie et al. Investigation of the *Staphylococcus aureus* GraSR regulon reveals novel links to virulence, stress response and cell wall signal transduction pathways. **PLoS ONE**, v. 6, n. 7, p. e21323, July 2011.

FENG, Jingyuan et al. Trapping and proteomic identification of cellular substrates of the ClpP protease in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Proteome Research**, v. 12, n. 2, p. 547-558, Feb. 2013.

FOSTER, Timothy J. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Current status and future prospects. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 41, n. 3, p. 430-449, Feb. 2017.

FREES, Dorte; GERTH, Ulf; INGMER, Hanne. Clp chaperones and proteases are central in stress survival, virulence and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 304, n. 2, p. 142-149, Mar. 2014.

GAGNAIRE, Julie. Epidemiology and clinical relevance of *Staphylococcus aureus* intestinal carriage: a systematic review and meta-analysis. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 15, n. 8, p. 767-785, July 2017.

GAO, Wei et al. The RpoB H₄₈₁Y rifampicin resistance mutation and an active stringent response reduce virulence and increase resistance to innate immune responses in *Staphylococcus aureus*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 207, n. 6, p. 929-939, Mar. 2013.

GAJDÁCS, Márió. The Continuing threat of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antibiotics**, v. 8, n. 2, p. 52, May 2019.

GARDETE, Susana; TOMASZ, Alexander. Mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 124, n. 7, p. 2836-2840, July 2014.

GARNEAU-TSODIKOVA, Sylvie; LABBY, Kristin J. Mechanisms of resistance to aminoglycoside antibiotics: overview and perspectives. **Medchemcomm**, v. 7, n. 1, p. 11-27, Jan. 2016.

GOERGE, Tobias et al. MRSA colonization and infection among persons with occupational livestock exposure in Europe: prevalence, preventive options and evidence. **Veterinary Microbiology**, v. 200, n. 1, p. 6-12, Feb. 2017.

GOLDMANN, Oliver; MEDINA, Eva. *Staphylococcus aureus* strategies to evade the host acquired immune response. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 308, n. 6, p. 625-630, Aug. 2018.

GOMES, Diane M.; WARD, Kristina E.; LAPLANTE, Kerry L. Clinical implications of vancomycin heteroresistant and intermediately susceptible *Staphylococcus aureus*. **Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy**, v. 35, n. 4, p. 424-432, Apr. 2015.

GOMES-FERNANDES, Meissiner et al. Accessory gene regulator (Agr) functionality in *Staphylococcus aureus* derived from lower respiratory tract infections. **PLoS ONE**, v. 12, n. 4, p. e0175552, Apr. 2017.

GOUDARZI, Mehdi et al. Distribution of SCC_{mec} types, tetracycline and aminoglycoside resistance genes in hospital-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. **Gene Reports**, v. 16, n. 1, p. 100454, Sept. 2019.

HAIM, Maria S. et al. First description of *rpsJ* and *mepA* mutations associated with tigecycline resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from a cystic fibrosis patient during antibiotic therapy. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 50, n. 6, p. 739-741, Dec. 2017.

HARKINS, Catriona P. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* emerged long before the introduction of methicillin into clinical practice. **Genome Biology**, v. 18, n. 1, p. 130, July 2017.

HASSOUN, Ali; LINDEN, Peter K.; FRIEDMAN, Bruce. Incidence, prevalence, and management of MRSA bacteremia across patient populations- A review of recent developments in MRSA management and treatment. **Critical care**, v. 21, n.1, p. 211, Aug. 2017.

HIRAMATSU, Keiichi et al. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. **Lancet**, v. 350, n. 9092, p. 1670-1673, Dec. 1997a.

_____ et al. Genomic basis for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 45, n. 2, p. 117-136, June 2013.

_____ et al. Multi-drug-resistant *Staphylococcus aureus* and future chemotherapy. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 20, n. 10, p. 593-601, Oct. 2014.

_____ et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 40, n. 1, p. 135-146, July 1997b.

HOOPER, David C.; JACOBY, George. Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1354, n. 1, p. 12-31, Sept. 2015.

HOWDEN, Benjamin P. et al. Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: Resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 1, p. 99-139, Jan. 2010.

_____ et al. Evolution of multidrug resistance during *Staphylococcus aureus* infection involves mutation of the essential two component regulator WalkR. **PLOS Pathogens**, v. 7, n. 11, p. e1002359, Nov. 2011.

HOWDEN, Benjamin P.; PELEG, Anton Y.; STINEAR, Timothy P. The evolution of vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) and heterogenous-VISA. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 21, n. 1, p. 575-582, Jan. 2014.

HU, Han-Chung et al. Clinical outcomes and molecular typing of heterogenous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* bacteremia in patients in intensive care units. **BMC Infectious Diseases**, v. 15, n. 1, p. 1, Oct. 2015a.

HU, Jinfeng et al. Mechanism of reduced vancomycin susceptibility conferred by *walk* mutation in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain MW2. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 2, p. 1352-1355, Feb. 2015b.

HU, Qiwen; PENG, Huagang; RAO, Xiancai. Molecular events for promotion of vancomycin resistance in vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus*. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 1601, p. 1-18, Oct. 2016.

INGRAHAM, John L.; INGRAHAM, Catherine A. **Introdução a Microbiologia** - Uma abordagem em estudos de casos. 3ª ed. São Paulo: Editora Cengage Learning, 2011. p. 527-533.

International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC). **Classification of staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*)**. Disponível em: <http://www.sccmec.org/Pages/SCC_Classification_EN.html> Acesso em: 05 May 2020.

International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC). Classification of staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*): guidelines for reporting novel SCC*mec* elements. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 12, p. 4961-4967, Dec. 2009.

ITO, Teruyo et al. Novel type V staphylococcal cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccrC*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 7, p. 2637-2651, July 2004.

_____ et al. Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) analysis of MRSA. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) protocols. **Methods in Molecular Biology**, v. 1085, n. 1, p. 131-148, Dec. 2014.

_____ et al. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 5, p. 1323-1336, May 2001.

JACOB, Jesse T.; DIAZGRANADOS, Carlos A. High vancomycin minimum inhibitory concentration and clinical outcomes in adults with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: a meta-analysis. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 2, p. e93-e100, Feb. 2013.

JENKINS, Amy et al. Differential expression and roles of *Staphylococcus aureus* virulence determinants during colonization and disease. **mBio**, v. 6, n. 1, p. e02272, Feb. 2015.

JENUL, Christian; HORSWILL, Alexander R. Regulation of *Staphylococcus aureus* virulence. **Microbiology Spectrum**, v. 6, n. 1, p. 1-34, Apr. 2019.

JONES, Travis M et al. Focus on JNJ-Q2, a novel fluoroquinolone, for the management of community-acquired bacterial pneumonia and acute bacterial skin and skin structure infections. **Infection and Drug Resistance**, v. 9, n. 1, p. 119-128, June 2016.

KALE, Pratibha; DHAWAN, Bhatta. The changing face of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 34, n. 3, p. 275-285, Aug. 2016.

KALIL, Andre C. et al. Association between vancomycin minimum inhibitory concentration and mortality among patients with *Staphylococcus aureus* bloodstream infections. A systematic review and meta-analysis. **Journal of the American Medical Association**, v. 312, n. 15, p. 1552-1564, Oct. 2014.

KATEETE, David Patrick et al. CA-MRSA and HA-MRSA coexist in community and hospital settings in Uganda. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 8, n. 94, p. 1-9, June 2019.

KATAYAMA, Yuki et al. Complete reconstitution of the vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* phenotype of strain Mu50 in vancomycin-susceptible *S. aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 6, p. 3730-42, May 2016.

KANG, C. K et al. *agr* functionality affects clinical outcomes in patients with persistent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 36, n. 11, p. 2187-2191, June 2017.

KAHL, Barbara C.; BECKER, Karsten; LÖFFLER, Bettina. Clinical significance and pathogenesis of staphylococcal small colony variants in persistent infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 29, n. 2, p. 401-427, Apr. 2016.

KARANIKA, Styliani et al. Colonization with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and risk for infection among asymptomatic athletes: a systematic review and metaanalysis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 63, n. 2, p. 195-204, July 2016.

KHAN, Hassan Ahmed; AHMAD, Aftab; MEHBOOB, Riffat. Nosocomial infections and their control strategies. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 5, n. 7, p. 509-514, July 2015.

KHASHEI, Reza et al. Phenotypic and genotypic characterization of macrolide, lincosamide and streptogramin B resistance among clinical isolates of staphylococci in southwest of Iran. **BMC Research Notes**, v. 11, n.1, p. 711, Oct. 2018.

KOH, Young Rae et al. Prevalence and clinical impact of heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* isolated from hospitalized patients. **Annals of Laboratory Medicine**, v. 36, n. 1, p. 235-243, Feb. 2016.

KONEMAN, Elmer et al. **Diagnóstico Microbiológico**. 7^a ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2018. p. 637-643.

KONG, Cin; NEOH, Hui-min; NATHAN, Sheila. Targeting *Staphylococcus aureus* Toxins: A Potential form of Anti-Virulence Therapy. **Toxins**, v. 8, n. 3, p. 2-21, Mar. 2016.

KONG, Eric F.; JOHNSON, Jennifer K.; JABRA-RIZK, Mary Ann. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an enemy amidst us. **PLoS Pathogens**, v. 12, n. 10, p. e1005837, Oct. 2016.

KHOSRAVI, Azar D.; JENABI, Atefeh; MONTAZERI, Effat A. Distribution of genes encoding resistance to aminoglycoside modifying enzymes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains. **Kaohsiung Journal of Medical Sciences**, v. 33, n. 12, p. 587-593, July 2017.

KRAUSE, Kevin M. et al. Aminoglycosides: An overview. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 6, n. 6, p. a027029, June 2016.

LAKHUNDI, Sahreena; ZHANG, Kunyan. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: molecular characterization, evolution, and epidemiology. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 31, n. 4, p. e00020-18, Sept. 2018.

LARSEN, Jesper et al. Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 is an increasing cause of disease in people with no livestock contact in Denmark, 1999 to 2011. **Eurosurveillance**, v. 20, n. 37, p. 1-17, Sept. 2015.

LAWUNG, R et al. Revelation of staphylococcal cassette chromosome *mec* types in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Thailand and Vietnam. **Journal of Microbiological Methods**, v. 107, n. 1, p. 8-12, Dec. 2014.

LEE, Andie S. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. 18033, p. 1-23, May 2018.

LEVINE, Donald P. Vancomycin: a history. **Clinical Infectious Diseases**, v. 42, Suppl. 1, p. S5-S12, Jan. 2006.

List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature (LPSN). **Genus *Staphylococcus***. Disponível em: <<http://www.bacterio.net/staphylococcus.html>> Acesso em: 30 Apr. 2020.

LIU, Huanle et al. The carriage of the serine-aspartate repeats protein-encoding *sdr* genes among *Staphylococcus aureus* lineages. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 19, n. 5, p. 498-502, Oct. 2015.

LOBANOVSKA, Mariya; PILLA, Giulia. Penicillin's discovery and antibiotic resistance: lessons for the future? **Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 90, n. 1, p. 135-145, Mar. 2017.

MA, Xiao Xue et al. Novel type of staphylococcal cassette chromosome *mec* identified in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 4, p. 1147-1152, Apr. 2002.

MADIGAN, Michael T. et al. **Microbiologia de Brock**. 14^a ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2016. p. 868.

MATSUO, Miki et al. Mutation of RNA polymerase β subunit (*rpoB*) promotes hVISA-to-VISA phenotypic conversion of strain Mu3. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 55, n. 9, p. 4188-4195, Sept. 2011.

MATSUO, Miki et al. Comprehensive identification of mutations responsible for heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (hVISA)-to-VISA conversion in laboratory-generated VISA strains derived from hVISA clinical strain Mu3. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 57, n. 12, p. 5843-5853, Jan. 2014.

MCCARTHY, Alex J; LINDSAY, Jodi A. Genetic variation in *Staphylococcus aureus* surface and immune evasion genes is lineage associated: implications for vaccine design and host-pathogen interactions. **BMC Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 173-188, June 2010.

MCGUINNESS, Will A.; MALACHOWA, Natalia; DELEO, Frank R. Vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 90, n. 2, p.269-281, June 2017.

MISIC, Milena et al. Prevalence of genotypes that determine resistance of staphylococci to macrolides and lincosamides in Serbia. **Frontiers in Public Health**, v. 5, n. 200, p. 1-8, Aug. 2017.

MONCKE, Stefan et al. Diversity of SCC*mec* elements in *Staphylococcus aureus* as observed in South-Eastern Germany. **PLoS ONE**, v. 11, n. 9, p. e0162654, Sept. 2016.

MOREMI, Nyambura et al. The role of patients and healthcare workers *Staphylococcus aureus* nasal colonization in occurrence of surgical site infection among patients admitted in

two centers in Tanzania. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 8, n. 1, p. 102, June 2019.

MURRAY, Patrick R.; ROSENTHAL, Ken S.; PFALLER, Michael A. **Microbiologia Médica**. 8ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2017. p. 848.

NAGASUNDARAM, Niveditha; SISTLA, Sujatha. Existence of multiple SCC mec elements in clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 68, n. 5, p. 720-727, Apr. 2019.

NURJADI, Dennis et al. Emergence of trimethoprim resistance gene *dfrG* in *Staphylococcus aureus* causing human infection and colonization in sub-Saharan Africa and its import to Europe. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 9, p. 2361-2368, May 2014.

OLIVEIRA, Diana; BORGES, Anabela; SIMÕES, Manuel. *Staphylococcus aureus* toxins and their molecular activity in infectious diseases. **Toxins**, v. 10, n. 6, p. E252, June 2018.

OLIVEIRA, Duarte C.; MILHEIRIÇO, Catarina; DE LENCASTRE, Hermínia. Redefining a structural variant of staphylococcal cassette chromosome *mec*, SCC mec type VI. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 10, p. 3457-3459, Oct. 2006.

OTHMAN, Hala B. et al. Vancomycin MIC distribution among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Is reduced vancomycin susceptibility related to MIC creep? Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences, v. 7, n. 1, p. 12-18, Jan. 2019.

PADDER, Sajad Ahmad; PRASAD, Rajendra; SHAH, Abdul Haseeb. Quorum sensing: a less known mode of communication among fungi. **Microbiological Research**, v. 210, n.1, p. 51-58, May 2018.

PARK, Min-Jeong et al. Accessory gene regulator polymorphism and vancomycin minimum inhibitory concentration in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Annals of Laboratory Medicine**, v. 35, n. 4, p. 399-403, Apr. 2015.

PASSALACQUA, Karla D. et al. A mutation in the PP2C phosphatase gene in a *Staphylococcus aureus* USA300 clinical isolate with reduced susceptibility to vancomycin and daptomycin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 10, p. 5212-5223, Oct. 2012.

PEACOCK, Sharon J.; PATERSON, Gavin K. Mechanisms of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **The Annual Review of Biochemistry**, v. 84, n. 1, p. 577-601, June 2015.

PEARSON, Talima et al. Health disparities in *Staphylococcus aureus* transmission and carriage in a border region of the united states based on cultural differences in social relationships: protocol for a survey study. **JMIR research protocols**, v. 8, n. 9, p. e14853, Sept. 2019.

PENG, Haiying et al. Comparison of community- and healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates at a Chinese tertiary hospital, 2012-2017. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p.17916, Dec. 2018.

- PENG, Huagang et al. Reconstruction of the vancomycin-susceptible *Staphylococcus aureus* phenotype from a vancomycin-intermediate *S. aureus* XN108. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 2955, Nov. 2018.
- POPOVICH, Kyle J et al. Genomic and epidemiological evidence for community origins of hospital-onset methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bloodstream infections. **The Journal of infectious diseases**, v. 215, n. 11, p. 1640-1647, June 2017.
- RAZEGHI, Masome; SAFFARIAN, Parvaneh; GOUDARZI, Mehdi. Incidence of inducible clindamycin resistance and antibacterial resistance genes variability in clinical *Staphylococcus aureus* strains: A two-year multicenter study in Tehran, Iran. **Gene Reports**, v. 16, n.1, p. 1-6, Sept. 2019.
- RICHTER, Sandra S. et al. Detection of *Staphylococcus aureus* isolates with heterogeneous intermediate-level resistance to vancomycin in the United States. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 12, p. 4203-4207, Dec. 2011.
- ROSENTHAL, Víctor Daniel et al. International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC) report, data summary of 45 countries for 2012-2017: Device-associated module. **American Journal of Infection Control**, v. 48, n. 4, p. 423-432, Oct. 2019
- ROSSATO, Adriana Medianeira et al. Diversity of SCCmec types in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates in southern Brazil. **Journal Infection Control**, v. 8, n. 4, p. 279-281, Dez. 2019.
- RUBINSTEIN, Ethan; KEYNAN, Yoav. Vancomycin revisited - 60 years later. **Frontiers in public health**, v. 2, n. 1, p. 217, Oct. 2014.
- RUGGIERO, Alessia et al. Bacterial cell division regulation by Ser/Thr kinases: a structural perspective. **Current Protein and Peptide Science**, v. 13, n. 8, p. 756-66, Dec. 2012.
- SALAMA, Akram M.; QUAVE, Cassandra L. Targeting virulence in *Staphylococcus aureus* by chemical inhibition of the accessory gene regulator system in vivo. **mSphere**, v. 3, n. 1, p. e00500-17, Jan. 2018.
- SARAN, Sai; RAO, Namrata S.; AZIM, Afzal. New and promising anti-bacterials: Can this promise be sustained? **Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology**, v. 36, n. 1, p. 13-19, Jan. 2020.
- SATOLA, Sarah W. et al. Comparison of detection methods for heteroresistant vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*, with the population analysis profile method as the reference method. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 177-183, Jan. 2011.
- SHARIATI, Aref et al. Global prevalence and distribution of vancomycin resistant, vancomycin intermediate and heterogeneously vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* clinical isolates: a systematic review and meta-analysis. **Scientific Reports**, v. 10, n. 12689, Jan. 2020.

SHOJI, Mitsutaka et al. *walk* and *clpP* mutations confer reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 8, p. 3870-3881, Aug. 2011.

SMITH, Tara C. Livestock-associated *Staphylococcus aureus*: The united states experience. **PLOS Pathogens**, v. 11, n. 2, p. e1004564, Feb. 2015.

TAN, Li et al. Therapeutic targeting of the *Staphylococcus aureus* accessory gene regulator (*agr*) system. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. 55, p. 1-11, Jan. 2018.

TAJBAKSHI, Ghazal; GOLEMI-KOTRA, Dasantila. The dimerization interface in VraR is essential for induction of the cell wall stress response in *Staphylococcus aureus*: a potential druggable target. **BMC Microbiology**, v. 19, n. 153, p. 1-9, July 2019.

TAKESUE, Yoshio et al. Clinical characteristics of vancomycin minimum inhibitory concentration of 2 µg/ml methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients with bacteremia. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 17, n. 1, p. 52-57, Feb. 2011.

THOMPSON, Terissa A.; BROWN, Paul D. Association between the *agr* locus and the presence of virulence genes and pathogenesis in *Staphylococcus aureus* using a *Caenorhabditis elegans* model. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 54, n. 1, p. 72-76, Jan. 2017.

TONG, Steven Y.C. et al. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations and management. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 3, p. 603-661, July. 2015.

TURLEJ, Agata; HRYNIEWICZ, Waleria; EMPEL, Joanna. Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) classification and typing methods: an overview. **Polish Journal of Microbiology**, v. 60, n. 2, p. 95-103, May 2011.

TURNER, Nicholas A. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 4, p. 203-218, Apr. 2019.

VAN CLEEF, B. A. et al. Health and health-related quality of life in pig farmers carrying livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Epidemiology and Infection**, v. 144, n. 8, p. 1774-1783, June 2016.

VAN HAL, Sebastiaan J.; LODISE, Thomas P.; PATERSON, David L. The clinical significance of vancomycin minimum inhibitory concentration in *Staphylococcus aureus* infections: a systematic review and meta-analysis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 54, n. 6, p. 755-771, Feb. 2012.

_____; PATERSON, David L. Systematic review and meta-analysis of the significance of heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 1, p. 405-410, Jan. 2011.

VIEDMA, Esther et al. Relationship between *agr* dysfunction and reduced vancomycin susceptibility in methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* causing bacteraemia. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 1, p. 51-58, July 2014.

WALSH, Christopher; WENCEWICZ, Timothy. **Antibiotics: Challenges, Mechanisms, Opportunities**. Washington, DC: ASM Press, 2016. p. e42.

WANG, Boyuan; MUIR, Tom W. Regulation of virulence in *Staphylococcus aureus*: Molecular mechanisms and remaining puzzles. **Cell Chemical Biology**, v. 23, n. 2, p. 214-224, Feb. 2016.

WANG, Yubing et al. Novel mutation sites in the development of vancomycin- intermediate resistance in *Staphylococcus aureus*. **Frontiers in microbiology**, v. 7, n. 1, p. 2163, Jan. 2017.

WARYAH, Charlene Babra et al. Diversity of virulence factors associated with west australian methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* isolates of human origin. **BioMed Research International**, v. 2016, n. ID 8651918, p. 1-10, May 2016.

WATKINS, Richard R.; HOLUBAR, Marisa; DAVID, Michael Z. Antimicrobial resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to newer antimicrobial agents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 63, n. 12, p. e01216-19, Dec. 2019.

WEINER-LASTINGER, Lindsey M. et al. Antimicrobial-resistant pathogens associated with adult healthcare-associated infections: Summary of data reported to the National Healthcare Safety Network, 2015-2017. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 41, n. 1, p. 1-18, Jan. 2020.

World Health Organization (WHO). **Antimicrobial resistance: global report on surveillance**. WHO 2014. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/112642/9789241564748_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y> Acesso em: 20 Abr. 2020.

WU, Zhaowei et al. Novel type XII staphylococcal cassette chromosome *mec* harboring a new cassette chromosome recombinase, CcrC2. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 12, p. 7597-7601, Dec. 2015.

YANG, Chien-Chang et al. Risk factors of treatment failure and 30-day mortality in patients with bacteremia due to MRSA with reduced vancomycin susceptibility. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 7868, May 2018.

YANG, Xin et al. Accessory gene regulator (*agr*) dysfunction was unusual in *Staphylococcus aureus* isolated from chinese children. **BMC microbiology**, v. 19, n. 1, p. 95, May 2019.

YAMAZAKI, Yuriko; NAKAMURA, Yuumi; NÚÑEZ, Gabriel. Role of the microbiota in skin immunity and atopic dermatitis. **Allergology International**, v. 66, n.4, p. 539-544, Oct. 2017.

YU, Fangyou et al. Antimicrobial susceptibility, virulence determinant carriage and molecular characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates associated with skin and soft tissue infections. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 19, n. 6, p. 614-622, Sept. 2015.

ZHANG, Kunyan et al. Novel staphylococcal cassette chromosome *mec* type, tentatively designated type VIII, harboring class A *mec* and type 4 *ccr* gene complexes in a Canadian epidemic strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53 n. 2, p. 531-540, Feb. 2009.

ZHANG, Shanshan et al. Systematic review and meta-analysis of the epidemiology of vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* isolates. **PLoS ONE**, v. 10, n. 8, p. e0136082, Aug. 2015.

ZHU, Xuhui et al. Vancomycin intermediate-resistant *Staphylococcus aureus* (VISA) isolated from a patient who never received vancomycin treatment. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 33, n. 1, p. 185-190, Apr. 2015.

3 JUSTIFICATIVA

Staphylococcus aureus resistente à meticilina é um dos principais agentes causadores de infecções relacionadas à assistência à saúde e comunitárias, as quais apresentam altos índices de morbimortalidade. O tratamento de infecções estafilocócicas tem se tornado um grande desafio para a clínica médica, pois além de se tratar de um microrganismo com grande potencial de virulência, as opções de antimicrobianos têm sido reduzidas a partir do surgimento da resistência à penicilina, à meticilina e, mais recentemente, à vancomicina. Uma antibioticoterapia adequada e precoce é fundamental para diminuir os índices de morbimortalidade relacionados aos processos infecciosos causados tanto por *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) quanto por MRSA com reduzida susceptibilidade à vancomicina (hVISA e VISA). Estudos tem mostrado que isolados de MRSA susceptíveis à vancomicina, particularmente aqueles com CIM elevada, com *agr* disfuncional e com o fenótipo de heterorresistência estão associados a falhas no tratamento e mortalidade em pacientes com infecções por MRSA. Nesse contexto, o conhecimento das características de resistência do *S. aureus* resistente à meticilina com heterorresistência à vancomicina, associado às informações clínicas dos pacientes, são imprescindíveis para a tomada de decisão clínica, pois muitas vezes a antibioticoterapia empírica é inadequada, como também para guiar o clínico na escolha do antimicrobiano adequado para o tratamento das infecções causadas por esses microrganismos multirresistentes.

4 OBJETIVO

4.1 Objetivo geral

- Analisar as características moleculares de *Staphylococcus aureus* resistente à metilina com heterorresistência à vancomicina oriundos de hospitais de Porto Alegre.

4.1.1 Objetivos específicos

- Verificar a suscetibilidade aos antimicrobianos e identificar os genes de resistência *aac(6')/aph(2'')*, *ant(4')-Ia*, *aph(3')-IIIa*, *dfrA*, *dfrG*, *ermA*, *ermB*, *ermC*, *linA*, *linB*, *msrA*, *msrB*, *tetK* e *tetM* entre os MRSA;
- Determinar a associação entre a $CIM_{VAN} \geq 1 \mu\text{g/mL}$ e a disfunção do *agr* em infecções invasivas por MRSA;
- Avaliar a expressão de *graSR*, *vraSR* e *walKR* em isolados clínicos de hVISA submetidos a sub-CIM de vancomicina.

5 MANUSCRITOS CIENTÍFICOS

5.1 Manuscrito I

Título: Resistance profile to antimicrobials agents in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from hospitals in South Brazil between 2014-2019.

Revista científica: Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine.

Fator de impacto: 1.498.

Publicação: Aceito em agosto de 2020.

Manuscrito completo: em anexo deste documento.

5.2 Manuscrito II

Título: Vancomycin MIC and *agr* dysfunction in invasive MRSA infections in southern Brazil.

Revista científica: Brazilian Journal of Microbiology.

Fator de impacto: 2.719.

Publicação: Aceito em outubro de 2020.

Manuscrito completo: em anexo deste documento.

5.3 Manuscrito III

Título: Quantitative *graSR/ vraSR/ walKR* gene expression in hVISA isolates from southern Brazil.

Revista científica: Research in Microbiology.

Fator de impacto: 3.970.

Publicação: Em revisão para submeter.

Manuscrito completo: em anexo deste documento.

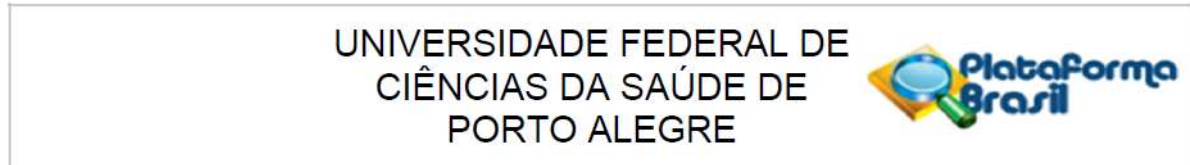
6 CONCLUSÕES

- Altas taxas de resistência foram observadas para eritromicina, ciprofloxacino e clindamicina, e baixas taxas para gentamicina, tetraciclina e sulfametoxazol-trimetoprima. Completa suscetibilidade foram apresentadas para linezolida e vancomicina. A frequência dos genes de resistência *aac(6')/aph(2'')*, *aph(3')-IIIa*, *dfrG*, *ermA* e *tetM* foi alta entre os MRSA. Em contrapartida, baixas taxas foram observadas para os genes *ant(4')-Ia*, *dfrA*, *ermB*, *ermC*, *linA*, *linB*, *msrA*, *msrB* e *tetK*. MRSA SCCmec tipo IV foram mais suscetíveis aos antimicrobianos. Ao contrário, MRSA SCCmec tipo III exibiram maior resistência. As altas taxas de resistência aos antimicrobianos e a diversidade de genes de resistência observados entre os MRSA sugere a urgência no desenvolvimento de novas opções terapêuticas. Apesar da resistência a múltiplos antimicrobianos estar aumentando no cenário do estudo, linezolida e vancomicina mostraram ser alternativas terapêuticas eficazes. Os dados do estudo fornecem informações sobre o perfil de resistência de isolados clínicos de MRSA do Sul do Brasil, que junto com os dados das condições clínicas dos pacientes, pode contribuir para a tomada de decisão clínica.
- Todos os MRSA foram suscetíveis à vancomicina, porém dezessete (9,9%) isolados apresentaram heterorresistência à vancomicina. A proporção de MRSA com $CIM_{VAN} \geq 1,0 \mu\text{g/mL}$ no *agr* grupo II foi significativamente maior do que nos grupos I e III. A disfunção do *agr* foi observada especialmente em MRSA com $CIM_{VAN} \geq 1,0 \mu\text{g/mL}$. Além disso, a disfunção no *agr* foi significativa em isolados com o fenótipo hVISA. Os nossos dados mostram que a disfunção do sistema *agr* em MRSA está associado a $CIM_{VAN} \geq 1 \mu\text{g/mL}$ e ao fenótipo hVISA, o que sugere que a disfunção do *agr* pode conferir vantagens potenciais ao MRSA para a sobrevivência em infecções invasivas.
- Os níveis de transcrição de *graSR*, *vraSR* e *walKR* foram significativamente positivos em quatro, sete e cinco hVISA expostos à vancomicina, respectivamente. Em contraste, três hVISA apresentaram regulação negativa de *graSR* quando exposto à vancomicina, e os níveis de transcrição de *vraSR* e *walKR* foram regulados negativamente em apenas um isolado. Os hVISA 199SA e 203SA apresentaram a expressão gênica regulada positivamente para todos os TCRS testados, e o 68SA exibiu regulação negativa para *graSR* e *walKR* TCRS. Em nossos dados, a expressão de *graSR*/*vraSR*/*walKR* foi

variável nos isolados clínicos de hVISA, que reflete a complexidade molecular do fenótipo de heteroressistência à vancomicina.

7 ANEXOS

7.1 Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UFCSPA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise molecular de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina com heterorresistência à vancomicina oriundos de Porto Alegre.

Pesquisador: Pedro Alves d'Azevedo

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 84143818.9.0000.5345

Instituição Proponente: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.770.338

7.2 Outras publicações científicas

7.2.1 Publicação de 2017



Clinical Microbiology

Evaluation of a selective chromogenic medium for detecting vancomycin-resistant enterococci



Renata Oliveira Soares*, Adriana Medianeira Rossato, Gustavo Enck Sambrano, Neidimar Cezar Corrêa Tolfo, Juliana Caierão, Thiago Galvão da Silva Paim, Pedro Alves d'Azevedo

7.2.2 Publicação de 2018



Rev Soc Bras Med Trop 51(3):361-363, May-June, 2018
doi: 10.1590/0037-8682-0339-2017

Short Communication

Coexistence of virulence genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates

Adriana Medianeira Rossato^[1], Keli Cristine Reiter^[1]
and Pedro Alves d'Azevedo^[1]

[1]. Laboratório de Cocos Gram-positivos, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil.

7.2.3 Publicação de 2019



> [ACESSE AQUI A REVISTA ONLINE](#)

SHORT COMMUNICATION

Diversity of SCCmec types in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates in southern Brazil

Diversidade dos tipos de SCCmec em isolados clínicos de Staphylococcus aureus resistente à meticilina no Sul do Brasil

Diversidad de tipos de SCCmec en aislados clínicos de Staphylococcus aureus resistentes a meticilina en el sur de Brasil

Adriana Medianeira Rossato,¹ Roberto Carlos Freitas Bug,¹ Keli Cristine Reiter,¹ Pedro Alves d'Azevedo.¹
¹Federal University of Health Science of Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.

7.2.4 Publicação de 2020

An Bras Dermatol. 2020;95(3):298-306



Anais Brasileiros de Dermatologia

www.anaisdedermatologia.org.br


INVESTIGATION

Identifying gram-positive cocci in dermatoscopes and smartphone adapters using MALDI-TOF MS: a cross-sectional study^{☆,☆☆}



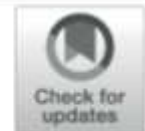
Mauricio de Quadros ^{a,b,*}, Roberto Carlos Freitas Bugs ^a,
Renata de Oliveira Soares ^a, Adriana Medianeira Rossato ^a,
Lisiane da Luz Rocha ^a, Pedro Alves d'Azevedo ^a

Brazilian Journal of Microbiology
<https://doi.org/10.1007/s42770-020-00278-1>



CLINICAL MICROBIOLOGY - RESEARCH PAPER

Coagulase-negative staphylococci in outpatient routines: the implications of switching from CLSI to BrCAST/EUCAST guidelines



Vinicius Pietta Perez¹ • Jéssica Karoliny Baptista Porto Carvalho² • Marianne Schrader de Oliveira³ •
Adriana Medianeira Rossato⁴ • Caroline Dani² • Gertrudes Corção⁵ • Pedro Alves d'Azevedo⁴

7.3 Manuscritos I, II e III

Major Article

Resistance profile to antimicrobials agents in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from hospitals in South Brazil between 2014-2019

Adriana Medianeira Rossato^[1], Muriel Primon-Barros^[1], Lisiane da Luz Rocha^[1], Keli Cristine Reiter^[1], Cícero Armídio Gomes Dias^[1] and Pedro Alves d'Azevedo^[1]

[1]. Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Porto Alegre, RS, Brasil.

Abstract

Introduction: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is a common pathogen causing healthcare-associated infections. Owing to the restricted use of beta-lactams in MRSA infections, non-beta-lactam antimicrobials are required for treatment. However, MRSA can develop resistance mechanisms to non-beta-lactam antimicrobials, which reduces viable treatment options. Here, we evaluated the antimicrobial susceptibility and resistance genes of MRSA isolated from hospitalized patients in South Brazil. **Methods:** The antimicrobial susceptibilities of hospital MRSA (217) isolates were determined by disk diffusion or microdilution methods. Additionally, the presence of 14 resistance genes and SCCmec typing was performed by PCR. **Results:** Among the antimicrobials tested, we observed high erythromycin (74.2%), ciprofloxacin (64.5%), and clindamycin (46.1%) resistance rates and complete susceptibility to linezolid and vancomycin. Seventeen different patterns of MRSA antimicrobial resistance were observed, of which 42.9% represented multidrug resistance. Among erythromycin-resistant MRSA, 53.4%, 45.3%, 37.9%, 13.0%, and 6.8% carried *ermA*, *msrA*, *msrB*, *ermC*, and *ermB* genes, respectively. Among clindamycin-resistant MRSA, 83%, 17%, 10%, 4%, and 2% carried *ermA*, *ermC*, *ermB*, *linA*, and *linB* genes, respectively. Among gentamicin-resistant MRSA, 96.8%, 83.9%, and 9.7% carried *aac(6)/aph(2'')*, *aph(3')-IIIa*, and *ant(4')-Ia* genes, respectively. Among tetracycline-resistant MRSA, 6.5% and 93.5% carried *tetK* and *tetM* genes, respectively. Lastly, among trimethoprim/sulfamethoxazole-resistant MRSA, 13.3% and 100% carried *dfpA* and *dfpG* genes, respectively. The SCCmec type IV isolates were detected more frequently, whereas the SCCmec type III isolates exhibited higher multidrug resistance. **Conclusions:** The study data provides information regarding the MRSA resistance profile in South Brazil that is associated with the clinical conditions of patients and can contribute to clinical decision-making.

Keywords: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Healthcare-associated infections. Antimicrobial susceptibility. Resistance genes.

INTRODUCTION

Antimicrobial resistance poses a significant challenge to modern medicine as well as to the possibility of effective treatment of infectious diseases¹. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is one of the most frequent causes of community- and healthcare-associated infections (CA-MRSA and HA-MRSA, respectively). A major concern remains owing to higher morbidity and mortality when compared with infections caused by methicillin-susceptible strains (MSSA), along with increased hospitalization and health care costs². MRSA strains pose a threat to public health


owing to their potential for genetic adaptation and remarkable ability to acquire resistance to multiple antimicrobials, along with the implications for the treatment of this pathogen^{3,4}.

Methicillin resistance is mediated by the acquisition of genes (*mecA* or *mecC*) found in the mobile genetic element called staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCCmec), which encodes an altered penicillin-binding protein (PBP2a or PBP2') that confers low affinity for most beta-lactams^{5,6}. The SCCmec elements are classified into thirteen different types (SCCmec I-XIII) based on structural organization and genetic content². CA-MRSA strains generally harbor SCCmec type IV or V, and are susceptible to non-beta-lactam antimicrobials. HA-MRSA strains commonly harbor SCCmec types I, II, or III, which contain genes that confer resistance to non-beta-lactam antimicrobials⁷.

Owing to the restricted use of beta-lactams for treating infections caused by MRSA, non-beta-lactam antimicrobials, such as

Corresponding author: MSc. Adriana Medianeira Rossato.

e-mail: adrimfarma@yahoo.com.br

 <https://orcid.org/0000-0001-5597-0790>

Received 4 July 2020

Accepted 12 August 2020

aminoglycosides, fluoroquinolones, folate inhibitors, glycopeptides, lincosamides, lipopeptide, macrolides, oxazolidinones, and tetracyclines, are required for the treatment of staphylococcal infections. However, these therapeutic options are reduced when MRSA isolates develop resistance mechanisms to survive in conditions with high concentrations of these antimicrobials^{4,8,9}.

Resistance is associated with different molecular mechanisms, as follows: 1) inactivation of antimicrobials by enzymes, such as inactivation of aminoglycosides by aminoglycoside-modifying enzymes (AMEs) (encoded by *aac(6')/aph(2'')*, *aph(3')-IIIa*, and *ant(4')-Ia* genes)¹⁰, trimethoprim by variants of dihydrofolate reductases (DHFRs) (*dhfrA* and *dhfrG*)¹¹, or lincosamide by lincosamide nucleotidyltransferases (*linA* and *linB*)^{12,13}; 2) alterations in ribosomal binding site (*ermA*, *ermB*, and *ermC*), which confers resistance to macrolides and lincosamides^{9,12}; 3) active efflux pumps, such as those encoded by *msrA*, *msrB*, and *tetK*¹², which impart resistance to macrolides, type B streptogramins, and tetracycline, respectively¹⁴; and 4) ribosomal protection (*tetM*), that confers resistance to tetracycline¹⁴. These mechanisms limit the therapeutic options available for the treatment and control of MRSA infections.

The latest data from the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) show more than ten thousand deaths caused by MRSA, with high healthcare costs, in the US¹⁵. In Latin America, the resources for monitoring the epidemiology of MRSA remain limited. Additionally, the true nature and extent of MRSA infections are inadequately known; this indicates that local data collection should be coordinated with effective interventions for making clinical decisions for the control of staphylococcal infections¹⁶. Considering the importance of global surveillance studies on resistance profiles, along with the current challenges related to the treatment of MRSA infections, this study aimed to evaluate antimicrobial susceptibility and identify the resistance genes in MRSA obtained from hospitals in South Brazil.

METHODS

Study design and clinical strains

This cross-sectional observational study was conducted using 217 MRSA isolates obtained between January 2014 and January 2019 (40 in 2014, 49 in 2015, 75 in 2016, 29 in 2017, and 24 in 2018) from hospitals in Porto Alegre in South Brazil. The study was registered under the Institutional Ethics Committee number 2.770.338. The strains were isolated from respiratory tract (75; 34.6%), blood (55; 25.3%), skin and soft tissue (42; 19.4%), bone and connective tissue (24; 11.1%), and sterile cavity liquid (12; 5.5%) samples, and from medical devices (9; 4.1%). The isolates were cryopreserved and stored at -20 °C until testing.

Identification of *S. aureus*

The isolates were identified as *S. aureus* using conventional microbiological methods, such as evaluation of colony morphology on sheep blood agar, Gram staining, catalase activity, production of coagulase, and growth on mannitol salt agar. Methicillin resistance was confirmed by the cefoxitin disk diffusion method and polymerase chain reaction (PCR) for the detection of *mecA* gene according to Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) guidelines, 2019¹⁷.

Antimicrobial susceptibility tests

The susceptibility of isolates to ciprofloxacin (5 µg), clindamycin (2 µg), erythromycin (15 µg), gentamycin (10 µg), linezolid (30 µg), tetracycline (30 µg), and trimethoprim/sulfamethoxazole (1.25 µg/23.75 µg) was determined by the disk diffusion method on Mueller-Hinton agar (Oxoid, Basingstoke, England).

Clindamycin susceptibility was determined using a disk approximation test with erythromycin and clindamycin (D-test). The following resistant phenotypes were identified in the D-test: inducible phenotype (iMLS_B), when resistant to erythromycin and susceptible to clindamycin with formation of a D-shaped zone, constitutive resistance phenotype (cMLS_B) when resistant to both erythromycin and clindamycin, and MS phenotype when resistant to erythromycin and susceptible to clindamycin without formation of a D-shaped zone¹⁸.

The minimal inhibitory concentration (MIC) of vancomycin was determined using the microdilution method in Mueller-Hinton broth (Oxoid, Basingstoke, England). The results of antimicrobial susceptibility were interpreted according to the CLSI guidelines¹⁷. The strains obtained from the American Type Culture Collection (ATCC), *S. aureus* ATCC 25923 and *S. aureus* ATCC 29213, were used as controls.

Detection of antimicrobial resistance genes

The detection of genes related to antimicrobial resistance, including (*aac(6')/aph(2'')*, *ant(4')-Ia*, *aph(3')-IIIa*, *dhfrA*, *dhfrG*, *ermA*, *ermB*, *ermC*, *linA*, *linB*, *msrA*, *msrB*, *tetK*, and *tetM*), in MRSA was confirmed by conventional PCR, as previously described, with certain modifications (Table 1)^{10,19-23}.

Bacterial deoxyribonucleic acid was extracted by using Chelex[®] 100 (Bio-Rad, Richmond, CA, USA) and Proteinase K (Sigma-Aldrich, Poole, UK). The PCR reaction contained 0.2 mM of each deoxyribonucleotide triphosphate (10 mM), 2 mM of MgCl₂ (50 mM), 1X PCR buffer (10 X), 0.5 µM of forward/reverse primers (10 µM), 1.5 U of Taq DNA polymerase (5 U/µL), and 1 µL of DNA template in a total volume of 25 µL. Amplifications were performed using a LifePro Thermal Cycler (Hangzhou Bioer Technology Co. Ltd., Hangzhou, China). The PCR amplicons were separated by electrophoresis in a 2.0% agarose gel (Sigma-Aldrich, USA) and stained with 0.1% ethidium bromide (0.4 µg/mL).

The PCR-positive controls, *S. aureus* JCSC 4469 (*aac(6')/aph(2'')*), *S. aureus* N315 (*ant(4')-Ia*), *S. aureus* JCSC 4488 (*aph(3')-IIIa* and *dhfrG*), *S. aureus* WIS (*dhfrA*), *S. aureus* NCTC 10442 (*ermA*), *S. aureus* HDE 288 (*ermB*), *S. aureus* JCSC 4474 (*ermC*), *S. aureus* JCSC 6082 (*linA*), *S. aureus* JCSC 2172 (*linB*), *S. aureus* NCTC 8325 (*msrA* and *msrB*), *S. aureus* 85/2082 (*tetK*), and *S. aureus* JCSC 6943 (*tetM*) were included. A tube containing all components of the PCR mixture, except the template DNA, was used as the negative control.

SCCmec typing

The SCCmec types I-X were identified by multiplex-PCR, as previously described²⁴. The *S. aureus* strains NCTC 10442, N315, 85/2082, JCSC 4474, WIS, HDE 288, JCSC 6082, JCSC 6943,

TABLE 1: Primer sequences and amplification conditions used to detect resistance genes.

Target gene	Primer sequence (5'-3')	Amplicon (bp)	Amplification conditions	Ref.
<i>aac(6)/aph(2'')</i>	F: CAG AGC CTT GGG AAG ATG AAG	348	Pre cycle: 94 °C – 3 min	11
	R: CCT CGT GTAATT CAT GTT CTG GC			
<i>ant(4')-Ia</i>	F: CAAACT GCT AAA TCG GTA GAA GCC	294	35 cycles: 94 °C – 40 s, 55 °C – 40 s, 72 °C – 40 s	
	R: GGA AAG TTG ACC AGA CAT TAC GAA			
<i>aph(3')-IIIa</i>	F: GGC TAA AAT GAG AAT ATC ACC GG	523	Last cycle: 72 °C – 2 min	
	R: CTT TAA AAA ATC ATA CAG CTC GCG			
<i>dfpA</i>	F: CAC TTG TAA TGG CAC GGA AA	270	Pre cycle: 94 °C – 4 min 30 cycles: 94 °C – 1 min, 52 °C – 30 s, 72 °C – 1 min	19
	R: CGA ATG TGT ATG GTG GAA AG			
<i>dfpG</i>	F: TGC TGC GAT GGA TAA GAA	405	Last cycle: 72 °C – 4 min	
	R: TGG GCA AAT ACC TCA TTC C			
<i>ermA</i>	F: TCT AAA AAG CAT GTA AAA GAA	645	Pre cycle: 93 °C – 3 min 35 cycles: 93 °C – 1 min, 52 °C – 1 min, 72 °C – 1 min	20
	R: CTT CGA TAG TTT ATT AAT ATT AGT			
<i>ermB</i>	F: GAA AAG GTA CTC AAC CAA ATA	639	Last cycle: 72 °C – 5 min	
	R: AGT AAC GGT ACT TAA ATT GTT TAC			
<i>ermC</i>	F: TCA AAA CAT AAT ATA GAT AAA	642	Pre cycle: 93 °C – 3 min 35 cycles: 93 °C – 1 min, 53 °C – 1 min, 72 °C – 1 min Last cycle: 72 °C – 5 min	20
	R: GCT AAT ATT GTT TAA ATC GTC AAT			
<i>linA</i>	F: GTA TTA ACT GGA AAA CAG CAA AG	323	Pre cycle: 94 °C – 5 min 35 cycles: 94 °C – 45 s,	21
	R: GAG CTT CTT TTG AAA TAC ATG G			
<i>linB</i>	F: CCT ACC TAT TGT TTG TGG AA	925	48 °C 45 s, 72 °C – 1 min Last cycle: 72 °C – 5 min	
	R: ATA ACG TTA CTC TCC TAT TC			
<i>msrA</i>	F: GGC ACA ATA AGA GTG TTT AAA GG	940	Pre cycle: 94 °C – 5 min 25 cycles: 94 °C – 1 min,	22
	R: AAG TTA TAT CAT GAA TAG ATT GTC CTG TT			
<i>msrB</i>	F: TAT GAT ATC CAT AAT AAT TAT CCA ATC	595	50 °C 1 min, 72 °C – 1 min Last cycle: 72 °C – 10 min	
	R: AAG TTA TAT CAT GAA TAG ATT GTC CTG TT			

Continue...

TABLE 1: Continuation.

Target gene	Primer sequence (5'-3')	Amplicon (bp)	Amplification conditions	Ref.
<i>tetK</i>	F: CAG CAG ATC CTA CTC CTT	168	Pre cycle: 93 °C – 5 min	21
	R: TCG ATA GGAACA GCA GTA		35 cycles: 93 °C – 1 min, 54 °C 1 min, 72 °C – 1 min Last cycle: 72 °C – 10 min	
<i>tetM</i>	F: GTG GAC AAA GGT ACA ACG AG	405	Pre cycle: 93 °C – 5 min	23
	R: CGG TAAAGT TCG TCA CAC AC		35 cycles: 93 °C – 1 min, 52 °C 1 min, 72 °C – 1 min Last cycle: 72 °C – 10 min	

aac(6')/aph(2''): gene that encodes aminoglycoside-6'-N-acetyltransferase/2''-O-phosphoryltransferase; *ant(4')-Ia*: gene that encodes aminoglycoside-4'-O-phosphoryltransferase I; *aph(3')-IIIa*: gene that encodes aminoglycoside-3'-O-phosphoryltransferase III; *dfrA*: gene that encodes dihydrofolate reductase A; *dfrG*: gene that encodes dihydrofolate reductase B; *ermA*: gene that encodes erythromycin ribosomal methylase A; *ermB*: gene that encodes erythromycin ribosomal methylase B; *ermC*: gene that encodes erythromycin ribosomal methylase C; *linA*: gene that encodes lincosamide nucleotidyltransferases A; *linB*: gene that encodes lincosamide nucleotidyltransferases B; *msrA*: gene that encodes macrolides streptogramins resistance A; *msrB*: gene that encodes macrolides streptogramins resistance B; *tetK*: tetracycline resistance protein K; *tetM*: tetracycline resistance protein M.

and JCSC 6945 were used as the positive controls for the SCC*mec* types I, II, III, IV, V, VI, VII, IX, and X, respectively. The PCR mixture components without the DNA template were used as negative control.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SPSS version 20.0 software (SPSS, Chicago, IL, USA). Chi-square test or Fisher's exact test was performed to analyze the results. *p* value < 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Antimicrobial susceptibility

In the antimicrobial susceptibility tests of the MRSA isolates, the highest resistance rates were observed for erythromycin (74.2%; 161/217), ciprofloxacin (64.5%; 140/217), and clindamycin (46.1%; 100/217). Furthermore, 2.3% (5/217) of the isolates exhibited intermediate resistance to erythromycin and 1.4% (3/217) to clindamycin. The overall prevalence of iMLS_B, cMLS_B, and MS_B phenotypes was 7.4% (16/217), 46.1% (100/217), and 26.3% (57/217), respectively. Conversely, lower resistance rates were observed against gentamicin (28.6%; 62/217), tetracycline (14.3%; 31/217), and trimethoprim-sulfamethoxazole (13.8%; 30/217). Additionally, 1.8% (4/217) of the isolates exhibited intermediate resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole. All isolates were susceptible to linezolid and vancomycin, with MIC values to vancomycin of 0.25 µg/mL (41.0%; 89/217), 0.5 µg/mL (26.3%; 57/217), 0.75 µg/mL (16.6%; 36/217), 1 µg/mL (13.4%; 29/217), and 1.5 µg/mL (2.8%; 6/217) (Figure 1).

Among the 177 out of the 217 MRSA isolates that exhibited resistance to non-beta-lactam antimicrobials, we observed 17 distinct patterns (P) of antimicrobial resistance (Figure 2), of which 12 were grouped and 5 were singular patterns. The dominant resistance pattern (P1)—erythromycin and ciprofloxacin

resistance—was observed in 37 isolates. The fifth pattern of antimicrobial resistance (P5) was identified in 18 isolates that were resistant to six antimicrobials. Furthermore, resistance patterns to five (P6) and four (P2) antimicrobials were observed in 10 and 31 isolates, respectively (Figure 2).

Upon analyzing the prevalence of MRSA resistance among isolates collected in different years, we observed that 93 isolates (42.9%) exhibited multidrug resistance, i.e., they were resistant to three or more classes of antimicrobial agents, excluding isolates with intermediate resistance. Among them, 32 (34.4%) exhibited resistance against at least three different classes of antimicrobials, 28 (30.1%) against four classes, 15 (16.1%) against five classes, and 18 (19.4%) against six classes.

Detection of antimicrobial resistance genes

The detection of the resistance genes showed that, among erythromycin-resistant MRSA representing the macrolides class, the most frequently encountered gene was *ermA* (86; 53.4%), followed by *msrA* (73; 45.3%), *msrB* (61; 37.9%), *ermC* (21; 13.0%), and *ermB* (11; 6.8%); 3 (1.9%) isolates tested negative for these genes. In the lincosamides class, among 100 clindamycin-resistant isolates, 83 (83%) harbored *ermA*, 17 (17%) harbored *ermC*, 10 (10%) harbored *ermB*, 4 (4%) harbored *linA*, and 2 (2%) harbored *linB*; 4 (4%) isolates tested negative for these genes. Among gentamicin-resistant MRSA, which represented the aminoglycosides class, out of 62 isolates, 60 (96.8%) harbored *aac(6')/aph(2'')*, 52 (83.9%) harbored *aph(3')-IIIa*, and 6 (9.7%) harbored *ant(4')-Ia* genes. In the tetracyclines class, of the 31 tetracycline-resistant MRSA isolates, 2 (6.5%) harbored *tetK* and 29 (93.5%) harbored *tetM* genes. Furthermore, in the folate inhibitors class, of the 30 trimethoprim/sulfamethoxazole-resistant MRSA isolates, 4 (13.3%) harbored *dfrA* and 30 (100%) harbored *dfrG* genes.

Among macrolide-resistant MRSA, the most common gene combination was *msrA* + *msrB* (27.3%), followed by *ermA* +

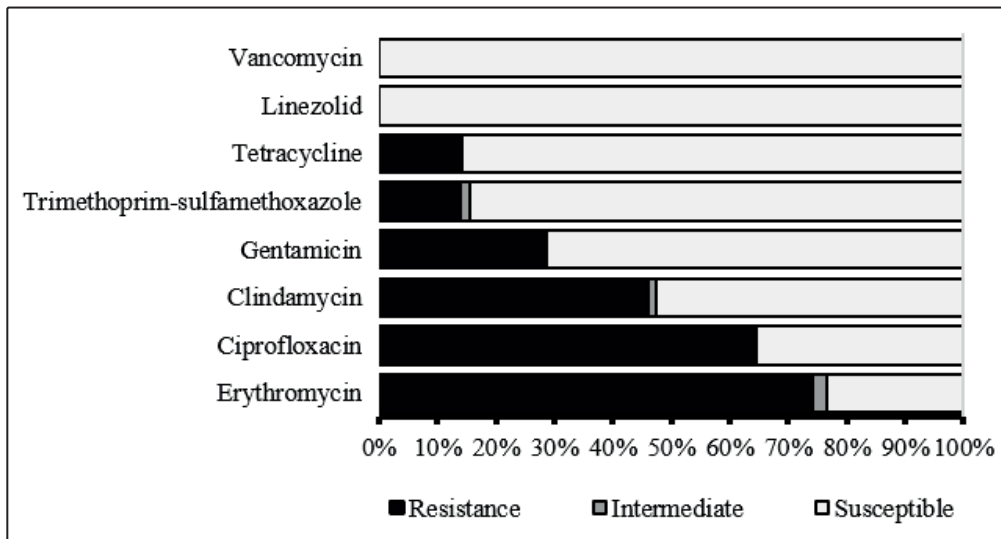


FIGURE 1: Antimicrobial susceptibility of the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates.

msrA + *msrB* (5%), and *ermA* + *ermB* + *msrA* + *msrB* (2.5%). In the aminoglycosides class, the gene combination *aac(6')/aph(2'')* + *aph(3')-IIIa* (82.2%) was more common, followed by *aac(6')/aph(2'')* + *ant(4')-Ia* (4.8%), and *aac(6')/aph(2'')* + *aph(3')-IIIa* + *ant(4')-Ia* (1.6%). Finally, among the fluoroquinolones, lincosamides, and folate inhibitors, the *gyrA* + *grlA* (80.7%), *ermA* + *ermB* (7.0%), and *dfrA* + *dfrG* (13.3%) combinations, respectively, were observed more frequently. The pattern of antimicrobial-resistance gene distribution among resistant MRSA is outlined in **Table 2**.

SCCmec typing

The SCCmec type IV (57.1%) was the most frequent SCCmec type among the MRSA isolates, followed by type III (17.1%), type I (13.4%), type II (9.2%), and type V (1.4%). Four MRSA isolates were nontypable. Isolates of the MRSA SCCmec types VI, VII, IX, and X were not detected. The antimicrobial resistance distribution pattern with respect to the MRSA SCCmec types is presented in **Table 3**.

In general, the MRSA SCCmec type III strains exhibited higher multidrug resistance ($p < 0.001$). In contrast, the MRSA SCCmec type IV strains were more multidrug-susceptible compared to the other SCCmec types ($p < 0.001$). The MRSA SCCmec type I, type II, and type III strains were more resistant to ciprofloxacin, clindamycin, and erythromycin than the MRSA SCCmec type IV strains, which were significantly susceptible to the same antimicrobials ($p < 0.001$). Similarly, the MRSA SCCmec type I and type II strains were more resistant to these antimicrobials than MRSA SCCmec type V strains, which were significantly susceptible ($p < 0.001$). In addition, the MRSA SCCmec type I and type III strains were more resistant to gentamicin than the MRSA SCCmec type IV and type V strains, that were susceptible to the same antimicrobial ($p < 0.001$). Lastly, the MRSA SCCmec type III strains were more resistant to trimethoprim-sulfamethoxazole and tetracycline than most MRSA SCCmec type I, type II, and type IV strains, which were susceptible to the same antimicrobials ($p < 0.001$).

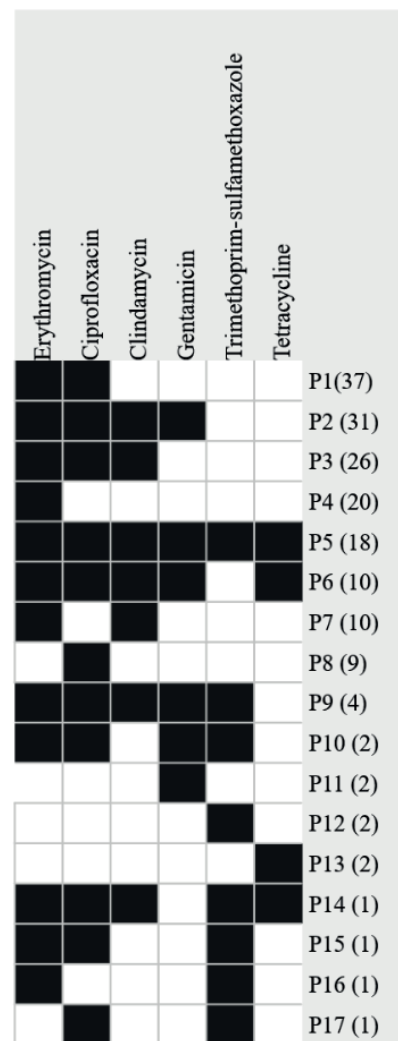


FIGURE 2: Heat map of antimicrobial resistance patterns among 217 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates.

TABLE 2: Distribution of antimicrobial resistance genes.

Antimicrobial classes	Number of resistant MRSA isolates (%)	Resistance genes (%)
Macrolides	Erythromycin 161 (74.2)	<i>ermA</i> 64 (39.7) <i>ermC</i> 14 (8.7) <i>msrA</i> 10 (6.2) <i>msrB</i> 2 (1.2) <i>ermA</i> + <i>ermB</i> 2 (1.2) <i>ermA</i> + <i>ermC</i> 1 (0.6) <i>ermA</i> + <i>msrA</i> 2 (1.2) <i>msrA</i> + <i>msrB</i> 44 (27.3) <i>ermA</i> + <i>ermB</i> + <i>emrC</i> 2 (1.2) <i>ermA</i> + <i>ermB</i> + <i>msrA</i> 1 (0.6) <i>ermA</i> + <i>msrA</i> + <i>msrB</i> 8 (5.0) <i>emrC</i> + <i>msrA</i> + <i>msrB</i> 2 (1.2) <i>ermA</i> + <i>ermB</i> + <i>emrC</i> + <i>msrA</i> 1 (0.6) <i>ermA</i> + <i>ermB</i> + <i>msrA</i> + <i>msrB</i> 4 (2.5) <i>ermA</i> + <i>ermB</i> + <i>emrC</i> + <i>msrA</i> + <i>msrB</i> 1 (0.6) Unknown 3 (1.9)
Lincosamides	Clindamycin 100 (46.1)	<i>ermA</i> 68 (68.0) <i>ermC</i> 13 (13.0) <i>ermA</i> + <i>ermB</i> 7 (7.0) <i>ermA</i> + <i>ermC</i> 1 (1.0) <i>ermA</i> + <i>ermB</i> + <i>ermC</i> 3 (3.0) <i>ermA</i> + <i>linA</i> 2 (2.0) <i>ermA</i> + <i>linA</i> + <i>linB</i> 2 (2.0) Unknown 4 (4.0)
Aminoglycosides	Gentamycin 62 (28.6)	<i>ant(4')-Ia</i> 2 (3.2) <i>aac(6')/aph(2'')</i> 5 (8.1) <i>aac(6')/aph(2'')</i> + <i>ant(4')-Ia</i> 3 (4.8) <i>aac(6')/aph(2'')</i> + <i>aph(3')-IIIa</i> 51 (82.2) <i>aac(6')/aph(2'')</i> + <i>aph(3')-IIIa</i> + <i>ant(4')-Ia</i> 1 (1.6)
Folate inhibitors	Trimethoprim-sulfamethoxazole 30 (13.8)	<i>dfrG</i> 26 (86.7) <i>dfrA</i> + <i>dfrG</i> 4 (13.3)
Tetracyclines	Tetracycline 31 (14.3)	<i>tetK</i> 2 (6.5) <i>tetM</i> 29 (93.5)

aac(6')/aph(2''): gene that encodes aminoglycoside-6'-N-acetyltransferase/2''-O-phosphoryltransferase; *ant(4')-Ia*: gene that encodes aminoglycoside-4'-O-phosphoryltransferase I; *aph(3')-IIIa*: gene that encodes aminoglycoside-3'-O-phosphoryltransferase III; *dfrA*: gene that encodes dihydrofolate reductase A; *dfrG*: gene that encodes dihydrofolate reductase B; *ermA*: gene that encodes erythromycin ribosomal methylase A; *ermB*: gene that encodes erythromycin ribosomal methylase B; *ermC*: gene that encodes erythromycin ribosomal methylase C; *linA*: gene that encodes lincosamide nucleotidyltransferases A; *linB*: gene that encodes lincosamide nucleotidyltransferases B; *msrA*: gene that encodes macrolides streptogramins resistance A; *msrB*: gene that encodes macrolides streptogramins resistance B; *tetK*: tetracycline resistance protein K; *tetM*: tetracycline resistance protein M.

TABLE 3: Antimicrobial resistance distribution between the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* SCCmec types.

Antimicrobials	SCCmec types					
	I (n = 29)	II (n = 20)	III (n = 37)	IV (n = 124)	V (n = 3)	NT (n = 4)
Erythromycin	28 (96.6%) ^{c,d}	20 (100%) ^{c,d}	33 (89.2%) ^{a,c}	75 (60.5%) ^b	1 (33.3%)	4 (100%)
Ciprofloxacin	28 (96.6%) ^{c,d}	20 (100%) ^{c,d}	33 (89.2%) ^{a,c}	55 (44.0%) ^b	-	4 (100%)
Clindamycin	28 (96.6%) ^{c,d}	19 (95.0%) ^{c,d}	32 (86.5%) ^{a,c}	18 (14.5%) ^b	1 (33.3%)	2 (50.0%)
Gentamycin	24 (82.8%) ^e	2 (10.0%)	29 (78.4%) ^{a,e}	3 (2.4%) ^b	-	4 (100%)
Tetracycline	-	2 (10.0%)	26 (70.3%) ^{a,f}	2 (1.6%) ^b	1 (33.3%)	-
Trimethoprim-sulfamethoxazole	-	1 (5.3%)	20 (54.1%) ^{a,f}	5 (4.0%) ^b	-	4 (100%)

NT: non-typable. Data are indicated by the number of isolates (%).

^a MRSA SCCmec type III was more multidrug-resistant (p < 0.001).

^b MRSA SCCmec type IV was more multidrug-susceptible (p < 0.001).

^c MRSA SCCmec types I, II, and III were more resistant to erythromycin, ciprofloxacin, and clindamycin, than MRSA SCCmec type IV (p < 0.001).

^d MRSA SCCmec types I and II were more resistant to erythromycin, ciprofloxacin, and clindamycin, than MRSA SCCmec type V (p < 0.001).

^e MRSA SCCmec types I and III were more resistant to gentamycin than MRSA SCCmec types IV and V (p < 0.001).

^f MRSA SCCmec type III was more resistant to trimethoprim-sulfamethoxazole and tetracycline than most MRSA SCCmec types I, II, and IV (p < 0.001)

DISCUSSION

In the last two decades, the proportion of MRSA has increased worldwide¹⁸. At present, MRSA may be considered the first class of multidrug-resistant (MDR) pathogens, based on the emergence of the concomitant resistance of MRSA to multiple commonly used non-beta-lactam antimicrobials (for e.g., aminoglycosides, macrolides, fluoroquinolones, and tetracycline)²⁵⁻²⁷.

In the present study, 177 MRSA (81.6%) isolates exhibited resistance to at least one of the non-beta-lactam antimicrobials tested, which is indicative of the high resistance rates for erythromycin, ciprofloxacin, and clindamycin antimicrobials. These resistance rates are in accordance with findings from other studies in southern²⁸⁻³⁰ and other regions of Brazil^{31,32}.

Erythromycin and clindamycin are members of the macrolide-lincosamide-streptogramin B (MLS_B) family, which exhibit excellent potential in MRSA infections and are frequently used to treat staphylococcal skin and soft tissue infections (SSTIs)^{12,13,33}. *erm* gene-mediated resistance to MLS_B can be expressed in constitutive (cMLS_B phenotype) or inducible (iMLS_B phenotype) forms^{18,34,35}. In this study, the prevalence of cMLS_B was 38.7%, whereas other studies conducted in Brazil reported cMLS_B resistance of approximately 14.3% and 68.2%^{34,36}.

Besides, an important issue in the application of clindamycin is the inducible resistance owing to the presence of methylase synthesis inducers, such as erythromycin, which leads to increased failure in clinical therapeutic applications^{18,34}. In this study, a prevalence of the iMLS_B phenotype was observed among 7.4% of the MRSA isolates tested, which is consistent with that reported by Bottega et al (7.9%)³⁶, and higher than that reported by Pereira et al. (4.5%)³⁴, with both studies conducted in Brazil.

The distribution of resistance genes detected in this analysis demonstrates that *ermA* (39.6%) was the predominant gene compared to *ermC* (9.7%) and *ermB* (5.1%). In contrast, in another Brazilian study, it was shown that *ermC* (38.6%; 17/44) was identified more frequently than *ermA* (9.1%; 4/44)^{9,37-41}. In this study, one MRSA isolate carried both *ermA* and *ermC*, which encode proteins for erythromycin and clindamycin resistance. The coexistence of these genes in MRSA isolates was also observed in other studies^{9,34,42}.

Among the *msr* genes, *msrA*, which confers resistance to macrolides and type B streptogramins, had the highest prevalence (33.6%), followed by *msrB* (28.1%). In contrast to the data from this study, resistance via efflux pumps (associated with *msrA/msrB*) was not detected in MRSA in a study by Khodabandeh et al.⁹, whereas Sarrou et al.⁴² detected only *msrA* in MRSA isolates. The *msrA + msrB* gene combination of resistance was more prevalent in this study. Additionally, the *ermA + ermB + msrA + msrB* gene combination was detected in four isolates. These findings are consistent with those of a study on the development of genotype prevalence in Serbia performed by Misic et al.⁴³, in which similar results of genetic combinations were reported.

The predominance of MRSA in SSTIs and their treatment using ciprofloxacin consequently led to an increase in fluoroquinolone resistance, and thereby limited the therapeutic use of this class of

antimicrobials^{44,45}. In this study, 64.5% of MRSA isolates were resistant to ciprofloxacin. In two studies with MRSA isolated from seven hospitals in Rio de Janeiro, Brazil, resistance to fluoroquinolones varied between 60.6% and 93%^{32,46} while in another study that used isolates collected from three cities in a southern Brazilian state, 79% of the MRSA isolates exhibited fluoroquinolone resistance³⁰.

In this study, the rates for trimethoprim-sulfamethoxazole, tetracycline, and gentamicin resistance were observed to be low, which was consistent with recent reports from other studies conducted in Brazil^{29,31}.

Trimethoprim-sulfamethoxazole (folate inhibitors class) is an alternative choice for the treatment of mild to moderate SSTIs caused by MRSA, based on the results of susceptibility tests^{4,11}. The presence of the *dfrG* gene was confirmed in 86.7% of MRSA isolates, and the association between *dfrA* and *dfrG* was confirmed in 13.3%. Moreover, Coelho et al.⁴⁷ compared *S. aureus* isolates collected from Portuguese-speaking African countries with a Brazilian MRSA clone (ST239-III), and observed 78% prevalence of the *dfrG* gene, 19% of the *dfrA* gene, or 3% of both.

Aminoglycosides constitute an important class of antimicrobials, especially for the treatment of complicated staphylococcal infections synergistically with glycopeptides or beta-lactams⁴⁸. In an attempt to confirm the resistance to aminoglycosides in MRSA, the presence of genetic elements that encode AMEs was evaluated, with 82.2% of MRSA exhibiting the *aac(6')/aph(2'')/aph(3')-IIIa* gene association. Previous reports showed the presence of this association among 9% and 55.5% isolates^{10,49}. Tetracycline has exhibited clinical efficacy in cases of community-associated MRSA SSTIs⁵⁰. In this study, the presence of *tetK* and *tetM* genes was observed in 6.5% and 93.5% of isolates, respectively.

In contrast, all the MRSA isolates tested were susceptible to linezolid and vancomycin, as observed in other Brazilian studies⁵¹⁻⁵⁴. Currently, resistance to oxazolidinones (including linezolid) among *S. aureus* is rare, whereas prolonged exposure to vancomycin leads to the emergence of MRSA with reduced vancomycin susceptibility, and the strains are categorized as vancomycin-intermediate *S. aureus* (VISA) and heterogeneous VISA (hVISA)⁵⁵, as reported in other studies conducted in Brazil²⁸⁻⁵⁶. Nevertheless, vancomycin remains the first-line therapeutic choice for the treatment of invasive MRSA infections, such as bacteremia, pneumonia, and osteoarticular infection; linezolid is an alternative for the treatment of invasive hVISA and VISA infections^{3,4}.

SCC*mec* typing provides useful information regarding resistance to antimicrobials and the origin of *S. aureus* strains⁵⁷. In our study, SCC*mec* IV and III were the most common SCC*mec* types, which is consistent with findings reported earlier⁵⁷⁻⁵⁹. In addition, the MRSA SCC*mec* type III strains exhibited higher multidrug resistance, whereas the MRSA SCC*mec* type IV were more multidrug-susceptible compared to other SCC*mec* types. Previous studies have shown that HA-MRSA isolates generally contain SCC*mec* types I, II, or III, which confer resistance to non-beta-lactam antimicrobials and tend to lead to multidrug-resistance^{7,60}. Furthermore, SCC*mec* type IV was most commonly detected among the MRSA isolates,

and this characteristic is often observed in CA-MRSA strains, which are generally susceptible to non-beta-lactam antimicrobials and harbor SCC mec types IV or V.

Our study has certain limitations. First, we were unable to test other therapeutic options, such as ceftaroline, daptomycin, and tigecycline. Second, we could not determine the MICs for all the antimicrobials tested. Despite these limitations, the HA-MRSA isolates in our setting were confirmed to be MDR, which limits the therapeutic options available for the treatment of infections caused by such MRSA isolates. Third, the isolates included in this study were not genotyped to assess the clonality. In this study, high erythromycin, ciprofloxacin, and clindamycin resistance rates were observed, and the isolates exhibited considerable diversity of genes related to non-beta-lactam resistance mechanisms in MRSA strains. This indicates the urgency for the development of alternative therapeutic options. Despite the fact that multidrug resistance is increasing in the study setting, linezolid and vancomycin appear to be effective therapeutic options for MDR-MRSA strains. The study data provide information regarding the resistance profile of MRSA isolates from South Brazil, and along with data on the clinical conditions of the patients, it can contribute to the clinical decision-making process.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Postgraduate Program in Health Sciences of Porto Alegre (PPGCS) of the Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSA).

FINANCIAL SUPPORT

We received financial support from the Research Foundation of the State of Rio Grande do Sul (FAPERGS - 02/2017) and National Council for Scientific and Technological Development (CNPq - 14/2014).

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

AMR: conception and planning of the study; obtaining, analyzing and interpreting data; statistical analysis; elaboration and writing of the manuscript; effective participation in research orientation; critical review of the literature and the manuscript; approval of the final version of the manuscript. MPB: elaboration and writing of the manuscript; critical review of the literature and the manuscript; approval of the final version of the manuscript. LLR: planning of the study; approval of the final version of the manuscript. KCR: critical review of the literature and the manuscript; approval of the final version of the manuscript. CAGD: critical review of the manuscript; approval of the final version of the manuscript. PAdA: conception and planning of the study; effective participation in research orientation; critical review of the literature and the manuscript; approval of the final version of the manuscript.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

1. World Health Organization (WHO). Global Action Plan on Antimicrobial Resistance. Technical Report. Geneva: WHO; 2015. 28 p.

2. Lakhundi S, Zhang K. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: molecular characterization, evolution, and epidemiology. Clin Microb Rev. 2018;31(4):e00020-18.
3. Turner N, Sharma-Kuinkel BK, Maskarinec SA, Eichenberger EM, Shah PP, Carugati M, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. Nat Rev Microbiol. 2019;17:203-18.
4. Lee S, Lencastre H, Garau J, Kluytmans J, Malhotra-Kumar S, Peschel A, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Nat Rev Dis Primers. 2018;4:18033.
5. Geisinger E, Isberg RR. Interplay between antibiotic resistance and virulence during disease promoted by multidrug-resistant bacteria. J Infect Dis. 2017;215(S1):S9-S17.
6. Costa T, de Oliveira C, Chambers H, Chatterjee S. BPP4: A New Perspective on *Staphylococcus aureus β -Lactam Resistance. Microb Drug Resist. 2018;6(3):57.*
7. Kateete, DP, Bwanga F, Seni J, Mayanja R, Kigozi E, Mujuni B, et al. CA-MRSA and HA-MRSA coexist in community and hospital settings in Uganda. Antimicrob Res Infect Control. 2019;8:94.
8. Kashyap R, Shah A, Dutt TPMW, Ahdal J, Jain R. Treatments and limitations for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: A review of current literature. J Clin Infect Dis. 2019;9(1):1-10.
9. Khodabandeh M, Mohammadi M, Abdolsalehi MR, Alvandimanesh A, Gholami M, Bibalan MH, et al. Analysis of resistance to macrolide-lincosamide-streptogramin B among *mecA-positive *Staphylococcus aureus* isolates. Osongong Pub Heal Res Pers. 2019;10(1):25-31.*
10. Khosravi AD, Jenabi A, Montazeri EA. Distribution of genes encoding resistance to aminoglycoside modifying enzymes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains. Kaoh Jour Med Scie. 2017;33(12):587-93.
11. Nurjadi D, Olalekan AO, Layer F, Shittu AO, Alabi A, Ghebremedhin B, et al. Emergence of trimethoprim resistance gene *dfg* in *Staphylococcus aureus* causing human infection and colonization in sub-Saharan Africa and its import to Europe. J Antimicrob Chem. 2014;69:2361-68.
12. Razeghi M, Saffarian P, Goudarzi M. Incidence of inducible clindamycin resistance and antibacterial resistance genes variability in clinical *Staphylococcus aureus* strains: A two-year multicenter study in Tehran, Iran. Gen Rep. 2019;16:100411.
13. Khashei R, Malekzadegan Y, Ebrahim-Saraie HS, Razavi Z. Phenotypic and genotypic characterization of macrolide, lincosamide and streptogramin B resistance among clinical isolates of staphylococci in southwest of Iran. BMC Res Notes. 2018;11:711.
14. Thaker M, Spanogiannopoulos P, Wright GD. The tetracycline resistome. Cell Mol Life Sci. 2010;67:419-31.
15. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019. U.S. Department of Health and Human Services. Atlanta: CDC; 2019. 115 p.
16. Mejía C, Zurita J, Guzmán-Blanco M. Epidemiology and surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Latin America. Braz J Infect Dis. 2010;14(S2):S79-S86.
17. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 29th ed. Wayne: PA; 2019. 25 p.
18. Adhikari RP, Shrestha S, Barakoti A, Amatya R. Inducible clindamycin and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in a tertiary care hospital, Kathmandu, Nepal. BMC Infect Dis. 2017;17:483.
19. Sousa VS, Silva, APS, Sorenson L, Paschoal RP, Rabello RF, Campana EL, et al. *Staphylococcus saprophyticus* recovered from humans, food, and recreational waters in Rio de Janeiro, Brazil. Intern J Microb.

- 2017;4287547.
20. Sutcliffe J, Grebe T, Tait-Kamradt A, Wondrack L. Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR. *Antim Agen Chem.* 1996;40(11):2562-66.
 21. Lina G, Quaglia A, Reverdy M, Leclercq R, Vandernes F, Etienne J. Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins among staphylococci. *Antim Agen Chem.* 1999;43(5):1062-66.
 22. Yıldız Ö, Çoban AY, Şener AG, Coşkun SA, Bayramoğlu G, Güdücüoğlu H, et al. Antimicrobial susceptibility and resistance mechanisms of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from 12 Hospitals in Turkey. *Ann Clin Microb Antim.* 2014;13:44.
 23. Warsa UC, Nonoyama M, Ida T, Okamoto R, Okubo T, Shimauchi C, Kuga A, et al. Detection of tet(K) and tet(M) in *Staphylococcus aureus* of Asian Countries by the Polymerase Chain Reaction. *Jour Antib.* 1996;49(11):1127-32.
 24. Lawung R, Chuong LV, Cherdtrakulkiat R, Srisarin A, Prachayasittikul V. Revelation of staphylococcal cassette chromosome *mec* types in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Thailand and Vietnam. *J Microb Meth.* 2014;107:8-12.
 25. Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, et al. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2009;48(1):1-12.
 26. Kaur DC, Chate SS. Study of antibiotic resistance pattern in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* with special reference to newer antibiotic. *Jour Glob Infect Dis.* 2015;7(2):78-84.
 27. van Duin D, Paterson DL. Multidrug-resistant bacteria in the community: Trends and lessons learned. *Infect Dis Clin Nort Amer.* 2016;30(2):377-90.
 28. Oliveira CF, Morey AT, Santos JP, Gomes LVP, Cardoso JD, Pinge-Filho P, et al. Molecular and phenotypic characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from hospitalized patients. *Jour Infect Dev Coun.* 2015;9(7):743-51.
 29. Rossato AM, Reiter KC, Soares RO, Paim TGS, Sambrano GE, D'Azevedo PA. Características moleculares de *Staphylococcus aureus* suscetível à vancomicina poderia ajudar a prever falhas no tratamento devido à reduzida suscetibilidade à vancomicina. *Rev Epid Cont Infect.* 2018;8(4):422-27.
 30. Silveira ACO, Cunha GR, Caierão J, Cordova CM, d'Azevedo PA. MRSA from Santa Catarina State, Southern Brazil: Intriguing epidemiological differences compared to other Brazilian regions. *Braz Jour Infect Dis.* 2015;19(4):384-89.
 31. Bride LL, Pereira MF, Barbosa MC, Silva NC, Klein NM, Nascimento TC, et al. Differences in resistance profiles and virulence genes among methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* of different lineages at a public tertiary hospital. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2019;52:e20190095.
 32. Caboclo RMF, Cavalcante FS, Iorio NLP, Schuenck RP, Olendzki AN, Felix MJ, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Rio de Janeiro hospitals: Dissemination of the USA400/ST1 and USA800/ST5 SCCmec type IV and USA100/ST5 SCCmec type II lineages in a public institution and polyclonal presence in a private one. *Amer Jour Infect Cont.* 2013;41(3):e21-6.
 33. Lee S, Lencastre H, Garau J, Kluytmans J, Malhotra-Kumar S, Peschel A, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Dis Prim.* 2018;4:18033.
 34. Pereira, JNP, Rabelo MA, Lima JLC, Neto AMB, Lopes ACS, Maciel MAV. Phenotypic and molecular characterization of resistance to macrolides, lincosamides and type B streptogramin of clinical isolates of *Staphylococcus* spp. of a university hospital in Recife, Pernambuco, Brazil. *Braz Jour Infect Dis.* 2016;20(3):276-81.
 35. Yao W, Xu G, Li D, Bai B, Wang H, Cheng H, et al. *Staphylococcus aureus* with an erm-mediated constitutive macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance phenotype has reduced susceptibility to the new ketolide, solithromycin. *BMC Infect Dis.* 2019;19:175.
 36. Bottega A, Rodrigues MA, Carvalho FA, Wagner TF, Leal IAS, Santos SO, et al. Evaluation of constitutive and inducible resistance to clindamycin in clinical samples of *Staphylococcus aureus* from a tertiary hospital. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2014;47(5):589-92.
 37. Abdullahi N, Iregbu K. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in a Central Nigeria Tertiary Hospital. *Ann Trop Path.* 2018;9(1):6-10.
 38. Gitau W, Masika M, Musyoki M, Museve B, Mutwiri T. Antimicrobial susceptibility pattern of *Staphylococcus aureus* isolates from clinical specimens at Kenyatta National Hospital. *BMC Res Notes.* 2018;11(1):226.
 39. Kim HJ, Choi Q, Kwon GC, Koo SH. Molecular epidemiology and virulence factors of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from patients with bacteremia. *Jour Clin Lab Anal.* 2019;00:e23077.
 40. Son NT, Huong VTT, Lien VTK, Nga DTQ, Au TTH, Nga TT, et al. First report on multidrug-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in children admitted to tertiary hospitals in Vietnam. *Jour Microb Biot.* 2019;29(9):1460-69.
 41. Peng H, Liu D, Ma Y, Gao W. Comparison of community- and healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates at a Chinese tertiary hospital, 2012-2017. *Scie Rep.* 2018;8:17916.
 42. Sarrou S, Malli E, Tsilipounidaki K, Florou Z, Medvecky M, Skoulakis A, et al. MLSB-resistant *Staphylococcus aureus* in central Greece: Rate of resistance and molecular characterization. *Microb Drug Res.* 2019;25(4):543-50.
 43. Mišić M, Čukić J, Vidanović D, Šekler M, Matić S, Vukašinović M, et al. Prevalence of genotypes that determine resistance of staphylococci to macrolides and lincosamides in Serbia. *Front Pub Heal.* 2017;5:1-8.
 44. Gajdács M. The continuing threat of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antib.* 2019;8(2):52.
 45. Jones TM, Johnson SW, Dimondi VP, Wilson DT. Focus on JNJ-Q2, a novel fluoroquinolone, for the management of community-acquired bacterial pneumonia and acute bacterial skin and skin structure infections. *Infect Drug Res.* 2016;9:119-28.
 46. Zuma AVP, Lima DF, Assef APDAC, Marques EA, Leão RS. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from blood in Rio de Janeiro displaying susceptibility profiles to non-β-lactam antibiotics. *Braz Jour Microb.* 2017;48(2):237-41.
 47. Coelho C, de Lencastre H, Aires-de-Sousa M. Frequent occurrence of trimethoprim-sulfamethoxazole hetero-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in different African countries. *Eur Jour Clin Microb Infect Dis.* 2017;36:1243-52.
 48. Ida T, Okamoto R, Shimauchi C, Okubo T, Kuga A, Inoue M. Identification of aminoglycoside-modifying enzymes by susceptibility testing: Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Japan. *Jour Clin Microb.* 2011;39(9):3115-21.
 49. ElFeky DS, Awad AR, Elshobaky MA, Elawady BA. Effect of ceftaroline, vancomycin, gentamicin, macrolides, and ciprofloxacin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates: An in vitro study. *Surg Infect.* 2020;21(2):150-2.
 50. Loewen K, Schreiber Y, Kirlew M, Bocking N. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Can Fam Phys.* 2017;63(7):512-20.

51. Paternina-dela-Ossa R, Prado SI, Cervi MC, Lima DAFS, Martinez R, Bellissimo-Rodrigues F. Is community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) an emerging pathogen among children in Brazil? *Braz Jour Infec Dis.* 2018;22(5):371-76.
52. Miranda OP, Silva-Carvalho MC, Ribeiro A, Portela F, Cordeiro RP, Caetano N, et al. Emergence in Brazil of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates carrying SCCmec IV that are related genetically to the USA800 clone. *Clin Microb Infec.* 2007;13(12):1165-72.
53. Becker AP, Santos O, Castrucci FM, Dias C, d'Azevedo PA. First report of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Cordobes/Chilean clone involved in nosocomial infections in Brazil. *Epid Infec.* 2012;140(8):1372-75.
54. Gales AC, Sader HS, Ribeiro J, Zoccoli C, Barth A, Pignatari AC. Antimicrobial susceptibility of Gram-positive bacteria isolated in Brazilian hospitals participating in the SENTRY Program (2005-2008). *Braz Jour Infec Dis.* 2009;13(2):90-8.
55. Watkins RR, Holubar M, David MZ. Antimicrobial resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to newer antimicrobial agents. *Antim Ag Chem.* 2019;63(12):e01216-19.
56. Soares MJS, da Silva-Carvalho MC, Ferreira-Carvalho BT, Figueiredo AM. Spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* belonging to the Brazilian epidemic clone in a general hospital and emergence of heterogenous resistance to glycopeptide antibiotics among these isolates. *Jour Hosp Infec.* 2000;44(4):301-8.
57. Hashemizadeh Z, Hadi N, Mohebi S, Kalantar-Neyestanaki D, Bazargani, A. Characterization of SCCmec, spa types and multi drug resistant of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates among inpatients and outpatients in a referral hospital in Shiraz, Iran. *BMC Res Notes.* 2019;12(1):614.
58. ul Bashir Y. SCCmec type IV and V methicillin resistant *Staphylococcus aureus* intrusion in healthcare settings. *Am J Clin Microbiol Antimicrob.* 2019;2(1):1032.
59. Sit, PS, Teh CSJ, Idris N, Ponnampalavanar S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) bacteremia: Correlations between clinical, phenotypic, genotypic characteristics and mortality in a tertiary teaching hospital in Malaysia. *Infect Genet and Evol.* 2018;59:132–41.
60. Kong EF, Johnson JK, Jabra-Rizk MA. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: An enemy amidst us. *PLoS Path.* 2016;12(10):e1005837.

*Vancomycin MIC and agr dysfunction
in invasive MRSA infections in southern
Brazil*

**Adriana Medianeira Rossato, Muriel
Primon-Barros, Cícero Armídio Gomes
Dias & Pedro Alves d'Azevedo**

Brazilian Journal of Microbiology

ISSN 1517-8382

Braz J Microbiol

DOI 10.1007/s42770-020-00384-0



Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Sociedade Brasileira de Microbiologia. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at link.springer.com".



Vancomycin MIC and *agr* dysfunction in invasive MRSA infections in southern Brazil

Adriana Medianeira Rossato¹ · Muriel Primon-Barros¹ · Cícero Armídio Gomes Dias¹ · Pedro Alves d'Azevedo¹

Received: 31 July 2020 / Accepted: 14 October 2020
© Sociedade Brasileira de Microbiologia 2020

Abstract

In methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) treatment, the vancomycin minimum inhibitory concentration (MIC) increase, vancomycin heteroresistance (hVISA) presence, and accessory gene regulator (*agr*) dysfunction are predictors of vancomycin therapy failure. This study evaluated the association between vancomycin MIC (≥ 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and *agr* dysfunction in invasive MRSA isolates. Vancomycin MIC, hVISA phenotype, *agr* group, and function were determined in 171 MRSA isolates obtained between 2014 and 2019 from hospitals in Porto Alegre, Brazil. All MRSA were susceptible to vancomycin; 16.4% of these had MIC ≥ 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Seventeen MRSA isolates expressed the hVISA phenotype; 35.3% of them had MIC of 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. *agr* groups I (40.9%) and II (47.1%) were the most found groups for MRSA and hVISA isolates, respectively. The proportion of MRSA with vancomycin MIC ≥ 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in *agr* group II was significantly higher than in *agr* groups I and III ($p = 0.002$). *agr* dysfunction was observed in 4.7% (8/171) of MRSA, especially those with vancomycin MIC ≥ 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p < 0.001$). In addition, six isolates (35.3%; 6/17) with hVISA phenotype presented *agr* dysfunction, which was significantly higher than that in non-hVISA phenotype ($p < 0.001$). In conclusion, *agr* dysfunction in MRSA is associated with vancomycin MIC ≥ 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and hVISA phenotype, which suggests that *agr* dysfunction might confer potential advantages on MRSA to survive in invasive infections.

Keywords *agr* dysfunction · Invasive MRSA infections · Vancomycin heteroresistance · Vancomycin MIC

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is an important pathogen in the epidemiology of infectious diseases, which causes community- and healthcare-associated MRSA infections with significant morbidity and mortality rates [1]. Vancomycin has been the antimicrobial of choice for MRSA treatment, but in recent years, the emergence of vancomycin resistance has become a challenging public health concern [2]. The Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) classifies *S. aureus* vancomycin susceptibility, according to minimum inhibitory concentration (MIC) values, in vancomycin-susceptible *S. aureus* (VSSA) (MIC

≤ 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$), vancomycin-intermediate *S. aureus* (VISA) (MIC 4–8 $\mu\text{g}/\text{mL}$), and vancomycin-resistant *S. aureus* (VRSA) (MIC ≥ 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$) [3]. In addition, the heterogeneous VISA phenotype (hVISA) represents a subpopulation of cells within a colony with intermediate resistance to vancomycin, while most other cell subpopulations of the colony remain susceptible [4]. The quorum-sensing accessory gene regulator (*agr*) system regulates the expression of several virulence factors and the heterogeneous resistance of MRSA and contributes to the ability of *S. aureus* to cause a wide range of infections [5]. The *agr* locus is present in all staphylococci, with high genetic variability in AgrB, AgrC, and autoinducing thiolactone peptide (AIP), resulting in four *agr* groups (I–IV) among *S. aureus* [6]. *agr* system dysfunctionality results in failure to express the effector molecule RNIII, which plays a critical role in the regulation of multiple virulence genes, affecting the production of virulence factors associated with invasive diseases [7]. The *agr* dysfunction has been associated with the adaptation to vancomycin selection pressure and the hVISA/VISA phenotype [8, 9]. Additionally, the increase in

Responsible Editor: Jorge Luiz Mello Sampaio.

✉ Adriana Medianeira Rossato
adrimfarma@yahoo.com.br

¹ Basic Health Department, Postgraduate Program in Health Sciences of Porto Alegre (PPGCS), Federal University of Health Science of Porto Alegre (UFCSA), Porto Alegre, RS, Brazil

vancomycin MIC (i.e., ≥ 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) has been associated with higher risk of treatment failure and mortality rates [10]. Considering that vancomycin MIC increase, hVISA phenotype, and *agr* dysfunction are factors associated with therapeutic failure in MRSA infections, this study aimed to determine the association between vancomycin MIC (≥ 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and *agr* dysfunction in invasive MRSA infections.

A total of 171 MRSA from invasive infection cases, comprising pneumonia (47.4%; 81/171), bacteremia (38%; 65/171), and osteomyelitis (14.6%; 25/171), were isolated between January 2014 and January 2019 at four hospitals in Porto Alegre, Brazil (Institutional Ethics Committee: 2.770.338). *S. aureus* was identified in these samples by conventional methods, such as colony morphology on sheep blood agar, Gram stain, catalase activity, production of coagulase, and growth on mannitol salt agar. Methicillin resistance was confirmed by cefoxitin disk diffusion and PCR detection of the *mecA* gene [3, 11]. *S. aureus* ATCC[®]25923 and *S. aureus* ATCC[®]43300 were used as *mecA*-negative and *mecA*-positive controls, respectively [3]. Vancomycin MIC was evaluated according to CLSI guidelines [3] using the microdilution method on Mueller-Hinton broth. All MRSA were screened for hVISA in brain heart infusion agar (BHIA) containing 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ vancomycin (BHIA-6 V) according to the CLSI protocol [3]. The control strains *Enterococcus faecalis* ATCC[®]29212 (vancomycin-susceptible) and *Enterococcus faecalis* ATCC[®]51299 (vancomycin-resistant) were included in each analysis [3]. All screenings were performed in triplicate. hVISA was confirmed using population analysis profile/area under the curve (PAP/AUC), using VSSA (ATCC[®]29213), hVISA Mu3 (ATCC[®]700698), and VISA Mu50 (ATCC[®]700699) as control strains, as previously described [12]. The *agr* groups (I–IV) were identified using multiplex-PCR [13]. Positive (*agr* I: *S. aureus* COL; *agr* II: *S. aureus* N315; *agr* III: *S. aureus* ATCC[®]25923; and *agr* IV: *S. aureus* A920210) and negative (PCR mixture components without DNA template) controls were included in the analysis. *Agr* functionality, measured by delta-hemolysin activity, was evaluated by cross-streaking MRSA perpendicularly to RN4220 strains (hyperproducers of beta-hemolysin but not

of alpha- and delta-hemolysin) [14]. An enhanced area of hemolysis at the intersection of MRSA and RN4220 streaks indicated delta-hemolysin activity, resulting from the synergistic effects of delta- and beta-hemolysins and, consequently, a functional *agr* system. In contrast, *agr* dysfunction was defined as the complete absence of delta-hemolysin activity. Statistical analyses were conducted using Chi-square or Fisher's exact test. All $p < 0.05$ were considered to be statistically significant.

The MIC results (Table 1) showed that all MRSA were susceptible to vancomycin with MIC of 0.25–1.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 16.4% (28/171) of these isolates with MIC ≥ 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Takesue et al. [15] revealed that the efficacy of vancomycin in patients with bacteremia by MRSA was significantly lower in the strains that presented MIC of 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in comparison with strains MIC of 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (30.0% vs. 78.8%, $p < 0.001$), whereas a meta-analysis study reported an increase in vancomycin treatment failure and mortality rates for vancomycin-susceptible MRSA, particularly those with MIC ≥ 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, irrespective of the source of infection or method of MIC determination [10]. The PAP/AUC analysis confirmed 9.9% (17/171) of the MRSA expressed the hVISA phenotype, six of which had vancomycin MIC of 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. No VISA phenotype was observed. Chen et al. [16] found that the hVISA phenotype increased in MRSA when vancomycin MIC increased from 1 to 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, agreeing with other studies that suggest a direct relation between hVISA incidence and vancomycin MIC increase [17, 18]. For the *agr* grouping, group I (40.9%) was the most prevalent, followed by groups II (36.3%) and III (22.8%). No sample was identified for *agr* group IV. Other studies also found a higher incidence of *agr* group I among MRSA [19–21]. Most of the samples with the hVISA phenotype belonged to *agr* group II (47.1%; 8/17), followed by *agr* groups I (29.4%; 5/17) and III (23.5%; 4/17). Moreover, the percentage of MRSA with vancomycin MIC ≥ 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in *agr* group II (64.3%; 18/28) was significantly higher than in *agr* groups I and III (35.7%; 10/28) ($p = 0.002$). Park et al. [19] concluded that bloodstream MRSA with vancomycin MIC of 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ were more common in *agr* group II than in other *agr* groups. Other studies have also

Table 1 Distribution of *agr* groups between vancomycin MICs in MRSA isolates

<i>agr</i> group	Vancomycin MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)					Total
	0.25	0.5	0.75	1.0	1.5	
I	31 (48.4%)	17 (37.0%)	16 (48.5%)	5 (22.7%)	1 (16.7%)	70 (40.9%)
II	16 (25.0%)	14 (30.4%)	14 (42.4%)	14 (63.6%)	4 (66.7%)	62 (36.3%)
III	17 (26.6%)	15 (32.6%)	3 (9.1%)	3 (13.6%)	1 (16.7%)	39 (22.8%)
Total	64 (37.4%)	46 (26.9%)	33 (19.3%)	22 (12.9%)	6 (3.5%)	171 (100%)

agr accessory gene regulator, MIC minimum inhibitory concentration, MRSA methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. The data are presented by number of isolates (%)

shown *agr* group II to be more predominant among *S. aureus*, with reduced susceptibility to vancomycin by an intrinsic survival advantage during exposure to glycopeptides [22]. Consequently, *agr* group II is associated with reduced vancomycin susceptibility, higher treatment failure rate, and higher mortality in patients with MRSA bacteremia in critical condition who were treated with vancomycin [20, 23]. Most MRSA with the hVISA phenotype in *agr* group II were associated with reduced vancomycin susceptibility. Based on the delta-hemolysin activity test (Table 2), 4.7% of the MRSA (8/171) presented with *agr* dysfunction. These MRSA were isolated from bacteremia (75%; 6/8), pneumonia (12.5%; 1/8), and osteomyelitis (12.5%; 1/8) at four different hospitals in the years of 2014 (25%; 2/8), 2015 (12.5%; 1/8), 2016 (25%; 2/8), 2017 (25%; 2/8), and 2018 (12.5%; 1/8). The number of *agr* dysfunctional isolates were four, two, and two in *agr* group III (10.2%; 4/39), II (3.2%; 2/62), and I (2.8%; 2/70), respectively. In previous reports, the frequency of *agr* dysfunctional ranged from 3.79 to 13.0% of MRSA, and these isolates were associated with poor healthcare, multidrug resistance, deleterious outcomes, and increased mortality [21, 24]. The prevalence of *agr* dysfunction in healthcare settings is associated with attenuated vancomycin activity in hVISA and VISA strains, which potentially confers an advantage on *S. aureus* for survival in hospital settings [25, 26]. Additionally, a fitness advantage in *agr* dysfunctional isolates was observed, justifying the efficient transmission and persistence at infection sites and, consequently, the chronic course and deleterious outcomes of the disease [21]. The presence of

agr dysfunction in MRSA with vancomycin MIC ≥ 1.0 $\mu\text{g/mL}$ (21.4%; 6/28) was significantly higher than in MRSA with MIC < 1.0 $\mu\text{g/mL}$ (1.4%; 2/143) ($p < 0.001$). Also, six hVISA (35.3%; 6/17) were *agr* dysfunctional, which were significantly higher than isolates without the hVISA phenotype (1.3%; 2/154) ($p < 0.001$). Harigaya et al. [27] reported five times more *agr* dysfunction in hVISA strains than in VSSA strains. The advantages of a dysfunctional *agr* system in hVISA and VISA strains are related to the development of vancomycin resistance and biofilm production, which consequently enhance the survival of these strains [28]. Furthermore, the resistance of hVISA is not related to a specific genetic mechanism but to several mutations in multiple genes, mainly in the genes *vraSR*, *graSR*, *walkR*, and *tcaRAB* [29–31]. The development of the hVISA phenotype in VSSA gradually occurs, which results in mutations that accumulate and affects the reduction of susceptibility to vancomycin [32].

In conclusion, *agr* system dysfunction in MRSA is associated with vancomycin MIC ≥ 1.0 $\mu\text{g/mL}$ and the hVISA phenotype, which suggests that *agr* dysfunction may confer potential advantages on MRSA for survival in invasive infections.

Acknowledgments We thank the Postgraduate Program in Health Sciences of Porto Alegre (PPGCS) of Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSA).

Authors' contributions Adriana Medianeira Rossato—conception and planning of the study; obtaining, analyzing, and interpreting the data; statistical analysis; elaboration and writing of the manuscript; effective participation in research orientation; critical review of the literature and the manuscript; and approval of the final version of the manuscript. Muriel Primon-Barros—elaboration and writing of the manuscript; critical review of the literature and the manuscript; and approval of the final version of the manuscript. Cicero Armídio Gomes Dias—critical review of the manuscript and approval of the final version of the manuscript. Pedro Alves d'Azevedo—conception and planning of the study; effective participation in research orientation; critical review of the literature and the manuscript; and approval of the final version of the manuscript.

Funding This study was funded by Research Foundation of the State of Rio Grande do Sul (FAPERGS - 02/2017 PqG).

Data availability Not applicable.

Compliance with ethical standards

Conflicts of interest/competing interests All authors declare no conflicts of interest.

Ethics approval The study was approved by Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSA) Institutional Ethics under number 2.770.338.

Consent to participate Not applicable.

Consent for publication Not applicable.

Code availability Not applicable.

Table 2 Characteristics of MRSA isolates stratified by *agr* functionality

Characteristics	<i>agr</i> functionality		Total
	Dysfunctional	Functional	
phenotype			
hVISA	6 (35.3%)	11 (64.7%)	17 (9.9%)
Non-hVISA	2 (1.3%)	152 (98.7%)	154 (90.1%)
<i>agr</i> group			
I	2 (2.9%)	68 (97.1%)	70 (40.9%)
II	2 (3.2%)	60 (96.8%)	62 (36.3%)
III	4 (10.3%)	35 (89.7%)	39 (22.8%)
MIC _{van} ($\mu\text{g/mL}$)			
0.25	0	64 (100%)	64 (37.4%)
0.5	1 (2.2%)	45 (97.8%)	46 (26.9%)
0.75	1 (3.0%)	32 (97.0%)	33 (19.3%)
1.0	1 (4.5%)	21 (95.5%)	22 (12.9%)
1.5	5 (83.3%)	1 (16.7%)	6 (3.5%)

agr accessory gene regulator, hVISA heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*, MIC_{van} minimum inhibitory concentration of vancomycin, MRSA methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Data are presented by number of isolates (%)

References

- Lee AS, de Lencastre H, Garau J, Kluytmans J, Malhotra-Kumar S, Peschel A, Harbarth S (2018) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Nat Rev Dis Primers 4:1–23. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.33>
- Ji Y (2020) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), 3rd edn. Humana Press, Saint Paul
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2020) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 3rd edn. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne
- Martirosov DM, Bidell MR, Pai MP et al (2017) Relationship between day 1 and day 2 vancomycin area under the curve values and emergence of heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (hVISA) by Etest® macromethod among patients with MRSA bloodstream infections: a pilot study. BMC Inf Dis 17:1–7. <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2609-0>
- Tan L, Li SR, Jiang B, Hu XM, Li S (2018) Therapeutic targeting of the *Staphylococcus aureus* accessory gene regulator (*agr*) system. Front in Microbiol 9:1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00055>
- Bronesky D, Wu Z, Marzi S et al (2016) *Staphylococcus aureus* RNAIII and its regulon link quorum sensing, stress responses, metabolic adaptation, and regulation of virulence gene expression. Ann Rev Microbiol 70:29–316. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-102215-095708>
- George EA, Muir TW (2007) Molecular mechanisms of *agr* quorum sensing in virulent staphylococci. ChemBioChem 8:847–855. <https://doi.org/10.1002/cbic.200700023>
- Xu J, Pang L, Ma XX, Hu J, Tian Y, Yang YL, Sun DD (2018) Phenotypic and molecular characterisation of *Staphylococcus aureus* with reduced vancomycin susceptibility derived in vitro. Open Medicine 13:475–486. <https://doi.org/10.1515/med-2018-0071>
- Kim T, Kim ES, Park SY, Sung H, Kim MN, Kim SH, Lee SO, Choi SH, Jeong JY, Woo JH, Chong YP, Kim YS (2017) Phenotypic changes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* during vancomycin therapy for persistent bacteraemia and related clinical outcome. Eur J Clin Microbiol 36:1473–1481. <https://doi.org/10.1007/s10096-017-2956-1>
- van Hal SJ, Lodise TP, Paterson DL (2012) The clinical significance of vancomycin minimum inhibitory concentration in *Staphylococcus aureus* infections: a systematic review and meta-analysis. Clin Infect Dis 54:755–771. <https://doi.org/10.1093/cid/cir935>
- Lawung R, Chuong L v, Cherdtrakulkiat R et al (2014) Revelation of staphylococcal cassette chromosome *mec* types in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Thailand and Vietnam. J Microb Meth 107:8–12. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.08.024>
- Rossato AM, Reiter KC, Soares RO et al (2018) Molecular characteristics of vancomycin-susceptible *Staphylococcus aureus* could help to predict treatment failure due to reduced vancomycin susceptibility. Rev Epid Cont de Infec 8:422–427. <https://doi.org/10.17058/reci.v8i4.11393>
- Wu D, Li X, Yang Y, Zheng Y, Wang C, Deng L, Liu L, Li C, Shang Y, Zhao C, Yu S, Shen X (2011) Superantigen gene profiles and presence of exfoliative toxin genes in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from Chinese children. J Med Microbiol 60:35–45. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.023465-0>
- Seidl K, Chen L, Bayer AS, Hady WA, Kreiswirth BN, Xiong YQ (2011) Relationship of *agr* expression and function with virulence and vancomycin treatment outcomes in experimental endocarditis due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 55:5631–5639. <https://doi.org/10.1128/AAC.05251-11>
- Takeue Y, Nakajima K, Takahashi Y, Ichiki K, Wada Y, Tsuchida T, Ishihara M, Uchino M, Ikeuchi H (2011) Clinical characteristics of vancomycin minimum inhibitory concentration of 2 µg/ml methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients with bacteremia. J Inf Chemot 17:52–57. <https://doi.org/10.1007/s10156-010-0086-0>
- Chen H, Liu Y, Sun W, Chen M, Wang H (2011) The incidence of heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* correlated with increase of vancomycin MIC. Diagn Microbiol Infect Dis 71:301–303. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2011.06.010>
- Richter SS, Satola SW, Crispell EK, Heilmann KP, Dohm CL, Riahi F, Costello AJ, Diekema DJ, Doern GV (2011) Detection of *Staphylococcus aureus* isolates with heterogeneous intermediate-level resistance to vancomycin in the United States. J Clin Microbiol 49:4203–4207. <https://doi.org/10.1128/JCM.01152-11>
- Casapao AM, Leonard SN, Davis SL, Lodise TP, Patel N, Goff DA, LaPlante KL, Potoski BA, Rybak MJ (2013) Clinical outcomes in patients with heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* bloodstream infection. Antimicrob Agents Chemother 57:4252–4259. <https://doi.org/10.1128/AAC.00380-13>
- Park MJ, Kim HS, Kim HS, Kim JS, Song W, Kim MY, Lee YK, Kang HJ (2015) Accessory gene regulator polymorphism and vancomycin minimum inhibitory concentration in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Ann Lab Med 35:399–403. <https://doi.org/10.3343/alm.2015.35.4.399>
- Cechinel A, Machado DP, Turra E et al (2016) Association between accessory gene regulator polymorphism and mortality among critically ill patients receiving vancomycin for nosocomial MRSA bacteremia: a cohort study. Canad J Inf Dis Med Microb 2016:1–6. <https://doi.org/10.1155/2016/8163456>
- Abdulgader SM, van Rijswijk A, Whitelaw A, Newton-Foot M (2020) The association between pathogen factors and clinical outcomes in patients with *Staphylococcus aureus* bacteremia in a tertiary hospital, Cape Town. Int J Infect Dis 91:111–118. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2019.11.032>
- de Sanctis JT, Swami A, Sawarynski K, Gerasymchuk L, Powell K, Robinson-Dunn B, Carpenter CF, Sims MD (2011) Is there a clinical association of vancomycin MIC creep, *agr* group II locus, and treatment failure in MRSA bacteremia? Diagn Mol Pathol 20:184–188. <https://doi.org/10.1097/PDM.0b013e318208fc47>
- Cázares-Domínguez V, Cruz-Córdova A, Ochoa SA, Escalona G, Arellano-Galindo J, Rodríguez-Leviz A, Hernández-Castro R, López-Villegas EO, Xicohtencatl-Cortes J (2015) Vancomycin tolerant, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* reveals the effects of vancomycin on cell wall thickening. PLoS One 10:e0118791. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118791>
- Yang X, Dong F, Qian S, Wang L, Liu Y, Yao K, Song W, Zhen J, Zhou W, Xu H, Zheng H (2019) Accessory gene regulator (*agr*) dysfunction was unusual in *Staphylococcus aureus* isolated from Chinese children. BMC Microb 19:1–12. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1465-z>
- Sakoulas G, Moise PA, Rybak MJ (2009) Accessory gene regulator dysfunction: an advantage for *Staphylococcus aureus* in health-care settings? J Inf Dis 199:1558–1559. <https://doi.org/10.1086/598607>
- Cameron DR, Howden BP, Peleg AY (2011) The interface between antibiotic resistance and virulence in *Staphylococcus aureus* and its impact upon clinical outcomes. Clin Infect Dis 53:576–582. <https://doi.org/10.1093/cid/cir473>
- Harigaya Y, Ngo D, Lesse AJ, Huang V, Tsuji BT (2011) Characterization of heterogeneous vancomycin-intermediate resistance, MIC and accessory gene regulator (*agr*) dysfunction among

- clinical bloodstream isolates of *Staphylococcus aureus*. BMC Inf Dis 11:1–7. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-11-287>
28. Gomes DM, Ward KE (2015) Clinical implications of vancomycin heteroresistant and intermediately susceptible *Staphylococcus aureus*. Pharmacotherapy 35:424–432. <https://doi.org/10.1002/phar.1577/abstract>
29. Bakthavatchalam YD, Veeraraghavan B, Peter JV, Rajinikanth J, Inbanathan FY, Devanga Ragupathi NK, Rajamani Sekar SK (2016) Novel observations in 11 heteroresistant vancomycin-intermediate methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from South India. Genome Announc 4(6):e01425–e01416. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01425-16>
30. Bakthavatchalam YD, Babu P, Munusamy E, Dwarakanathan HT, Rupali P, Zervos M, John Victor P, Veeraraghavan B (2019) Genomic insights on heterogeneous resistance to vancomycin and teicoplanin in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a first report from South India. PLoS One 14(12):e0227009. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227009>
31. Silveira ACO, Caierão J, Silva CI, Anzai EK, McCulloch JA, d'Azevedo PA, Sincero TCM (2019) Impact of mutations in hVISA isolates on decreased susceptibility to vancomycin, through population analyses profile - area under curve (PAP-AUC). Diagn Microb Infec Dis 95:114854. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2019.06.006>
32. Mcguinness WA, Malachowa N, Deleo FR (2017) Vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. Yale J Biol Med 90(2):269–281 PMC5482303

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

41 **Abstract**

42

43 Heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (hVISA) is associated with
44 clinical treatment failure. However, the resistance mechanism of hVISA is still not fully defined.
45 It is currently suggested that the hVISA results from the mutation accumulation in genes encoding
46 two-component regulatory systems (TCRS). Therefore, this study aimed to evaluate the expression
47 of *graSR*, *vraSR*, and *walKR* in hVISA clinical isolates submitted sub-MIC of vancomycin. The
48 *graSR*, *vraSR*, and *walKR* transcript levels were significantly upregulated in four, seven, and five
49 hVISA exposed to vancomycin, respectively. In contrast, three hVISA presented *graSR* transcript levels
50 lower than the untreated vancomycin controls, and *vraSR* and *walKR* transcript levels were
51 downregulated in one isolate. In summary, the expression of *graSR/ vraSR/ walKR* was variable in
52 hVISA clinical isolates, which reflects the molecular complexity of the vancomycin heteroresistance
53 phenotype.

54

55 **Keywords:** *Staphylococcus aureus*; vancomycin resistance; two-component regulatory systems.

56

57

58

59

60

61

62

63

64

65

66

67

68

69

70

71

72

73

74

75

76

77

78

79

80

81 1. Introduction

82 Vancomycin, a glycopeptide antibiotic that inhibits cell wall biosynthesis, has been the
83 mainstay of the treatment of severe Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)
84 infections. However, the emergence of MRSA clinical strains with reduced susceptibility to
85 vancomycin makes clinical treatment challenging [1].

86 Since 2002, with the first clinical isolate of fully Vancomycin-Resistant *S. aureus* (VRSA)
87 reported in EUA, homogeneous Vancomycin-Intermediate *S. aureus* (VISA) and heterogeneous
88 Vancomycin-Intermediate *S. aureus* (hVISA) have also been described worldwide [2, 3]. The
89 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) classify *S. aureus* isolates as vancomycin-
90 susceptible *S. aureus* (VSSA) with MIC ≤ 2 $\mu\text{g/mL}$, VISA with MIC of 4–8 $\mu\text{g/mL}$, and VRSA with
91 MIC ≥ 16 $\mu\text{g/mL}$ [4].

92 Heterogeneous VISA (hVISA) possesses a vancomycin MIC in the susceptible range (≤ 2
93 $\mu\text{g/mL}$), but with a subpopulation of cells in the vancomycin-intermediate range (at a frequency of 10^{-5} to
94 10^{-6}) [5, 6]. It has been considered that hVISA is the precursor of the VISA phenotype which has
95 homogeneous resistance to vancomycin, as prolonged exposure to glycopeptide may promote the
96 selection of subpopulation of heteroresistant cells [1, 7]. Higher rates of vancomycin treatment failure
97 are reported in infections caused by VISA and hVISA strains, as well as higher hospitalization stays, risk
98 of persistent infection, and treatment costs [8].

99 The molecular mechanisms of resistance in hVISA and VISA strains are still not
100 completely defined [9]. Currently, it is suggested that VISA is a result of the gradual mutation
101 accumulation of VISA-associated genes, mainly genes encoding two-component regulatory systems
102 (TCRS), such as *graSR*, *vraSR*, *walKR*, and others [7, 10-12]. The development of these
103 phenotypes in VSSA occurs gradually, acquiring mutations that accumulate and play a role in
104 reducing susceptibility to vancomycin [1].

105 *S. aureus* encodes TCRS to sense and respond to environmental changes, such as the
106 presence of antibiotics [13]. TCRS as *graSR*, *vraSR*, and *walKR* have been involved in bacterial growth,
107 antibiotic resistance, cell wall metabolism, and damage, being considered appropriate drug targets to
108 treat bacterial infections [14]. Thus, TCRS regulate the susceptibility of *S. aureus* strains to
109 antimicrobial agents, such as vancomycin, and therefore this study evaluated the expression of
110 *graSR*, *vraSR*, and *walKR* in hVISA clinical isolates submitted sub-MIC of vancomycin.

111

112

113

114

115

116

117

118

119

120

121 2. Materials and Methods

122

123 2.1 Bacterial strains

124 This study used the *S. aureus* strains ATCC®29213 (SA13), ATCC®700698 (Mu3), and
 125 ATCC®700699 (Mu50), considered reference strains of VSSA, hVISA, and VISA phenotypes,
 126 respectively, and ten clinical isolates of hVISA. The relevant characteristics of the bacterial strains are
 127 listed in Table 1.

128

129 2.2 RNA extraction, quantification, and purification

130 Bacterial suspensions of 0.05 optical density in 600 nm (OD₆₀₀) were prepared from overnight
 131 cultures of control strains and clinical isolates. The bacterial cells were grown in brain heart infusion
 132 (BHI) broth to the exponential phase (OD₆₀₀ of 0.5) in the presence of vancomycin, at a concentration
 133 equal to one-half the initial MIC value, or in the absence of vancomycin. Cells were then harvested by
 134 centrifugation, and the bacterial pellet was subjected to RNA extraction. Total RNA was extracted using
 135 TRIzol® reagent (Invitrogen, Paisley, UK) following the manufacturer's instructions. To remove the
 136 remaining DNA from the RNA extractions, all of the RNA samples were treated with RQ1 RNase-
 137 Free DNase (Promega, Madison, UK) according to the manufacturer's specifications. The RNA was
 138 quantified using a BioSpec-nano spectrophotometer (Shimadzu, Tokyo, Japan), and purity was
 139 evaluated through the absorbance ratio A₂₆₀/A₂₈₀ of 1.8 a 2.0.

140

141 2.3 Retrotranscription and quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR)

142 cDNA was synthesized from hundred nanograms of total RNA using the GoScript™
 143 Reverse Transcriptase kit (Promega, Madison, UK) according to the manufacturer's
 144 instructions. The primers of transcriptional analysis were designed using Primer3 software, with the
 145 following sequences (5'-3'): *hu*-F AGCTTTGAATGCTGGAACCTTAC and *hu*-R
 146 TATTCGAATCAATCCAAAACCTCA for *hu* gene (161 bp); *graSR*-F
 147 GATTCGGCAAAGTAATGGATA and *graSR*-R AATCATCTGCGCCAAGTTC for *graSR* (195 bp);
 148 *walKR*-F AAACAACACTACAATCCCTTCATACTAA and *walKR*-R
 149 CTTGACGGTTGGCATACTCACTTAA for *walKR* (187 bp); *vraSR*-F
 150 TGCTTACAGAACGAGAAATGGAAA and *vraSR*-R CGTTTTAATAGTAATATGCGATGCA
 151 for *vraSR* (94 bp). Primers specificity was evaluated with the genome of *S. aureus* Mu3 (GenBank
 152 accession no. AP002394.1) through the BLAST® software. Reaction mixtures comprised 7.5 µL GoTaq®
 153 qPCR Master Mix (Promega, Madison, USA), 0.3 µL each of forward and reverse primers (10 µM), 3 µL
 154 cDNA sample, and 3.9 µL nuclease-free water for a total of 15 µL. qPCRs were carried out on a 7500
 155 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Carlsbad, USA) with the following cycle parameters:
 156 holding stage of 95 °C for 2 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 15 s, 60 °C for 60 s, 72 °C for 30 s,
 157 with a melting curve determination. Negative controls, without cDNA, were included in each run. All
 158 qPCR was performed in biological triplicate and technical replicate for each of the cDNA samples.
 159 PCR efficiency was evaluated for each primer and the amplification efficiency (E) was calculated from
 160 the slope of the standard curve using the formula $E = 10^{-1/\text{slope}}$, with values between 1.93 and 1.98. Fold

161 changes in the expression levels of the *graSR*, *walKR*, and *vraSR* genes were normalized in relation to the
162 levels of *hu* mRNA. The *hu* gene was used as a normalizer, as previously published [15]. The relative
163 expression ratios were calculated by the Pfaffl method [16]: Gene expression ratio = $(E_{\text{target}})^{\Delta\text{Ct target (control$
164 $- \text{sample})} / (E_{\text{reference}})^{\Delta\text{Ct reference (control - sample)}}$, where E_{target} is the amplification efficiency of target (*graSR*,
165 *walKR* and *vraSR*), $E_{\text{reference}}$ is the amplification efficiency of reference (*hu*), Ct is the point at
166 which the fluorescence rises above the background fluorescence, $\Delta\text{Ct target}$ is the Ct deviation of
167 the control minus the sample of the target gene transcript, and $\Delta\text{Ct reference}$ is the Ct deviation of the
168 control minus the sample of the reference gene transcript.

169

170 2.4 Statistical Analysis

171 Statistical analysis was performed using SPSS version 20.0 software (SPSS, Chicago, IL, USA).
172 The variables were described by the mean and standard deviation and compared by the Student's t-test. A
173 $p \leq 0.05$ value was considered statistically significant.

174

175

176

177

178

179

180

181

182

183

184

185

186

187

188

189

190

191

192

193

194

195

196

197

198

199

200 3. Results

201 The expression of the *graSR*, *vraSR*, and *walKR*, which are known to affect glycopeptide
202 susceptibility, were evaluated in ten hVISA strains in the absence and presence of vancomycin (control
203 and treated, respectively). The results of the gene transcription are presented in Fig.1 and Table 2.

204 The *graSR* transcript levels were significantly upregulated in four hVISA exposed to
205 vancomycin (131SA, 199SA, 203SA, and 212SA). In contrast, three isolates (9SA, 68SA, and 185SA)
206 presented *graSR* transcript levels lower than the untreated vancomycin controls.

207 The transcript levels of *vraSR* were upregulated in seven hVISA strains (9SA, 41SA,
208 131SA, 185SA, 199SA, 203SA, and 212SA). However, the *vraSR* transcript levels were
209 downregulated in the 27SA isolate when exposed to vancomycin.

210 Significant alterations in the levels to *walKR* transcript analysis were observed in
211 upregulations in five hVISA strains (27SA, 54SA, 185SA, 199SA, and 203SA) exposed to sub-MIC of
212 vancomycin, whereas *walKR* was downregulated in the 68SA isolate.

213 The 199SA and 203SA hVISA presented the relative gene expression upregulated 4.59 and
214 4.90 fold changed to the *graSR* gene, 4.12 and 5.96 to *vraSR*, and 5.18 and 4.56 to *walKR*, respectively.
215 In contrast, the isolate 68SA stood out by presenting a significant downregulation of 0.45 fold changed to
216 *graSR* and 0.43 to *walKR*.

217

218

219

220

221

222

223

224

225

226

227

228

229

230

231

232

233

234

235

236

237

238

239

240 4. Discussion

241 The use of vancomycin as the drug of choice for the treatment of infections caused by
242 multidrug-resistant MRSA has led to selection of isolates with reduced susceptibility to
243 vancomycin [17, 18]. hVISA and VISA resistance mechanism consists in the increase of cell wall
244 thickness and the number of D-ala-D-ala residues that result in the trapping of vancomycin molecules,
245 without affecting the cell viability [7]. Studies have shown that gene expression and mutation in
246 regulatory genes, as *graSR*, *vraSR*, and *walKR*, are essential for these resistance mechanisms [19]. In
247 this study, we used ten hVISA clinical isolates and analyzed the expression of the *graSR*, *vraSR*, and
248 *walKR* genes exposed to the respective sub-MIC vancomycin concentrations.

249 The overexpression of genes associated with TCRS *graSR* is related to VISA emergence, as for
250 example, the *dlt* and *mprF* genes, which alter the negative potential on the cell wall surface, thus
251 decreasing the binding capacity of positively-charged antibiotics by modifying teichoic acid and the
252 phosphatidylglycerol components [1], and the *vraFG* ATP transporter-associated genes that increase
253 the efflux transport mechanisms, removing antimicrobials from the cytoplasm out of the bacterial cell
254 [19]. Our study on *graSR*, in contrast with the results published by CAFISO et al. [2] and based on
255 statistically significant data, found upregulation of *graSR* in hVISA in the presence and absence of
256 vancomycin. CAFISO et al. [2] did not observe significant differences in the expression of *graSR*
257 under antimicrobial free conditions; nor did the addition of vancomycin to the growth medium change the
258 transcriptional pattern of hVISA. In our study, four hVISA when exposed to subinhibitory concentrations
259 of vancomycin were significantly upregulated, demonstrating the possible modulation of the
260 resistance exerted by the antimicrobial.

261 Additionally, the TCRS *vraSR* compose the *vra* operon (*vraU*, *vraT*, *vraS*, and *vraR*),
262 frequently mutated in hVISA and VISA clinical strains [20]. The TCRS *vraSR* regulates the
263 synthesis of PBP2, SgtB, and MurZ that are key proteins involved in the synthesis of the cell wall of *S.*
264 *aureus* and the mutation in *vraS* (sensor kinase gene) or *vraR* (response regulator gene) results in
265 constitutive activation and overexpression *vraSR* [7, 19]. In contrast, it was demonstrated that the
266 *vraSR* deletion enhanced the vancomycin susceptibility [21]. Consistent with these observations, we
267 observed *vraSR* upregulated in seven hVISA after vancomycin treatment, and downregulated in one.
268 Overexpression of *vraSR* activates the expression of a cluster of genes called the cell-wall stimulon,
269 which positively regulates synthesis of the cell wall, causing it to thicken and thus increasing the
270 resistance to vancomycin [22]. Based on these results, when *S. aureus* is stimulated by cell wall synthesis
271 inhibitors, such as vancomycin, the cell wall synthesis process is positively regulated through
272 upregulation of the *vraSR*, thereby reducing the susceptibility to the antibiotics that inhibit cell wall
273 synthesis [19].

274 The *walKR* (*walK*–sensor histidine kinase and *walR*–response regulator) is the essential
275 TCRS, acting as the master controller in the regulation of cell wall synthesis and other types of
276 physiological metabolism, such as peptidoglycan metabolism, fatty acid biosynthesis, and the activity of
277 major autolysins genes *atl* and *lytM*, which are important for cell wall renewal [19, 23, 24].
278 Moreover, in hVISA and VISA strains, a mutation identified in *walK* gene reduced the autolysis as well
279 as, increasing vancomycin resistance [7]. A significant upregulation was found in five hVISA

280 strains, while in contrast, the 68SA isolate presented downregulation. HOWDEN et al. [25] analyzed
281 the sequence of the *walKR* of hVISA/VISA strains and observed a high frequency of mutations. These
282 results suggest that mutations within the *walKR* gene serve an important role in the generation of VISA
283 and hVISA strains. In the CAFISO et al. [2] study, the *walKR* gene had a significant reduction in its
284 expression when exposed to subinhibitory concentrations of vancomycin, demonstrating that the
285 reduction in autolytic activity may be linked to the low expression of the gene. In vancomycin therapy
286 for MRSA infections, changes in expression of the *walKR*, and/or amino acid exchanges in *walK/ walR*
287 have often been reported to convert VSSA to hVISA/VISA [26].

288 The hVISA isolates 199SA and 203SA presented the relative gene expression upregulated to all
289 TCRS tested (*graSR*, *vraSR*, and *walKR*), and the 68SA isolate exhibited downregulation to *graSR* and
290 *walKR* TCRS. In summary, expressions of *graSR/ vraSR/ walKR* were variable in hVISA
291 clinical isolates, which reflects the molecular complexity of the vancomycin heteroresistance phenotype.

292

293

294

295

296

297

298

299

300

301

302

303

304

305

306

307

308

309

310

311

312

313

314

315

316

317

318

319

320 **5. Conflict of interest**

321 No conflict of interest reported.

322

323

324

325

326

327

328

329

330

331

332

333

334

335

336

337

338

339

340

341

342

343

344

345

346

347

348

349

350

351

352

353

354

355

356

357

358

359

360 6. Acknowledgements

361 We thank the Postgraduate Program in Health Sciences of Porto Alegre (PPGCS) of Federal
362 University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA).

363

364

365

366

367

368

369

370

371

372

373

374

375

376

377

378

379

380

381

382

383

384

385

386

387

388

389

390

391

392

393

394

395

396

397

398

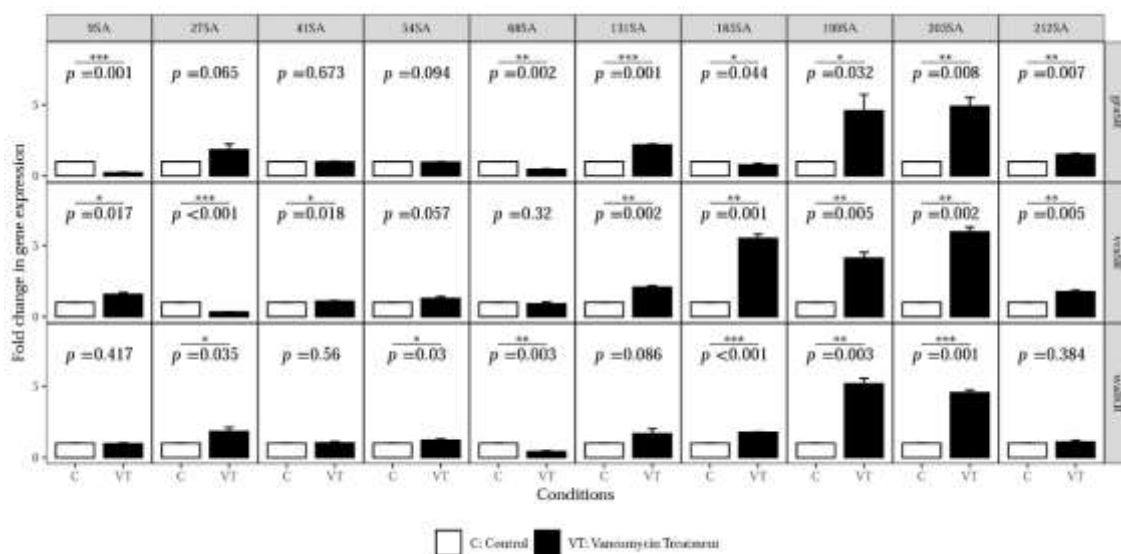
399

400 7. References

- 401 [1] Mcguinness WA, Malachowa N, Deleo FR. Vancomycin Resistance in *Staphylococcus aureus*. vol. 90.
402 2017.
- 403 [2] Cafiso V, Bertuccio T, Spina D, Purrello S, Campanile F, di Pietro C, et al. Modulating activity of
404 vancomycin and daptomycin on the expression of autolysis cell-wall turnover and membrane charge
405 genes in hVISA and VISA strains. PLoS ONE 2012; 7.
406 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029573>.
- 407 [3] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin--
408 United States, 2002. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2002; 51: 265–7.
- 409 [4] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial
410 susceptibility testing. 30th ed. 2020.
- 411 [5] Martirosov DM, Bidell MR, Pai MP, Scheetz MH, Rosenkranz SL, Faragon C, et al. Relationship
412 between day 1 and day 2 Vancomycin area under the curve values and emergence of heterogeneous
413 Vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (hVISA) by Etest® macromethod among patients with
414 MRSA bloodstream infections: A pilot study. BMC Infectious Diseases 2017; 17.
415 <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2609-0>.
- 416 [6] Koh YR, Kim KH, Chang CL, Yi J. Prevalence and clinical impact of heterogeneous vancomycin-
417 intermediate *Staphylococcus aureus* isolated from hospitalized patients. Annals of Laboratory
418 Medicine 2016; 36: 235–43. <https://doi.org/10.3343/alm.2016.36.3.235>.
- 419 [7] Devi Y, Punithavathy P, Thomas S, Veeraraghavan B. Challenges in the Laboratory Diagnosis and
420 Clinical Management of Heteroresistant Vancomycin *Staphylococcus aureus* (hVISA). Clinical
421 Microbiology: Open Access 2015; 04. <https://doi.org/10.4172/2327-5073.1000214>.
- 422 [8] Shariati A, Dadashi M, Moghadam MT, van Belkum A, Yaslianifard S, Darban-Sarokhalil D.
423 Global prevalence and distribution of vancomycin resistant, vancomycin intermediate and
424 heterogeneously vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* clinical isolates: a systematic
425 review and meta-analysis. Scientific Reports 2020; 10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69058-z>.
- 426 [9] Cong Y, Yang S, Rao X. Vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* infections: A review of
427 case updating and clinical features. Journal of Advanced Research 2020; 21: 169–76.
428 <https://doi.org/10.1016/j.jare.2019.10.005>.
- 429 [10] Hu Q, Peng H, Rao X. Molecular events for promotion of vancomycin resistance in vancomycin
430 intermediate *Staphylococcus aureus*. Frontiers in Microbiology 2016; 7.
431 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01601>.
- 432 [11] Hiramatsu K, Katayama Y, Matsuo M, Sasaki T, Morimoto Y, Sekiguchi A, et al. Multi-drug-
433 resistant *Staphylococcus aureus* and future chemotherapy. Journal of Infection and Chemotherapy
434 2014; 20: 593–601. <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2014.08.001>.
- 435 [12] Gardete S, Tomasz A. Mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. Journal
436 of Clinical Investigation 2014; 124: 2836–40. <https://doi.org/10.1172/JCI68834>.
- 437 [13] Villanueva M, García B, Valle J, Rapún B, Ruiz De Los Mozos I, Solano C, et al. Sensory
438 deprivation in *Staphylococcus aureus*. Nature Communications 2018; 9.
439 <https://doi.org/10.1038/s41467-018-02949-y>.

- 440 [14] Rapun-Araiz B, Haag AF, de Cesare V, Gil C, Dorado-Morales P, Penades JR, et al. Systematic
441 Reconstruction of the Complete Two-Component Sensorial Network in *Staphylococcus aureus*.
442 MSystems 2020; 5. <https://doi.org/10.1128/msystems.00511-20>.
- 443 [15] Valihrach L, Demnerova K. Impact of normalization method on experimental outcome using RT-
444 qPCR in *Staphylococcus aureus*. Journal of Microbiological Methods 2012; 90: 214–6.
445 <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.05.008>.
- 446 [16] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic
447 Acids Research 2001; 29: 2003–7.
- 448 [17] Rossato AM, Primon-Barros M, Dias CAG, d’Azevedo PA. Vancomycin MIC and *agr* dysfunction
449 in invasive MRSA infections in southern Brazil. Brazilian Journal of Microbiology 2020; 51: 1819–23.
450 <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00384-0>.
- 451 [18] Zhang S, Sun X, Chang W, Dai Y, Ma X. Systematic review and meta-analysis of the epidemiology
452 of vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* isolates.
453 PLoS ONE 2015; 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136082>.
- 454 [19] Wu S, Lin K, Liu Y, Zhang H, Lei L. Two-component signaling pathways modulate drug
455 resistance of *Staphylococcus aureus* (Review). Biomedical Reports 2020; 13: 1–5.
456 <https://doi.org/10.3892/br.2020.1312>.
- 457 [20] Boyle-Vavra S, Yin S, Jo DS, Montgomery CP, Daum RS. *VraT/YvqF* is required for methicillin
458 resistance and activation of the *VraSR* regulon in *Staphylococcus aureus*. Antimicrobial Agents and
459 Chemotherapy 2013; 57: 83–95. <https://doi.org/10.1128/AAC.01651-12>.
- 460 [21] Tajbakhsh G, Golemi-Kotra D. The dimerization interface in *VraR* is essential induction of the cell
461 wall stress response in *Staphylococcus aureus*: A potential druggable target. BMC Microbiology 2019;
462 19. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1529-0>.
- 463 [22] Doddangoudar VC, Boost M v., Tsang DNC, O’Donoghue MM. Tracking changes in the *vraSR* and
464 *graSR* two component regulatory systems during the development and loss of vancomycin non-
465 susceptibility in a clinical isolate. Clinical Microbiology and Infection 2011; 17: 1268–72.
466 <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03463.x>.
- 467 [23] Cameron DR, Jiang JH, Kostoulias X, Foxwell DJ, Peleg AY. Vancomycin
468 susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* is mediated by *YycHI* activation of the
469 *WalRK* essential two-component regulatory system. Scientific Reports 2016; 6.
470 <https://doi.org/10.1038/srep30823>.
- 471 [24] Ma Z, Lasek-Nesselquist E, Lu J, Schneider R, Shah R, Oliva G, et al. Characterization of genetic
472 changes associated with daptomycin nonsusceptibility in *Staphylococcus aureus*. PLoS ONE 2018;
473 13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198366>.
- 474 [25] Howden BP, McEvoy CRE, Allen DL, Chua K, Gao W, Harrison PF, et al. Evolution of multidrug
475 resistance during *staphylococcus aureus* infection involves mutation of the essential two component
476 regulator *WalKR*. PLoS Pathogens 2011; 7. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002359>.
- 477 [26] Gajdiss M, Monk IR, Bertsche U, Kienemund J, Funk T, Dietrich A, et al. *YYCH* and *YYCI* regulate
478 expression of *Staphylococcus aureus* autolysins by activation of *walKR* phosphorylation.
479 Microorganisms 2020; 8:1–16. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060870>.

480 **Fig. 1.** Gene expression analysis previously linked with reduced susceptibility to vancomycin.



481

482 9SA, 27SA, 41SA, 54SA, 68SA, 131SA, 185SA, 199SA, 203SA, and 212SA means the
 483 identification of ten hVISA clinical isolates. White bars (C) are the control, the condition in which the
 484 isolate was not exposed to vancomycin. Black bars (VT) are the vancomycin treatment, the
 485 condition in which the isolate was exposed to vancomycin. Values represent the mean of results obtained
 486 for three replicates independently grown cultures for each isolate. Error bars indicate the standard
 487 deviation of comparisons between three replicates. *P* value was determined by paired t-test and $p \leq 0.05$
 488 was considered significant. * $p \leq 0.05$. ** $p \leq 0.01$. *** $p \leq 0.001$.

489

490

491

492

493

494

495

496

497

498

499

500

501

502

503

504

505

506

507

508

509 **Table 1.** Control stains and clinical isolates included in the study.

Strain	Specimen	Phenotype	MIC _{VAN} / sub-MIC _{VAN} (µg/mL)	SCC _{mec} / agr type
SA13	Wound	MSSA/VSSA	1.0/ 0.5	-/ II
Mu3	Sputum	MRSA/ hVISA	1.0/ 0.5	II/ II
Mu50	Surgical wound	MRSA/ VISA	4.0/ 2.0	II/ II
9SA	Sputum	MRSA/ hVISA	1.0/ 0.5	III/ I
27SA	Blood	MRSA/ hVISA	1.5/ 0.75	I/ II
41SA	Blood	MRSA/ hVISA	1.5/ 0.75	I/ II
54SA	Sputum	MRSA/ hVISA	1.5/ 0.75	III/ I
68SA	Blood	MRSA/ hVISA	1.0/ 0.5	I/ II
131SA	Blood	MRSA/ hVISA	1.0/ 0.5	IV/ III
185SA	Blood	MRSA/ hVISA	1.5/ 0.75	I/ II
199SA	Blood	MRSA/ hVISA	1.5/ 0.75	I/ II
203SA	Sputum	MRSA/ hVISA	1.0/ 0.5	III/ I
212SA	Blood	MRSA/ hVISA	1.5/ 0.75	IV/ III

510 *agr*: accessory gene regulator; hVISA: heterogeneous vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus*;
511 MIC_{VAN}: minimum inhibitory concentration of vancomycin; MRSA: methicillin-resistant *Staphylococcus*
512 *aureus*; MSSA: methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*; Mu3: *Staphylococcus aureus*
513 ATCC[®]700698; Mu50: *Staphylococcus aureus* ATCC[®]700699; SA: *Staphylococcus aureus*; SA13:
514 *Staphylococcus aureus* ATCC[®]29213; SCC_{mec}: Staphylococcal cassette chromosome *mec*; VISA:
515 vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*; VRSA: vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*;
516 VSSA: vancomycin-susceptible *Staphylococcus aureus*.

517

518

519

520

521

522

523

524

525

526

527

528

529

530

531

532

533

534

535 **Table 2.** Expression of *graSR*, *vraSR*, and *walKR* genes in hVISA exposed to vancomycin.

Isolate ^a	Relative gene expression ^c					
	<i>graSR</i>	<i>p</i> -value ^d	<i>vraSR</i>	<i>p</i> -value	<i>walKR</i>	<i>p</i> -value
9SA (C/VT) ^b	0.23	0.001 ^f	1.57	0.017 ^e	0.97	0.417
27SA (C/VT)	1.84	0.065	0.32	0.000 ^f	1.84	0.035 ^e
41SA (C/VT)	0.99	0.673	1.10	0.019 ^e	1.03	0.560
54SA (C/VT)	0.97	0.094	1.29	0.057	1.23	0.030 ^e
68SA (C/VT)	0.45	0.002 ^f	0.92	0.320	0.43	0.003 ^f
131SA (C/VT)	2.19	0.001 ^e	2.08	0.002 ^e	1.67	0.086
185SA (C/VT)	0.79	0.044 ^e	5.50	0.001 ^e	1.77	0.000 ^e
199SA (C/VT)	4.59	0.032 ^e	4.12	0.005 ^e	5.18	0.003 ^e
203SA (C/VT)	4.90	0.008 ^e	5.96	0.002 ^e	4.56	0.001 ^e
212SA (C/VT)	1.52	0.007 ^e	1.76	0.005 ^e	1.09	0.384

536 ^a 9SA, 27SA, 41SA, 54SA, 68SA, 131SA, 185SA, 199SA, 203SA, and 212SA mean the
537 identification of ten hVISA clinical isolates.

538 ^b C means control, the condition in which the isolate was not exposed to vancomycin. VT means
539 vancomycin treatment, the condition in which the isolate was exposed to vancomycin.

540 ^c The value of the relative gene expression was the average of three independent experiments. The result
541 represents the gene expression in the isolate when exposed to vancomycin.

542 ^d The data were analyzed using paired t-test and *p* values were determined. *P* values of < 0.05 were
543 considered significant.

544 ^e The treatment showed gene expression significantly higher than the control.

545 ^f The treatment showed gene expression significantly less than the control.

546

547

548

549

550

551

552

553

554

555

556

557

558

559

560

561

562

563

564