

**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 e com reduzida
susceptibilidade à vancomicina isolados
em Porto Alegre, RS, Brasil.**

UFCSPA

**Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre**

Porto Alegre

2017

Adriana Medianeira Rossato

**Análise molecular de *Staphylococcus aureus*
resistente à meticilina e com reduzida
susceptibilidade à vancomicina isolados
em Porto Alegre, RS, Brasil.**

Dissertação 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 Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Dr. Pedro Alves d'Azevedo

Co-orientadora: Dra. Keli Cristine Reiter

Porto Alegre

2017

Catálogo na Publicação

Rossato, Adriana Medianeira

Análise molecular de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina e com reduzida susceptibilidade à vancomicina isolados em Porto Alegre, RS, Brasil. / Adriana Medianeira Rossato. -- 2017.

77 p. : il., graf., tab. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2017.

Orientador(a): Pedro Alves d' Azevedo ;
coorientador(a): Keli Cristine Reiter.

1. agr. 2. Genes de virulência. 3. hVISA. 4. SCCmec.
5. VT-MRSA. I. Título.

Agradecimentos

Ao meu orientador Professor Dr. Pedro Alves d' Azevedo, por todo conhecimento compartilhado, pelas oportunidades proporcionadas, pela dedicação e entendimento dispensado.

A minha co-orientadora Dra. Keli Cristine Reiter, por sua imensa ajuda e presença incontestável na execução deste trabalho e, acima de tudo, pelas sábias ideias e competências demonstradas.

Ao meu “trio fantástico” Renata Soares, Thiago Paim e Gustavo Sambrano, pelo companheirismo, discussões proporcionadas, sugestões concedidas, aprendizado e incentivo à pesquisa.

A todos os colegas do Laboratório de Microbiologia da UFCSPA, pela cooperação e incentivo ininterrupto. Em especial a Cezar Riche, Mariana Mott e Rebeca Inhoque.

A todos os estagiários do Laboratório de Microbiologia da UFCSPA, em especial a Nathalia Martins e Neidimar Tolfo que de alguma forma contribuíram na realização desse trabalho.

Aos meus pais, Aldo e Eva, e a minha irmã Andrea por serem os responsáveis pela concretização desse sonho, por sempre me incentivar na busca do conhecimento e principalmente pela constante confiança em mim depositada.

Ao meu namorado, Adenir, por acreditar no meu potencial, valorizar minha dedicação constante nos estudos e, principalmente por estar sempre me apoiando e aconselhando, mesmo que distante.

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

RESUMO

Staphylococcus aureus resistente à meticilina (MRSA) é uma das causas mais frequentes de infecções relacionadas à assistência à saúde e comunitárias, e com seu avanço, a vancomicina tornou-se a principal opção terapêutica. Entretanto, o seu uso indiscriminado favoreceu o surgimento de MRSA tolerante (VT-MRSA) e com reduzida susceptibilidade à vancomicina (hVISA e VISA), comumente associados com falhas no tratamento, bacteremia persistente, hospitalização prolongada e desfechos clínicos adversos. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi analisar as características moleculares de isolados clínicos de MRSA com e sem susceptibilidade reduzida à vancomicina. Este estudo observacional transversal foi realizado com 177 MRSA isolados entre 2012 e 2014 de hospitais em Porto Alegre, RS, Brasil. Para todos os isolados foi determinado o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos, a concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM). A triagem para hVISA foi conduzida em ágar BHI contendo 3 e 6 µg/mL de vancomicina (BHIA-3V e BHIA-6V), e a confirmação do fenótipo foi determinada através da Análise do Perfil Populacional - Área Abaixo da Curva (PAP-AUC). A detecção dos genes de virulência e a tipagem molecular do *SCCmec* e *agr* foi realizada por PCR convencional e PCR multiplex, respectivamente. Dos 177 MRSA, 13,6% foram tolerantes e 5,1% heterorresistentes à vancomicina, sendo significativa a presença de hVISA entre os VT-MRSA ($p < 0,001$). Baixos níveis de resistência foram observados para tetraciclina (22,0%), sulfametoxazol-trimetoprima (27,1%) e rifampicina (31,1%). Porém, em isolados de hVISA estes antimicrobianos demonstraram pior desempenho do que em não-hVISA. Os genes de virulência mais frequentes nos isolados foram *hld* (90,4%) e *hla* (87,6%). Entre os VT-MRSA, a presença do *SCCmec* II foi significativamente maior do que em MRSA ($p = 0,025$), enquanto o *SCCmec* III foi predominante entre os MRSA e hVISA. O polimorfismo do *agr* predominante entre os MRSA, VT-MRSA e hVISA foi do tipo II, sendo significativa a presença deste em VT-MRSA ($p = 0,032$) e hVISA ($p = 0,046$). Isolados com *agr* II e *SCCmec* II ou III, que são susceptíveis à vancomicina por testes convencionais, poderiam estar associados a falhas no tratamento com vancomicina, talvez porque apresentam reduzida susceptibilidade à vancomicina, não detectada rotineiramente. Nesse contexto, estudos como este são essenciais para a tomada de decisão clínica na escolha do antimicrobiano adequado para o tratamento das infecções causadas por esses microrganismos multirresistentes.

PALAVRAS-CHAVE: *agr*; Genes de virulência; hVISA; MRSA; *SCCmec*; VT-MRSA.

ABSTRACT

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is one of the most frequent causes of healthcare-associated and community-acquired infections and with its advancement, vancomycin became the main therapeutic option. However, its indiscriminate use favored the emergence of tolerant MRSA (VT-MRSA) and with reduced susceptibility to vancomycin (hVISA and VISA), commonly associated with vancomycin treatment failure, persistent bacteremia, prolonged hospitalization and adverse clinical outcome. Therefore, the aim of this work was to analyze the molecular characteristics of clinical isolates of MRSA with and without reduced vancomycin susceptibility. This cross-sectional observational study was conducted with 177 strains of MRSA isolated between 2012 and 2014 from hospitals in Porto Alegre, RS, Brazil. For all isolates it was determined the antimicrobial susceptibility profile, the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC). The screening for hVISA was conducted in BHI agar containing 3 µg/mL and 6 µg/mL of vancomycin (BHIA-3V and BHIA-6V) and the phenotype confirmation was determined through Population Analysis Profile-Area Under the Curve (PAP-AUC). The detection of the virulence genes and molecular typing of *SCCmec* e *agr* were performed by conventional PCR and multiplex PCR, respectively. Among the 117 MRSA isolates, 13.6% were tolerant and 5.1% were vancomycin heteroresistant and the presence of hVISA was significant among the VT-MRSA ($p < 0.001$). Low levels of resistance were observed to tetracycline (22.0%), trimethoprim-sulfamethoxazole (27.1%) and rifampicin (31.1%). However, in hVISA isolates these antimicrobials demonstrated worst performance than in non-hVISA. The most frequent virulence genes in the isolates were *hld* (90.4%) and *hla* (87.6%). Among VT-MRSA, *SCCmec* II presence was significantly higher than in MRSA ($p = 0.025$), while the *SCCmec* III was predominant among MRSA and hVISA. The predominant *agr* polymorphism among MRSA, VT-MRSA and hVISA was type II, being its presence significant in MRSA ($p = 0.032$) and hVISA ($p = 0.046$). Isolates with *agr* II and *SCCmec* types II or III, that are susceptible to vancomycin in conventional tests, could be associated with treatment failures by vancomycin, maybe because they present reduced vancomycin susceptibility not routinely detected. In this context, studies like this one are essential to clinical decisions in the choice of the appropriate antimicrobial for the treatment of infections caused by these multiresistant microorganisms.

Keywords: *agr*; Virulence genes; hVISA; MRSA; *SCCmec*; VT-MRSA.

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>
<i>attB_{scc}</i>	<i>SCC_{mec} attachment site</i>
BHIA-3V	Ágar BHI contendo 3 µg/mL de Vancomicina
BHIA-6V	Ágar BHI contendo 6 µg/mL de Vancomicina
BSI	<i>Bloodstream Infections</i>
CA	<i>Community- Acquired</i>
CA-MRSA	<i>Community-Acquired Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus</i>
<i>ccr</i>	<i>cassette chromosome recombinases</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
Cna	<i>Collagen-binding protein</i>
CfIA	<i>Clumping factor proteins A</i>
CfIB	<i>Clumping factor proteins B</i>
ETs	<i>Staphylococcal Exfoliative Toxins</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FnbpA	<i>Fibronectin-binding protein A</i>
FnbpB	<i>Fibronectin-binding protein B</i>
GRD	<i>Glycopeptide Resistance Detection</i>
HAI	<i>Healthcare Associated Infection</i>

HACO	<i>Healthcare-Associated Community-Onset</i>
HA-MRSA	<i>Healthcare-Associated Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus</i>
HO	<i>Hospital-Onset</i>
hVISA	<i>heterogeneous Vancomycin Intermediate Staphylococcus aureus</i>
INICC	<i>International Nosocomial Infection Control Consortium</i>
ID	<i>Direct Repeats</i>
IR	<i>Inverted Repeats</i>
Região J	<i>Região Junkyard</i>
LA-MRSA	<i>Livestock-Associated Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus</i>
MGE	<i>Mobile Genetic Element</i>
MSSA	<i>Methicillin-Susceptible Staphylococcus aureus</i>
MRSA	<i>Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus</i>
MSCRAMMs	<i>Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules</i>
NHSN	<i>National Healthcare Safety Network</i>
NNISS	<i>National Nosocomial Infection Surveillance System</i>
ORF	<i>Open Reading Frames</i>
PAP-AUC	<i>Population Analysis Profile - Area Under the Curve</i>
PBP	<i>Penicillin Binding Protein</i>
PBP2a	<i>Penicillin Binding Protein 2a</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PVL	<i>Panton-Valentine Leucocidin</i>
SEs	<i>Staphylococcal Enterotoxins</i>
SCC _{mec}	<i>Staphylococcal Cassette Chromosome mec</i>
SpA	<i>Staphylococcal protein A</i>
TCRS	<i>Two Component Regulatory Systems</i>
TSST-1	<i>Toxic-Shock Syndrome Toxin-1</i>
VISA	<i>Vancomycin Intermediate Staphylococcus aureus</i>
VSSA	<i>Vancomycin Susceptible Staphylococcus aureus</i>
VRSA	<i>Vancomycin Resistance Staphylococcus aureus</i>
VT-MRSA	<i>Vancomycin-Tolerant Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura do sistema <i>agr</i> em <i>Staphylococcus aureus</i>	16
Figura 2 - Estrutura geral do elemento <i>SCCmec</i>	20
Figura 3 - Mutações no TCRS <i>vraRS</i> e <i>walKR</i> (A) e no gene <i>rpoB</i> (B) que induz o espessamento da parede celular em hVISA e VISA.....	29

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Especificações dos tipos de SCC <i>mec</i> ^a	23
---	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1 <i>Staphylococcus aureus</i>.....	12
2.2 Patogenicidade	13
2.3 Fatores de virulência	14
2.3.1 Regulador gene acessório.....	16
2.4 Resistência aos antimicrobianos	18
2.4.1 <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilina	18
2.4.1.1 Cassete cromossômico estafilocócico <i>mec</i>	20
2.4.1.2 CA-MRSA, HA-MRSA e LA-MRSA	23
2.4.1.3 Relevância clínica.....	24
2.4.2 <i>Staphylococcus aureus</i> com reduzida susceptibilidade à vancomicina	26
2.4.2.1 <i>Staphylococcus aureus</i> com heterorresistência à vancomicina	28
2.4.2.1.1 Relevância clínica	31
3 REFERÊNCIAS	33
4 JUSTIFICATIVA	50
5 OBJETIVO	51
5.1 Objetivo geral.....	51
5.1.2 Objetivos específicos.....	51
6 ARTIGO CIENTÍFICO.....	52
7 CONCLUSÕES.....	73
8 ANEXOS	74
8.1 Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UFCSPA.....	74
8.2 Trabalhos apresentados em eventos científicos.....	75
8.3 Normas para publicação <i>Journal of Microbiology, Immunology and Infection</i>.....	77

1 INTRODUÇÃO

Staphylococcus aureus é uma das causas mais frequentes de infecções relacionadas à assistência à saúde e comunitárias, as quais podem apresentar altos índices de morbidade e mortalidade (CASAPAO et al., 2014; ZHANG et al., 2015). Devido ao seu potencial patogênico é responsável por causar uma gama de infecções que se caracterizam pela variedade de manifestações clínicas, incluído desde quadros localizados, como infecções na pele e de tecidos moles, até doenças sistêmicas de alta letalidade, tais como bacteremia, osteomielite e endocardite (EDWARDS, MASSEY e CLARKE, 2012; YAMAMOTO et al., 2013).

Esta multiplicidade de infecções causadas por *S. aureus* está relacionada a um arsenal de fatores de virulência que auxiliam na adesão as 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 (TONG, CHEN e FOWLER, 2012; ALFATEMI et al., 2014; YU et al., 2015). A expressão da maioria dos fatores de virulência é coordenada pelo regulador gene acessório (*agr*), principal sistema *quorum sensing* que controla a expressão de genes associados a virulência do *Staphylococcus aureus* (GORDON, WILLIAMS e CHAN, 2013; KONG, NEOH e NATHAN, 2016).

O aumento das infecções estafilocócicas aliadas ao uso irracional de antimicrobianos acarretou no aparecimento de *S. aureus* capaz de produzir mecanismos de resistência frente a várias classes de antimicrobianos, o que torna difícil o tratamento e agrava o processo infeccioso (AVENT et al., 2013). A resistência à meticilina (MRSA) surge devido à aquisição de genes que codificam proteínas ligadoras de penicilinas alteradas (PBP2a), *mecA* ou *mecC*, contidos no elemento genético móvel denominado cassete cromossômico estafilocócico *mec* (SCC*mec*) (PATERSON et al., 2014). Este além de carregar os genes de recombinases, genes de resistência à meticilina e seus reguladores, podem carrear determinantes de resistência a outras classes de antimicrobianos (TURLEJ, HRYNIEWICZ e EMPEL, 2011; ITO et al., 2014).

Com o avanço das infecções causadas por MRSA, a vancomicina tornou-se a principal opção terapêutica. Contudo, o uso constante deste glicopeptídeo e, por conseguinte o aumento da pressão seletiva, trouxeram como consequência o aparecimento de MRSA tolerante (VT-MRSA) (CÁZARES-DOMÍNGUEZ et al., 2015a) e com reduzida susceptibilidade à vancomicina (hVISA e VISA) (GOMES, WARD e LAPLANTE, 2015; KOH et al., 2016). *Staphylococcus aureus* com heterorresistência à vancomicina (hVISA) são isolados de MRSA

sensíveis à vancomicina, mas com uma subpopulação de células que apresentam reduzida susceptibilidade (LIN et al., 2012; VAS et al., 2014). Os mesmos estão comumente associados com falhas no tratamento por vancomicina, bacteremia persistente, hospitalização prolongada e desfechos clínicos adversos (GOMES, WARD e LAPLANTE, 2015; HU et al., 2015; DA COSTA et al., 2016; HUANG et al., 2016).

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. Nesse contexto, conhecer as características fenotípicas e moleculares de *S. aureus* resistente à meticilina e com reduzida susceptibilidade à vancomicina é necessário para entender e controlar a sua disseminação, como também auxiliar na antibioticoterapia desse microrganismo multirresistente.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *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., 2008; MADIGAN et al., 2016).

Até o momento, o gênero *Staphylococcus* possui 52 espécies e 28 subespécies (LPSN, 2016), sendo *Staphylococcus aureus* uma das espécies de maior importância clínica (OLIVEIRA et al., 2014). Este microrganismo foi identificado pela primeira vez em 1880, no Reino Unido, pelo cirurgião escocês Alexandre Ogston, em pus de abscessos cirúrgicos (KONEMAN et al., 2008).

Staphylococcus 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, e produz as

enzimas catalase, coagulase e DNase (KONEMAN et al., 2008; INGRAHAM e INGRAHAM, 2011).

Como microrganismo oportunista, *Staphylococcus aureus* se comporta tanto como comensal quanto como patógeno. São encontrados colonizando a microbiota normal da pele e de outros sítios anatômicos como a nasofaringe, axilas, períneo e trato gastrointestinal; podendo tornar-se patogênico e causar diversas infecções, em condições que ocorrem a ruptura da barreira cutânea ou a diminuição da imunidade (SALES e SILVA, 2012; SOLLID et al., 2014).

2.2 Patogenicidade

Staphylococcus aureus é uma das causas mais frequentes de infecções relacionadas à assistência à saúde e comunitárias, as quais podem apresentar altos índices de morbidade e mortalidade (CASAPAO et al., 2014; ZHANG et al., 2015). Sua transmissão ocorre principalmente por contato direto com indivíduos colonizados ou infectados e também em contato com superfícies ou instrumentos contaminados (CHAMBERS e DELEO, 2009; STEFANI e GOGLIO, 2010; MACAL et al., 2014; KHAN, AHMAD e MEHBOOB, 2015).

A maioria das infecções provocadas por *Staphylococcus aureus* resulta de portadores assintomáticos, em que o indivíduo pode ser colonizado por períodos curtos ou longos, causando doença quando há algum comprometimento do sistema imunológico. Na população mundial cerca de 20% a 30% das pessoas são portadores persistentes e 60% alberga *S. aureus* de forma intermitente (DELEO et al., 2010; JENKINS et al., 2015).

O maior problema do portador assintomático é que, mesmo não apresentando sinais ou sintomas clínicos de doença ele representa potencial fonte de infecção, e pode estar disseminando o patógeno pelos ambientes em que circula (RODRÍGUEZ - NORIEGA e SEAS, 2010). O estado de portador assintomático é ainda mais preocupante, quando este é um profissional da saúde. Devido a facilidade na transmissão do *S. aureus*, o portador é um fator de risco importante na epidemiologia e patogênese da doença, visto que a maioria das infecções relacionadas à assistência à saúde são adquiridas após exposição a mãos contaminadas de profissionais da saúde ou através do contato com outros pacientes colonizados e/ou infectados (ALVAREZ, LABARCA e SALLES, 2010).

Staphylococcus aureus é um patógeno versátil, responsável por causar uma gama de infecções que se caracterizam pela variedade de manifestações clínicas, incluído desde quadros

localizados até doenças sistêmicas de alta letalidade (EDWARDS, MASSEY e CLARKE, 2012; SMITH et al., 2012). Dentre as principais síndromes infecciosas causadas por *S. aureus*, podemos elencar três tipos principais: infecções superficiais, tais como infecções na pele e tecidos moles; infecções sistêmicas, tais como bacteremia, osteomielite, pneumonia, endocardite e meningite; infecções associadas às toxinas estafilocócicas como intoxicação alimentar, síndrome da pele escaldada e síndrome do choque tóxico (BIEN, SOKOLOVA e BOZKO, 2011; YAMAMOTO et al 2013).

A patogênese do *S. aureus* é complexa e depende de diversos fatores associados à doença clínica, os quais incluem a resistência aos antimicrobianos, a susceptibilidade do hospedeiro e a expressão de fatores de virulência que permitem a colonização persistente, evasão do sistema imune e disseminação no hospedeiro. O conjunto de fatores de virulência necessários para o desenvolvimento da infecção estafilocócica depende do sítio da infecção, o qual pode ser determinante na disseminação do patógeno (VANDENESCH, LINA e HENRY, 2012; GORDON, WILLIAMS e CHAN, 2013; YU et al., 2015).

2.3 Fatores de virulência

A multiplicidade de infecções por *Staphylococcus aureus* está relacionada a um arsenal de fatores de virulência que auxiliam na adesão as 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 (TONG, CHEN e FOWLER, 2012; ALFATEMI et al., 2014; YU et al., 2015).

A infecção estafilocócica se inicia com a adesão as 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) que se liga a região Fc da imunoglobulina G inibindo a opsonização e a fagocitose; as proteínas de ligação à fibronectina (FnbpA e FnbpB); a proteína de ligação ao colágeno (Cna); e os fatores de agregação (CflA e CflB) que se ligam ao fibrinogênio conferindo propriedades antifagocíticas (BIEN, SOKOLOVA e BOZKO, 2011; COSTA et al, 2013; YAMAMOTO et al, 2013; BROWN et al., 2014; DAYAN et al., 2016; WARYAH et al., 2016).

Alguns componentes estruturais também são determinantes de virulência em *S. aureus*,

tais como os polissacarídeos capsulares que impedem a fagocitose e promovem a adesão as células hospedeiras; o peptidoglicano capaz de ativar o sistema complemento e aumentar a quimiotaxia das células polimorfonucleares; e o ácido teicoico que estimula a produção de interleucina-1 (KONEMAN et al., 2008; CORREAL et al., 2013).

Junto aos fatores supracitados, também produz toxinas como as enterotoxinas estafilocócicas (SEs) que estão associadas a quadros de intoxicação alimentar; a leucocidina de Panton-Valentine (PVL) responsável pela formação de poros na membrana dos leucócitos induzindo a citólise; a toxina esfoliativa estafilocócica (ETs) que induz eritema e esfoliação da pele, fenômeno observado na síndrome da pele escaldada; a toxina 1 da síndrome do choque tóxico estafilocócico (TSST-1), a qual estimula a proliferação de linfócitos T, causando a síndrome do choque tóxico; e a alfa, beta e delta-hemolisina que apresentam atividade hemolítica (BIEN, SOKOLOVA e BOZKO, 2011; VANDENESCH, LINA e HENRY, 2012; COSTA et al, 2013; YU et al., 2015; KONG, NEOH e NATHAN, 2016; WARYAH et al., 2016).

Da mesma maneira pode secretar enzimas extracelulares como a catalase que inativa o peróxido de hidrogênio formado pelo sistema de mieloperoxidase, no interior de células fagocíticas; a coagulase que catalisa a conversão de fibrinogênio em fibrina; a fibrinolise 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 ajudando a disseminar os patógenos nos tecidos cutâneos e subcutâneos; a fosfolipase que destrói os fosfolipídios da membrana citoplasmática do hospedeiro, acarretando na lise das células; e a nuclease que cliva tanto DNA como RNA (KONEMAN et al., 2008; CORREAL et al., 2013).

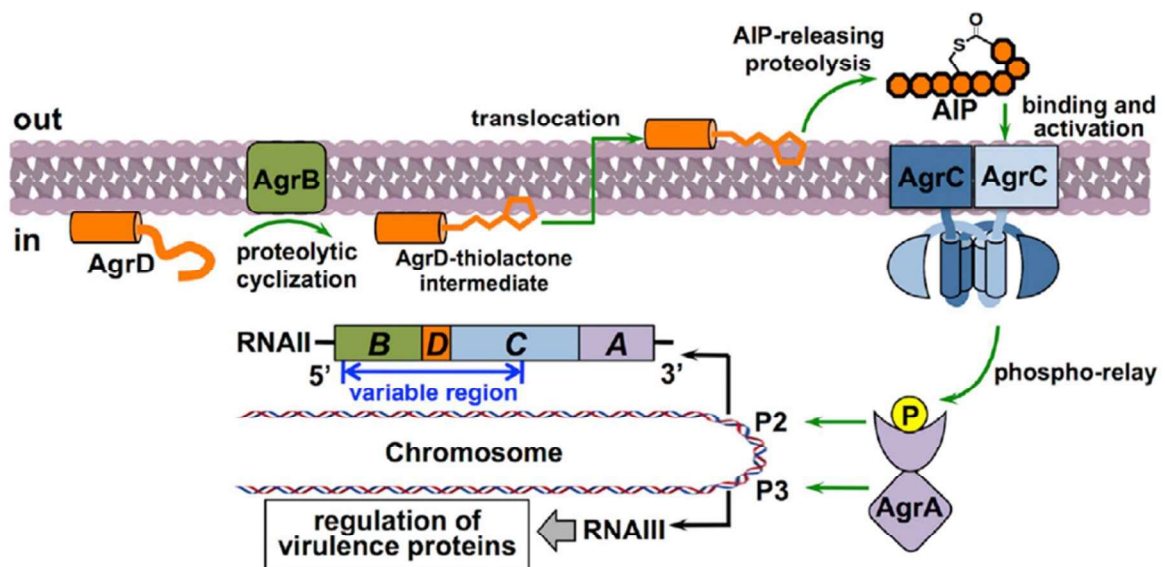
A maioria dos fatores de virulência em *Staphylococcus aureus* é coordenado pelo regulador gene acessório (*agr*, do inglês *accessory gene regulator*), um grupamento de genes com atividade *quorum sensing* (QS). O QS é um mecanismo de comunicação celular que permite controlar a expressão de genes em resposta a sua densidade populacional através da secreção de moléculas autoindutoras (GORDON, WILLIAMS e CHAN, 2013; KONG, NEOH e NATHAN, 2016).

2.3.1 Regulador gene acessório

O regulador gene acessório controla a expressão de fatores de virulência do *Staphylococcus aureus* que são expressos em determinada fase do crescimento. Durante a fase de latência e início da exponencial, *S. aureus* produz fatores associados à parede celular que auxiliam a adesão nos tecidos e a evasão do sistema imune. Por outro lado, durante a fase pós-exponencial são secretadas as exoproteínas, e ao mesmo tempo ocorre a diminuição da regulação de fatores associados à parede celular, facilitando a disseminação da infecção (WANG e MUIR, 2016).

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 pelos genes *agrA*, *agrB*, *agrC* e *agrD*. O operon P3, que codifica o RNA III, contém também o gene *hld* responsável pela síntese da delta-hemolisina (COTAR et al., 2012; GORDON, WILLIAMS e CHAN, 2013; GRAY, HALL e GRESHAM, 2013; LAVERTY, GORMAN e GILMORE, 2013; GHASEMIAN et al., 2014; QUAVE e HORSWILL, 2014; CÁZARES-DOMÍNGUEZ et al., 2015b; WANG e MUIR, 2016).

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, se unem formando um peptídeo autoindutor (AIP, do inglês *Autoinducing Peptide*), que é liberado para o meio extracelular. O AgrD, o precursor do AIP, é primeiro processado proteoliticamente

por uma peptidase ligada a membrana, 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 (COTAR et al., 2012; GORDON, WILLIAMS e CHAN, 2013; GRAY, HALL e GRESHAM, 2013; WANG e MUIR, 2016).

O AIP interage com o sensor de resposta AgrC, proteína transmembrana com receptores para AIP, para causar a fosforilação e ativação do regulador de resposta, AgrA. A proteína AgrA fosforilada, como indutor do promotor P2, regula a transcrição do RNA II e, conseqüentemente, 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 (COTAR et al., 2012; GORDON, WILLIAMS e CHAN, 2013; GRAY, HALL e GRESHAM, 2013; WANG e MUIR, 2016).

O RNA III ativa a expressão de genes que codificam fatores de virulência secretados pela célula, como exoproteínas, leucocidina, hemolisinas, superantígenos e enterotoxinas; e reduz a expressão de fatores de virulência associados a célula, tais como a coagulase, fibronectina, proteína A e adesinas de superfície (COTAR et al., 2012; CÁZARES-DOMÍNGUEZ et al., 2015b; KONG, NEOH and NATHAN, 2016; WANG e MUIR, 2016).

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 específico 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 (NOVICK et al., 2008; GORDON, WILLIAMS e CHAN, 2013; GRAY, HALL e GRESHAM, 2013; WANG e MUIR, 2016).

Uma relação entre grupo *agr* (I-IV) e tipo de infecções tem sido descrita para *Staphylococcus aureus*. Em 2016, no estudo realizado por Goudarzi e colaboradores (2016), *S. aureus* pertencente ao *agr* do grupo I foi prevalente em infecções não invasivas e *agr* do grupo II em infecções invasivas. Corroborando com este resultado, Rasmussen e colaboradores (2013) mostrou uma associação significativa entre o *agr* do grupo II com infecções invasivas estafilocócicas. No trabalho de Cotar e colaboradores (2012), *agr* do grupo III foi predominante

em infecções no trato respiratório. E a presença do *agr* IV em *S. aureus* foi relacionado com a síndrome da pele escaldada estafilocócica, no estudo de Lamand e colaboradores (2012).

Apesar da importância do *agr* para a virulência estafilocócica, alguns estudos sugerem que a disfunção no *agr* confere vantagens de sobrevivência para o microrganismo (CHONG et al., 2013) e piores desfechos em pacientes com infecções por *Staphylococcus aureus* (PARK et al., 2015). No estudo conduzido por Chong e colaboradores (2013), a disfunção no *agr* foi associada com bacteremia persistente causada tanto por MRSA quanto por MRSA com heterorresistência à vancomicina. Em 2014, Viedma e colaboradores (2014) avaliou a relação entre disfunção no *agr* e reduzida susceptibilidade para vancomicina (RSV) e os resultados mostraram associação significativa com RSV causada por *S. aureus* e disfunção no *locus agr*. Corroborando com este resultado, Schweizer e colaboradores (2011) ao avaliar 814 pacientes com bacteremia por *S. aureus* observou uma significativa associação entre disfunção do *agr* e mortalidade de pacientes com infecções estafilocócicas.

Além da importância do *agr* para a patogenicidade estafilocócica, vários estudos têm mostrado uma relação entre polimorfismo do grupo *agr* e reduzida susceptibilidade à vancomicina em *S. aureus*. Alguns dados têm demonstrado que *agr*II está frequentemente associado com reduzida susceptibilidade e com falhas no tratamento com vancomicina (CÁZARES-DOMÍNGUEZ et al., 2015b; PARK et al., 2015; CECHINEL et al., 2016). Além disso, Cechinel e colaboradores (2016), relatou que o risco de morte aumenta 12,6 vezes em pacientes com bacteremia por MRSA que expressa o *agr*II quando comparado com aqueles com bacteremia por MRSA que expressa outro tipo do *agr*. No estudo conduzido por Cázares-Domínguez e colaboradores (2015b), 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 observou que entre os MRSA com CIM de 2 µg/mL a presença do *agr*II foi significativa quando comparado com outros tipos do *agr*.

2.4 Resistência aos antimicrobianos

2.4.1 Staphylococcus aureus resistente à metilina

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* resistentes a este antimicrobiano, devido a produção de beta-lactamase (penicilinase) codificada pelo gene *blaZ*. Esta enzima degrada o anel beta-lactâmico da penicilina, tornando-se assim incapaz de inibir a síntese da parede celular bacteriana (CHAMBERS e DELEO, 2009; DUMITRESCU et al., 2010; MOELLERING et al., 2012; STRYJEWSKI e COREY, 2014).

A introdução da meticilina, penicilina semissintética resistente a penicilinase, na década de 1960, possibilitou um avanço na terapêutica antiestafilocócica. O mecanismo de ação dos antimicrobianos beta-lactâmicos são as proteínas de ligação à penicilina (PBPs, do inglês *Penicillin Binding Proteins*); transpeptidases responsáveis por reações envolvidas na síntese da parede celular bacteriana constituem alvos de ação dos beta-lactâmicos. Ao interagir com essa enzima, o beta-lactâmico impede a formação completa da camada de peptidoglicano, desencadeando a morte bacteriana (CHAMBERS, 1999; MIMICA, 2012).

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. Esse gene é parte integrante de um elemento genético móvel (MGE, do inglês *Mobile Genetic Element*) denominado cassete cromossômico estafilocócico *mec* (SCC*mec*, do inglês *Staphylococcal Cassette Chromosome mec*), que se encontra localizado em uma região específica do genoma, denominado *attBsc* (do inglês, *SCCmec attachment site*), na extremidade 3' do gene *orfX* (SHORE et al., 2011; OTTER e FRENCH, 2012; STEFANI et al., 2012; FIGUEIREDO e FERREIRA, 2014, PATERSON et al., 2014).

Além do gene *mecA*, recentemente foi descoberto o gene *mecC* que codifica uma proteína homologa à PBP 2a, que possui 70% de identidade com *mecA*. O gene *mecC* faz parte do SCC*mec* XI e está relacionado com a transmissão zoonótica de MRSA (GARCÍA-ÁLVAREZ et al., 2011; STEGGER et al., 2012; BECKER et al., 2013; DEPLANO et al., 2014; GARCÍA-GARROTE et al., 2014; PATERSON et al., 2014; KERSCHNER et al., 2015).

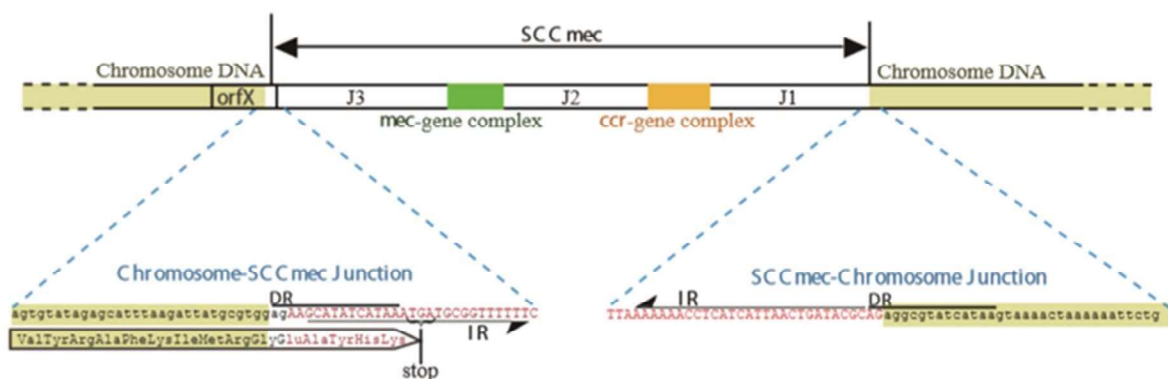
A identificação de MRSA pode ser feita por métodos clássicos, automatizados ou moleculares, que caracterizam a espécie e determinam o perfil de susceptibilidade aos

antimicrobianos. Os testes de susceptibilidade, segundo o CLSI (2015), podem ser feitos por disco-difusão com cefoxitina ou por microdiluição com oxacilina para determinação da resistência aos beta-lactâmicos. A detecção do gene *mecA* (KONDO et al., 2007) ou *mecC* (STEGGER et al., 2012) por PCR (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*) é considerado o método padrão-ouro para a confirmação de isolados de *S. aureus* com resistência à meticilina.

2.4.1.1 Cassete cromossômico estafilocócico *mec*

O gene *mecA* está localizado no elemento genético móvel denominado SCC*mec* (**Figura 2**), que é constituído basicamente pela presença de repetições diretas (ID, do inglês *Direct Repeats*) e invertidas (IR, do inglês *Inverted Repeats*), pelo complexo do gene *mec* e do gene *ccr*, e pelas regiões de junção (J; do inglês *Junkyard*) (IWG-SCC, 2009; TURLEJ, HRYNIEWICZ e EMPEL, 2011; ITO et al., 2014).

Figura 2 - 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*), sequências de inserção (IS431 ou IS1272), e em *S. aureus* é categorizado pela classe A, B, C e E. O complexo *ccr* é composto pelos genes de recombinases (*ccr*, do inglês *cassette chromosome recombinases*), responsáveis por integrar ou excisar o SCC*mec* no genoma, e 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*), que podem conter

determinantes de resistências a outras classes de antimicrobianos (IWG-SCC, 2009; LI et al., 2011; TURLEJ, HRYNIEWICZ e EMPEL, 2011; HIRAMATSU et al., 2013; 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 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 (DEURENBERG e STOBBERINGH, 2008; IWG-SCC, 2009; TURLEJ, HRYNIEWICZ e EMPEL, 2011).

A integração e excisão do SCC*mec* no cromossomo, é mediada 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 tem identidade nucleotídica entre 60% e 82%. Os genes *ccrA*, *ccrB* e *ccrC* são diferenciados em quadro (*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 distribuído em *S. aureus* (IWG-SCC, 2009; TURLEJ, HRYNIEWICZ e EMPEL, 2011; ITO et al., 2014; WU et al., 2015)

Além do complexo *mec* e *ccr*, o SCC*mec* contém três regiões J, designadas J1, J2 e J3, as quais constituem componentes não essenciais do SCC*mec*. A região J1 se situa entre a junção direita do SCC*mec* e complexo *ccr*, enquanto que a região entre os complexos *ccr* e *mec* é denominada região J2. A região J3 se expande a partir do complexo *mec* até a *orfX*. Assim, a composição de todos os SCC*mec* são (*orfX*) J3-*mec*-J2-*ccr*-J1 (**Figura 2**). Com exceção do SCC*mec* VII e SCC*mec* IX, o complexo *ccr* está posicionado entre as regiões J3 e J2 e o complexo *mec* entre as regiões J2 e J1 (TURLEJ, HRYNIEWICZ e EMPEL, 2011; ITO et al., 2014).

Apesar das regiões J serem consideradas menos importantes em termos de funções do SCC*mec*, estas regiões 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 carrear determinantes de resistência a outras classes de antimicrobianos e a metais pesados. O plasmídeo pUB110 carrega o gene *ant* (4') que codifica resistência a kanamicina e tobramicina, e o gene *ble* que confere resistência a bleomicina; frequentemente presentes em SCC*mec* II, e ocasionalmente em SCC*mec* I e IV. O pT181, plasmídeo que possui o gene *tetK*, responsável pela resistência a tetraciclina é identificado na maioria dos SCC*mec* tipos III e V. A presença do gene *aacA-aphD*, no transposon Tn4001, codifica resistência aos aminoglicosídeos e é detectado no SCC*mec* IV. O transposon Tn554, presente em SCC*mec* II e VIII, possui o gene *ermA* e *spc* que codificam resistência a eritromicina e espectinomicina, respectivamente. E o Ψ Tn554, transposon que contém o *cad*, gene que codifica resistência para cádmio encontrado em SCC*mec* tipo III (DEURENBERG e STOBBERINGH, 2008; TURLEJ, HRYNIEWICZ e EMPEL, 2011; ITO et al., 2014).

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 (LI et al., 2011; SHORE et al., 2011; TURLEJ, HRYNIEWICZ e EMPEL, 2011; WU et al., 2015). Até o momento, existem doze tipos de SCC*mec* (I-XII), e esta classificação é muito utilizada na tipagem molecular de MRSA (GOULD, 2012; MARTINS et al., 2014).

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 SCC*mec* XII (WU et al., 2015). 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)

^a Tabela adaptada de WU et al. (2015) e IWG-SCC (2016).

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

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

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

2.4.1.2 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 em ambientes hospitalares. Já na década de 80, foram reportados casos de infecções fora do ambiente hospitalar causadas por linhagens específicas de MRSA, denominadas MRSA adquiridos na comunidade (CA-MRSA, do inglês *Community Acquired Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*), que possuíam como característica principal maior susceptibilidade aos antimicrobianos e maior virulência associada, quando comparado às linhagens hospitalares (HA-MRSA, do inglês *Hospital Acquired Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*) (CAMERON, HOWDEN e PELEG, 2011; HIRAMATSU et al., 2013; SOWASH e UHLEMANN, 2014).

O CA-MRSA, segundo o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC, do inglês *Centers for Disease Control and Prevention*), deve ser isolado de pacientes comunitários 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 com infecções de pele em pacientes jovens saudáveis, apresentam resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos, e possuem o SCC mec dos tipos IV ou V. Em alguns casos, estão associados com a produção da leucocidina de *Panton-Valentine*, que conferem aos CA-MRSA maior virulência (OTTER e FRENCH, 2012; OTTO, 2012; OTTO, 2013; SOWASH e UHLEMANN, 2014; KALE e DHAWAN, 2016).

HA-MRSA, por sua vez, são mais prevalentes em pacientes com doenças graves, hospitalização prolongada e/ou uso prévio de antimicrobianos. Acometem principalmente idosos, neonatos, imunocomprometidos e pacientes sob diálise, pós cirurgia ou em uso de dispositivos invasivos. Normalmente albergam o SCC mec dos tipos I, II ou III e apresentam resistência a múltiplos antimicrobianos (OTTER e FRENCH, 2012; CHEN et al., 2013; HIRAMATSU 2013; SOWASH e UHLEMANN, 2014).

Até alguns anos atrás, as linhagens de MRSA poderiam ser classificadas como CA-MRSA ou HA-MRSA, de acordo com a sua patogenicidade, resistência aos antimicrobianos e caracterização molecular. Porém hoje já se observa algumas linhagens de CA-MRSA no ambiente hospitalar bem como algumas linhagens de HA-MRSA na comunidade (OTTER e FRENCH, 2012; YAMAMOTO et al., 2013).

Recentemente, em animais, surgiu uma nova estirpe MRSA com potencial zoonótico, tendo sido designada de MRSA associado a animais de produção (LA-MRSA, do inglês *livestock-associated Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*). Sabe-se que 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, nesse hospedeiro, contudo LA-MRSA tem sido frequentemente identificado em infecções humanas (PANTOSTI, 2012; SMITH, 2015).

2.4.1.3 Relevância clínica

O surgimento de MRSA é um desafio importante na terapia estafilocócica, não apenas por serem causadores de infecções relacionadas à assistência à saúde e comunitárias, mas

também por apresentar resistência a múltiplos antimicrobianos, o que limita as opções para a antibioticoterapia (OTTER e FRENCH, 2010).

No estudo realizado, entre 2004 a 2009, em 36 países da América Latina, Ásia, África e Europa pelo Consórcio Internacional de Controle de Infecções Nosocomiais (INICC, do inglês *International Nosocomial Infection Control Consortium*), a resistência à meticilina foi observada entre 71% a 84% dos isolados de *S. aureus* (ROSENTHAL et al., 2014). Entre 2009 a 2010, 69.475 infecções hospitalares (HAI, do inglês *Healthcare Associated Infection*) ocorridas em 2.039 hospitais foram reportados para a Rede de Segurança Nacional de Saúde (NHSN, do inglês *National Healthcare Safety Network*). Neste estudo, *S. aureus* foi o patógeno mais prevalente em HAI (15,6%) e em infecções de sítios cirúrgicos (30,4%) (SIEVERT et al., 2013).

Em 2011, segundo o Centro de Controle e Prevenção de Doenças, 80.461 pacientes foram diagnosticados com infecção invasiva por MRSA, sendo que 11.285 casos resultaram em morte nos EUA (CDC, 2013). Entre 2011 a 2014, 365.490 infecções hospitalares ocorridas em 4.515 hospitais foram reportados para a Rede de Segurança Nacional de Saúde. Neste estudo, *S. aureus* foi o segundo patógeno mais frequente em HAI (11,8%) e o mais prevalente em infecções de sítios cirúrgicos (20,7%) (WEINER et al., 2016).

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 prolongada permanência no hospital ($p < 0,00001$) quando comparado com infecções por MSSA (WHO, 2014).

No estudo realizado durante o ano de 2014, em nove estados dos Estados Unidos pelo Sistema de Vigilância Núcleo Bacteriano Ativo (ABCs, do inglês *Active Bacterial Core Surveillance*) reportou a estimativa nacional 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*). A estimativa nacional e a taxa de mortalidade em HO, HACO e CA

causadas por MRSA foram 2.106 e 0,66 (0,32-1,34); 5.637 e 1,77 (1,10-2,93); 1.316 e 0,41 (0,18-0,87), respectivamente (CDC, 2014).

2.4.2 *Staphylococcus aureus* com reduzida susceptibilidade à vancomicina

A vancomicina, antimicrobiano da classe dos glicopeptídeos, foi aprovada em 1958 pela Administração de Alimentos e Medicamentos (FDA, do inglês *Food and Drug Administration*) para o tratamento de infecções causadas por *Staphylococcus aureus* resistente à penicilina. No entanto, a meticilina e a cefoxitina, foram aprovadas logo depois apresentando menor toxicidade. Devido à toxicidade da vancomicina, o seu uso ficou reservado para pacientes alérgicos aos antimicrobianos da classe dos beta-lactâmicos ou com infecções causadas por microrganismos resistentes aos novos antimicrobianos (LEVINE, 2006).

Esse antimicrobiano atua inibindo a síntese da parede celular de microrganismos gram-positivos, ao ligar-se no terminal carboxílico de resíduos D-alanina-D-alanina dos precursores peptídicos, formando um complexo não covalente estável, impedindo a elongação do peptidoglicano na parede celular (SAKOULAS e MOELLERING, 2008; HOWDEN et al., 2010; HU, PENG e RAO, 2016).

O manual do Instituto Norte-Americano de Padrões Clínicos e Laboratoriais (CLSI, do inglês *Clinical and Laboratory Standards Institute*) classifica como sensível à vancomicina isolados com CIM menor ou igual a 2 µg/mL (VSSA), como intermediário com CIM entre 4 e 8 µg/mL (VISA), e como resistente com CIM maior ou igual a 16 µg/mL (VRSA). O fenótipo hVISA é caracterizado pela presença de uma subpopulação com reduzida sensibilidade à vancomicina. Em geral, são isolados de MRSA sensíveis à vancomicina (CIM ≤ 2mg/L), com uma subpopulação de aproximadamente 10⁻⁵ a 10⁻⁶ células, que apresenta CIM ≥ 4 mg/L (LIN et al., 2012; VAS et al., 2014; DI GREGORIO et al., 2015).

Com o avanço das infecções causadas por MRSA aliada o uso irracional de antimicrobianos, à vancomicina tornou-se a principal opção terapêutica (AVENT et al., 2013). O uso constante desse glicopeptídeo e, por conseguinte o aumento da pressão seletiva, trouxe como consequência evolutiva em 1996, no Japão, o aparecimento de *Staphylococcus aureus* com sensibilidade 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).

O mecanismo de resistência dos fenótipos hVISA e VISA, não é totalmente elucidado, mas ocorre principalmente pela superprodução de resíduos D-ala-D-ala, que provoca espessamento da parede celular bacteriana e o aprisionamento das moléculas de vancomicina e, conseqüentemente, dificulta sua ação no sítio de ligação (DEVI et al., 2015). Entre os fatores de risco para o aparecimento de linhagens hVISA e VISA estão infecções ou colonização prévia por MRSA e exposição à vancomicina (GAO et al., 2010; HOWDEN et al., 2010; GOMES, WARD e LAPLANTE, 2015).

Isolados de MRSA também desenvolveram tolerância à vancomicina (VT-MRSA, do inglês *Vancomycin-Tolerant Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*), definida como a razão da concentração bactericida mínima (CBM) pela concentração inibitória mínima (CIM) maior ou igual a 32 (ROSE et al., 2012; CÁZARES-DOMÍNGUEZ et al., 2015a). Infecções causadas por VT-MRSA são mais difíceis de tratar, especialmente quando associadas a meningite, endocardite, osteomielite e infecções em pacientes imunocomprometidos, bem como associadas a falhas no tratamento por vancomicina (CÁZARES-DOMÍNGUEZ et al., 2015a). A seleção de VT-MRSA provavelmente ocorre devido a exposição a concentrações subótimas de vancomicina, o que explica o rápido desenvolvimento de hVISA e VISA (ROSE et al., 2012; CÁZARES-DOMÍNGUEZ et al., 2015a).

No ano de 2002 em Michigan, nos Estados Unidos, foi descrita a primeira infecção clínica por *Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina (VRSA, do inglês *Vancomycin Resistance Staphylococcus aureus*). No Brasil, em 2012 foi relatado o primeiro isolado com essa característica em São Paulo, em um paciente de 35 anos com reincidência do quadro de infecções de pele e tecidos moles (ROSSI et al., 2014). A presença de VRSA também foi relatada em outros países (AZIMIAN et al, 2012; MELO-CRISTINO et al, 2013; LIMBAGO et al, 2014).

Acredita-se que essa resistência é mediada pelo transposon Tn1546, adquirido de *Enterococcus faecalis* resistente à vancomicina. O Tn1546, contém os genes *vanA*, que provoca alteração do fragmento de D-alanil-D-alanina (D-ala-D-ala) para D-alanil-D-lactato (D-ala-D-lac), impedindo a ligação da vancomicina e inibindo sua ação na síntese da parede celular bacteriana (AZMIAN et al., 2012; GARDETE e TOMASZ, 2014; LIMBAGO et al, 2014).

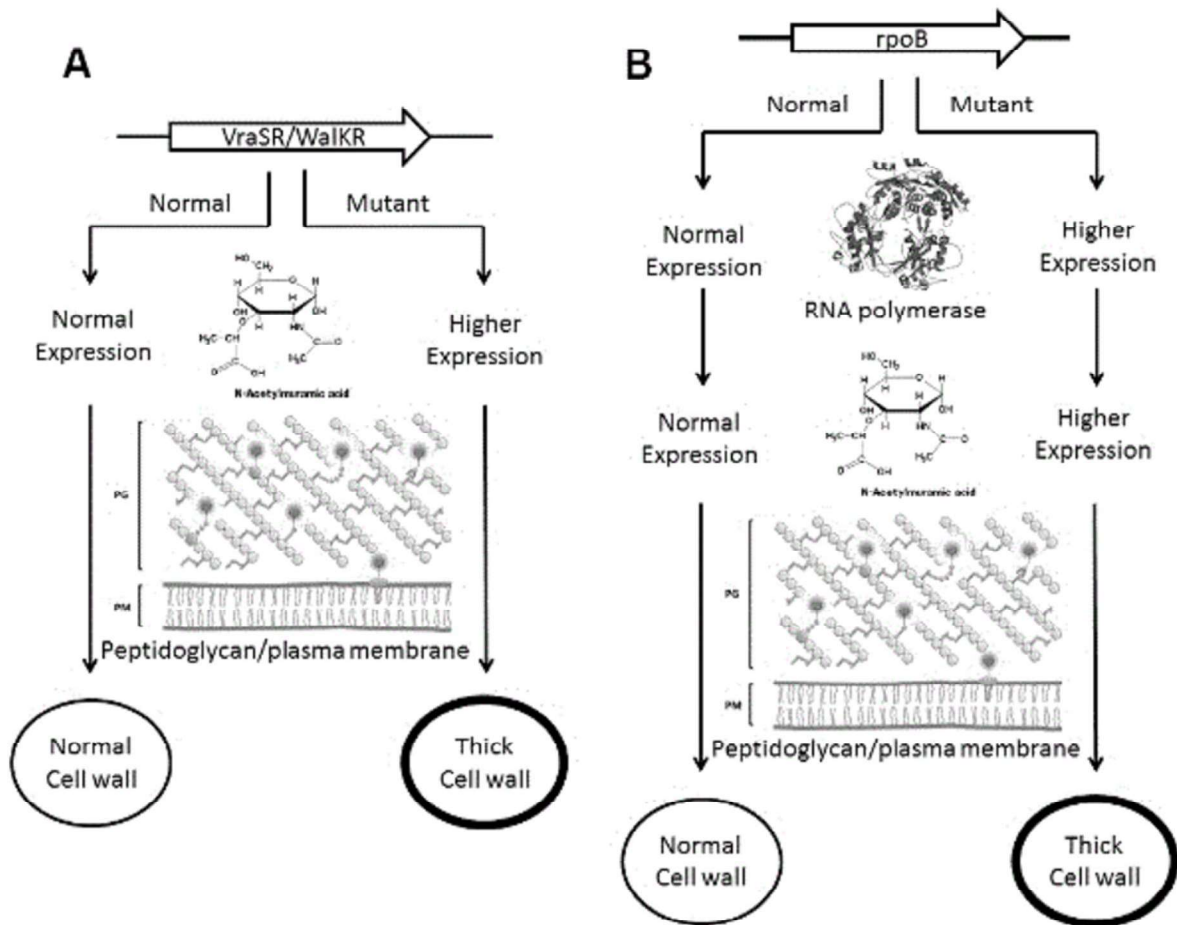
2.4.2.1 *Staphylococcus aureus* com heterorresistência à vancomicina

Isolados de hVISA são caracterizados pela presença de uma subpopulação com reduzida susceptibilidade à vancomicina. Em geral, são isolados de MRSA sensíveis à vancomicina quando analisados por métodos convencionais, ou seja, com CIM menor ou igual a 2 mg/L, mas com uma subpopulação de aproximadamente 10^{-5} a 10^{-6} células que apresentam níveis intermediários de resistência à vancomicina, com CIM maior ou igual a 4 mg/L (LIN et al., 2012; VAS et al., 2014; DI GREGORIO et al., 2015; SILVEIRA et al., 2015). Linhagens de hVISA possuem morfologia heterogênea, com presença de colônias pequenas, baixa taxa de crescimento, reduzida autólise e hemólise, parede celular espessa e com reduzida susceptibilidade à vancomicina (HOLMES et al., 2012; DEVI et al., 2015; ZHU et al., 2015).

O mecanismo de aquisição do fenótipo hVISA e VISA, não é totalmente elucidado, mas trata-se principalmente de mutações em sistemas reguladores de dois componentes (TCRS, do inglês *two component regulatory systems*), *vraRS* e *walKR*, e no gene que codifica a subunidade beta da RNA polimerase, *rpoB*, (**Figura 3**); provocando o espessamento da parede celular bacteriana que acarreta no aprisionamento das moléculas de vancomicina e, conseqüentemente, dificulta sua ação no sítio de ligação (HOWDEN et al., 2011; HAFER et al., 2012; CHEN et al., 2014; GARDETE e TOMASZ, 2014; HIRAMATSU et al., 2014; DEVI et al., 2015; HU et al., 2016).

O sistema *vraSR* composto pelos genes sensor de quinase (*vraS*) e regulador de resposta (*vraR*), constitui o operon *vraU-vraT/yvqF-vraS-vraR*, frequentemente mutado em isolados de hVISA e VISA. Mutação no gene *vraT/yvqF*, essencial para a função do *vraSR*, ativa tanto o *vraS* como o *vraR* e promove a regulação excessiva da síntese parede celular (BOYLE-VAVRA et al., 2013; DEVI et al., 2015). O TCRS *walKR* composto pelos genes sensor de quinase (*walK*) e regulador de resposta (*walR*), induz a biossíntese da parede celular e reduz a autólise de hVISA e VISA, quando ocorre mutação no gene *walK* (DEVI et al., 2015; CAMERON et al., 2016). Mutações no gene *rpoB* influencia no perfil transcricional da célula, promovendo assim resistência à vancomicina por meio de alterações do metabolismo e fisiologia celular (MATSUO et al., 2011; DEVI et al., 2015).

Figura 3 - Mutações no TCRS *vraSR* e *walKR* (A) e no gene *rpoB* (B) que induz o espessamento da parede celular em hVISA e VISA.



Fonte: adaptada de DEVI et al. (2015).

Após sua primeira descrição em 1997 no Japão (HIRAMATSU et al., 1997b), a presença de hVISA entre isolados de MRSA têm sido reportados no mundo com frequência variável, sendo de 1,2-18,8% nos Estados Unidos (PITZ et al, 2011; RICHTER et al., 2011; HAFER et al, 2012; CASAPAO et al, 2014); 2,2-4,7% na Malásia (AHMAD et al, 2012; RAMLI et al, 2012); 2,9% na Tailândia (PANOMKET et al, 2014); 3,3% na Argentina (DI GREGORIO et al., 2015); 3,4% no Reino Unido (KIRBY et al, 2010); 5,3% no Canadá (ADAM et al, 2010); 5,6-22,1% na China (CHEN et al, 2011; LIN et al, 2012; LIU et al., 2015; HUANG et al, 2016); 6,51% no Japão (HANAKI et al., 2014); 6,9-25,9% na Índia (CHAUDHARY e PAYASI, 2013; CHAUDHARI et al, 2015); 9,7% no Brasil (SILVEIRA et al., 2014); 13,7% na Turquia (SANCAK et al, 2013) e 37,7% na Coreia (PARK et al, 2012).

Na revisão sistemática publicado em 2015, Zhang e colaboradores (2015) analisaram a

prevalência de hVISA e VISA entre os isolados de MRSA de diferentes períodos de estudo, regiões geográficas, amostras clínicas e *backgrounds* genético. 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. Da mesma maneira, a prevalência de VISA foi 2,05% antes de 2006, 2,63% entre 2006 e 2009, e 7,93% entre 2010 e 2014. No que se refere as diferentes regiões geográficas, a prevalência de hVISA foi 6,81% na Ásia e 5,60% na Europa e América, e de VISA foi 3,42% na Ásia e 2,75%, na Europa e América. Em relação as amostras clínicas, a prevalência de hVISA e VISA foi maior em amostras de cultura de sangue com 9,81% e 2,00%, respectivamente. No que diz respeito ao *background* genético, a maioria dos hVISA apresentaram o SCCmec II (48,16%), seguido do SCCmec IV (18,07%), SCCmec III (17,99%) e SCCmec I (2,12%). Em VISA o SCCmec II (37,74%) foi predominante, seguido pelo SCCmec III (32,72%), SCCmec I (11,79%) e SCCmec IV (10,08%).

A significativa discrepância dos dados epidemiológicos, apesar de refletir a variação geográfica é, em grande parte, fruto da inconsistência metodológica do processo de detecção deste fenótipo; da ausência de padronização e, ainda, devido às características biológicas e ao próprio mecanismo de resistência desses isolados. Fatores como o sítio da amostra clínica, a população de pacientes testada e o número de amostras analisadas são também importantes interferentes nas taxas encontradas (VAN HAL e PATERSON, 2011; ZHANG et al., 2015).

Atualmente, os métodos de triagem mais utilizados para detecção do fenótipo hVISA são: o Macro Etest, que associa inóculo denso, incubação prolongada e meio nutritivo com tiras de Etest de vancomicina; o Etest GRD (GRD, do inglês *Glycopeptide Resistance Detection*), que usa um gradiente de dupla face de vancomicina e teicoplanina em uma única tira para detecção de hVISA e VISA; e a triagem em ágar suplementado com vancomicina, onde colônias mais resistentes são selecionadas a partir do crescimento em Ágar BHI contendo 6 µg/mL de Vancomicina (BHIA-6V) (CHAUDHARI et al., 2015; DEVI et al., 2015; GOMES, WARD e LAPLANTE, 2015).

O método confirmatório, considerado padrão-ouro para a detecção do fenótipo 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, laborioso e caro para serem aplicados na rotina do laboratório de microbiologia clínica (RIEDERER et al., 2011; SATOLA et al., 2011; FINK et al., 2012; HU et al., 2013; VAS et al., 2014; 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 (Mu_3), for entre 0,9 a 1,3, o isolado é considerado hVISA (SATOLA et al, 2011).

2.4.2.1.1 Relevância clínica

Apesar do 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 falhas no tratamento por vancomicina, bacteremia persistente, hospitalização prolongada e desfechos clínicos adversos (VAN HAL e FOWLER, 2013; GOMES, WARD e LAPLANTE, 2015; HU et al., 2015; HUANG et al., 2016; DA COSTA et al., 2016).

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*) causada 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 foram também mais prováveis 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; $p = 0,022$). A mortalidade relacionada com infecção por MRSA de 30 dias, mesmo sendo o dobro em pacientes com infecção por hVISA não foi estatisticamente significativa em comparação com a mortalidade relacionada a VS-MRSA (21,3% vs. 9,8%, respectivamente; $p = 0,081$).

Em 2016, Koh e colaboradores (2016) ao analisar 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 significativamente associados com falhas no tratamento em pacientes com SAP ($p = 0,014$). A presença de hVISA em pacientes com SAB e SAP também não apresentou associação com a mortalidade de 30 dias relacionadas 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 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) ao analisar 128 MRSA de bacteremia observaram que a eficácia da vancomicina foi 78,8% em pacientes infectados por MRSA com CIM de 1 $\mu\text{g/ml}$, enquanto que a eficácia foi apenas 30,0% em pacientes infectados por MRSA com CIM de 2 $\mu\text{g/mL}$. Em metanálise realizado por Jacob e colaboradores (2013) ao avaliar 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 ($\geq 1,5 \mu\text{g/mL}$) constataram que o risco de falhas no tratamento e mortalidade aumenta em infecções por MRSA com alta CIM quando comparado com aqueles de baixa CIM.

Na revisão sistemática publicada em 2014, Kalil e colaboradores (2014) avaliaram a associação entre a concentração inibitória mínima da vancomicina e mortalidade entre pacientes com bacteremia por *Staphylococcus aureus* (SAB). A taxa de mortalidade foi 30,7% entre pacientes com SAB por hVISA com alta CIM para vancomicina ($\geq 1,5 \text{ mg/L}$) comparado com 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 40% a incidência de hVISA nos isolados com CIM de 2 $\mu\text{g/mL}$. Em 2015, Hu e colaboradores (2015) ao analisar 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).

3 REFERÊNCIAS

ADAM, Heather J. et al. Detection and characterization of heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* isolates in Canada: results from the Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program, 1995–2006. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 54, n. 2, p. 945-949, Feb. 2010.

AHMAD, Norazah et al. The presence of heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (hVISA) in a major Malaysian hospital. **Medical Journal of Malaysia**, Malaysia, v. 67, n. 3, p. 269-273, June 2012.

ALFATEMI, Seyedeh Mahsan Hoseini et al. Analysis of Virulence Genes Among Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Strains. **Jundishapur Journal of Microbiology**, Ahvaz, v. 7, n. 6, p. e10741, June 2014.

ALVAREZ, Carlos; LABARCA, Jaime; SALLES, Mauro. Prevention strategies for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Latin America. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, São Paulo, v. 14, Suppl. 2, p. 107-108, Dec. 2010.

AVENT, Minyon L. et al. Vancomycin therapeutics and monitoring: a contemporary approach. **Internal Medicine Journal**, Sydney, v. 43, n. 2, p. 110-119, Feb. 2013.

AZIMIAN, Amir et al. Genetic Characterization of a Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolate from the Respiratory Tract of a Patient in a University Hospital in Northeastern Iran. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 50, n. 11, p. 3581-3585, Nov. 2012.

BECKER, Karsten et al. Evaluation of a modular multiplex-PCR methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* detection assay adapted for *mecC* detection. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 51, n. 6, p. 1917-1919, June 2013.

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**, Washington, v. 52, n. 10, p. 3512-3516, Aug. 2008.

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**, London, v. 2011, n. ID 601905, p. 1-13, July 2011.

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**, Washington, v. 57, n. 1 p. 83-95, Jan. 2013.

BROWN, Aisling F., et al. *Staphylococcus aureus* Colonization: Modulation of Host Immune Response and Impact on Human Vaccine Design. **Frontiers in Immunology**, Switzerland, v. 8, n. 4, p. 507-526, Jan. 2014.

CAMERON, David R.; HOWDEN, Benjamin P.; PELEG, Anton Y. The interface between antibiotic resistance and virulence in *Staphylococcus aureus* and its impact upon clinical outcomes. **Clinical Infectious Diseases**, Boston, v. 53, n. 6, p. 576-582, Sept. 2011.

CASAPAO, Anthony M. et al. Clinical Outcomes in Patients with Heterogeneous Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus* Bloodstream Infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 57, n. 9, p. 4252-4259, Sept. 2013.

_____ et al. Evaluation of vancomycin population susceptibility analysis profile as a predictor of outcomes for patients with infective endocarditis due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 58, n. 8, p. 4636-4641, Aug. 2014.

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

_____ et al. Vancomycin tolerant, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* reveals the effects of vancomycin on cell wall thickening. **PLoS One**, San Francisco, v. 10, n. 3, p. e0118791, Mar. 2015a.

CECHINEL, Angélica et al. Association between Accessory Gene Regulator Polymorphism and Mortality among Critically Ill Patients Receiving Vancomycin for Nosocomial MRSA Bacteremia: A Cohort Study. **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology**, London, v. 2016, n. ID 8163456, p. 1-5, Sept. 2016.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Active Bacterial Core Surveillance (ABCs) Report Emerging Infections Program Network Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, 2014. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/abcs/reportsfindings/survreports/mrsa12.pdf>> Acesso em: 15 Nov. 2016.

_____ (CDC). Antibiotic resistance threats in the United States, 2013. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>> Acesso em: 15 Nov. 2016.

CHAMBERS, Henry F.; DELEO, Frank R. Waves of Resistance: *Staphylococcus aureus* in the Antibiotic Era. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 7, n. 9, p. 629-641, Sept. 2009.

CHAMBERS, Henry F. Penicillin-binding protein-mediated resistance in pneumococci and staphylococci. **Journal of Infectious Diseases**, San Francisco, v. 179, Suppl. 2, p. S353-S359, Dec.1999.

CHAUDHARI, Surg Cdr C.N. et al. Heterogeneous vancomycin intermediate among methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **Medical journal Armed Forces India, Maharashtra**, v. 71, n. 1, p. 15-18, Jan. 2015.

CHAUDHARY, Manu; PAYASI, Anurag. Prevalence of heterogeneous glycopeptide intermediate resistance in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **American Journal of Infectious Diseases**, Atlanta, v. 9, n. 3, p. 63-70, Aug. 2013.

CHEN, Chih-Jung et al. Reduced susceptibility to vancomycin in isogenic *Staphylococcus aureus* strains of sequence type 59: tracking evolution and identifying mutations by whole-genome sequencing. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Birmingham, v. 69, n. 2, p. 349-354, Feb. 2014.

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

CHEN, Xu et al. Epidemiological and genetic diversity of *Staphylococcus aureus* causing bloodstream infection in Shanghai, 2009-2011. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 9, p. e72811, Sept. 2013.

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

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty-Fourth Informational Supplement (M100-S24), v. 34, n. 1, p. 124-139, Jan. 2015.

CORREAL, Júlio CD et al. Infecções por *Staphylococcus aureus*: mudança do perfil epidemiológico no Hospital Universitário Pedro Ernesto. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, Rio de Janeiro, v. 12, n. 3, p. 31-46, Set. 2013.

COSTA, Ana Rita et al. *Staphylococcus aureus* virulence factors and disease. **Microbial Pathogens and Strategies for Combating them: Science, Technology and Education**, Badajoz, v. 1, n. 1, p. 702-710, Dec. 2013.

COTAR, Ani Ioana et al. Prevalence of *agr* specificity groups among *Staphylococcus aureus* strains isolated from different clinical specimens patients with cardiovascular surgery associated infections. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, Cambridge, v. 2, n. 1, p. 264-270, Jan. 2012.

DA COSTA, Thaina Miranda et al. Clinical and Microbiological Characteristics of Heteroresistant and Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus* from Bloodstream Infections in a Brazilian Teaching Hospital. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 11, n. 8, p. e0160506, Aug. 2016.

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

DELEO, Frank R. et al. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Lancet**, London, v. 375, n. 9725, p. 1557-1568, May. 2010.

DEPLANO, Ariane et al. Genetic diversity among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates carrying the *mecC* gene in Belgium. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Birmingham, v. 69, n. 6, p. 1457-1460, Jan. 2014.

DEURENBERG, Ruud H.; STOBBERINGH, Ellen E. The evolution of *Staphylococcus aureus*. **Infection, Genetics and Evolution**, Maastricht, v. 8, n. 6, p. 747-763, Dec. 2008.

DEVI, Yamuna et al. Challenges in the Laboratory Diagnosis and Clinical Management of Heteroresistant Vancomycin *Staphylococcus aureus* (hVISA). **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, 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**, New York, v. 21, n. 1, p. 25-34, Feb. 2015.

DUMITRESCU, Oana et al. Résistance aux antibiotiques chez *Staphylococcus aureus*. **Medecine/Sciences**, Montrouge, v. 26, n. 11, p. 943-949, Nov. 2010.

EDWARDS, Andrew M; MASSEY, Ruth C; CLARKE, Simon R. Molecular mechanisms of *Staphylococcus aureus* nasopharyngeal colonization. **Molecular Oral Microbiology**, Louisville, v. 27, n. 1, p. 1-10, Feb. 2012.

FIGUEIREDO, Agnes Marie Sá; FERREIRA, Fabienne Antunes. The multifaceted resources and microevolution of the successful human and animal pathogen methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 109, n. 3, p. 265-278, May 2014.

FINK, Susan L. et al. Low Prevalence of Heterogeneous Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus* Isolates among Connecticut Veterans. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 56, n. 1, p. 582-583, Jan. 2012.

GAO, Wei et al. Two Novel Point Mutations in Clinical *Staphylococcus aureus* Reduce Linezolid Susceptibility and Switch on the Stringent Response to Promote Persistent Infection. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 6, n. 6, p. e1000944, June 2010.

GARCÍA-ÁLVAREZ, Laura et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. **The Lancet Infectious Diseases**, Cambridge, v. 11, n. 8, p. 595-603, Aug. 2011.

GARCÍA-GARROTE, Fernando et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the *mecC* gene: emergence in Spain and report of a fatal case of bacteremia. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Birmingham, v. 69, n. 1, p. 45-50, Jan. 2014.

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

GHASEMIAN, Abdolmajid et al. Accessory gene regulator specificity groups among *Staphylococcus aureus* isolated from hospitalized children. **Archives of Pediatric Infectious Diseases**, Tehran, v. 2, n. 4, p. 1-4, Oct. 2014.

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**, Washington, v. 35, n. 4, p. 424-432, Apr. 2015.

GORDON, Christopher P.; WILLIAMS, Paul; CHAN, Weng C. Attenuating *Staphylococcus aureus* virulence gene regulation: a medicinal chemistry perspective. **Journal of Medicinal Chemistry**, Delaware, v. 56, n. 4, p. 1389-1404, Jan. 2013.

GOUDARZI, Mehdi et al. Molecular Characterization of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Intensive Care Units in Iran: ST22-SCCmec IV/t790 Emerges as the Major Clone. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 11, n. 5, p. e0155529, May 2016.

GOULD, Ian M. et al. New insights into methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) pathogenesis, treatment and resistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Oxford, v. 39, n. 2, p. 96-104, Feb. 2012.

GRAY, Brian; HALL, Pamela; GRESHAM, Hattie. Targeting *agr*- and *agr*-Like Quorum Sensing Systems for Development of Common Therapeutics to Treat Multiple Gram-Positive Bacterial Infections. **Sensors**, Switzerland, v. 13, n. 4, p. 5130-5166, Apr. 2013.

HAFER, Cory et al. Contribution of selected gene mutations to resistance in clinical isolates of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial and Agents Chemotherapy**, Washington, v. 56, n. 11, p. 5845-5851, Nov. 2012.

HANAKI, Hideaki et al. Antibiotic susceptibility survey of blood-borne MRSA isolates in Japan from 2008 through 2011. **Journal of Infection and Chemotherapy**, Tokyo, v. 20, n. 9, p. 527-534, Sept. 2014.

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

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

_____ et al. Multi-drug-resistant *Staphylococcus aureus* and future chemotherapy. **Journal of Infection and Chemotherapy**, Tokyo, 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**, Tokyo, v. 40, n. 1, p. 135-146, July 1997b.

HOLMES, Natasha E.; JOHNSON, Paul D. R.; HOWDEN, Benjamin P. Relationship between Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus*, Vancomycin-Intermediate *S. aureus*, High Vancomycin MIC, and Outcome in Serious *S. aureus* Infections. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 50, n. 8, p. 2548-2552, Aug. 2012.

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**, Washington, 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**, San Francisco, v. 7, n. 11, p. e1002359, Nov. 2011.

HUANG, Sung-His et al. Prevalence of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) and heterogeneous VISA among methicillin-resistant *S. aureus* with high vancomycin minimal inhibitory concentrations in Taiwan: A multicenter surveillance study, 2012 - 2013. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, Taipei, v. 49, n. 5, p. 701-707, Oct. 2016.

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**, London, v. 15, n. 1, p. 1, Oct. 2015.

HU, Jian et al. Reduced Vancomycin Susceptibility Found in Methicillin-Resistant and Methicillin-Sensitive *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates in Northeast China. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 9, p. e73300, Sept. 2013.

HU, Qiwen; PENG, Huagang; RAO, Xiancai. Molecular Events for Promotion of Vancomycin Resistance in Vancomycin Intermediate *Staphylococcus aureus*. **Frontiers in Microbiology**, Switzerland, 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 Cassete Chromosome Elements (IWG-SCC). Disponível em: <http://www.sccmec.org/Pages/SCC_Classification_EN.html> Acesso em: 15 Nov. 2016.

International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassete Chromosome Elements (IWG-SCC). Classification of staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*): guidelines for reporting novel SCC*mec* elements. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, 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**, Washington, 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**, Washington, v. 1085, 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**, Washington, 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**, Oxford, 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**, Washington, v. 6, n. 1, p. e02272, Feb. 2015.

KALE, Pratibha; DHAWAN, Bhatta. The changing face of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Indian Journal of Medical Microbiology**, Vellore, 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**, Saint Louis, v. 312, n. 15, p. 1552-1564, Oct. 2014.

KERSCHNER, Heidrun et al. First report of *mecC* MRSA in human samples from Austria: molecular characteristics and clinical data. **New Microbes and New Infections**, Marseille, v. 3, n. 1, p. 4-9, Jan. 2015.

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

KIRBY, Andrew et al. *Staphylococcus aureus* with reduced glycopeptide susceptibility in Liverpool, UK. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Birmingham, v. 65, n. 4, p. 721-724, Apr. 2010.

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

KONDO, Yoko et al. Combination of Multiplex PCRs for Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Type Assignment: Rapid Identification System for *mec*, *ccr*, and Major Differences in Junkyard Regions. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, Washington, v. 51, n. 1, p. 264-274, Jan. 2007.

KONEMAN, Elmer et al. **Diagnóstico Microbiológico**. 6^a ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2008. p. 637-643.

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

LAMAND, Virginie et al. Epidemiological data of staphylococcal scalded skin syndrome in France from 1997 to 2007 and microbiological characteristics of *Staphylococcus aureus* associated strains. **Clinical Microbiology and Infection**, Switzerland, v. 8, n. 12, p. E514-E521, Dec. 2012.

LAVERTY, Garry; GORMAN, Sean P.; GILMORE, Brendan F. Biomolecular mechanisms of staphylococcal biofilm formation. **Future Microbiology**, London, v. 8, n. 4, p. 509-524, Dec. 2013.

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**, London, v. 107, n. 1, p. 8-12, Dec. 2014.

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

LI, Shanshuang et al. Novel types of staphylococcal cassette chromosome *mec* elements identified in clonal complex 398 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 55, n. 6, p. 3046-3050, June 2011.

LIMBAGO, Brandi M. et al. Report of the 13th Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* from the United States. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 52, n. 3, p. 998-1002, Mar. 2014.

LIN, Shang-Yi et al. Molecular epidemiology and clinical characteristics of hetero-resistant vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* bacteremia in a Taiwan Medical Center. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, Taipei, v. 45, n. 6, p. 435-441, Dec. 2012.

List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature (LPSN). **Genus *Staphylococcus***. Disponível em: <<http://www.bacterio.net/staphylococcus.html>> Acesso em: 15 Nov. 2016.

LIU, Cailin et al. Molecular characteristics and virulence factors in methicillin-susceptible, resistant, and heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* from central-southern China. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, Taipei, v. 48, n. 5, p. 490-496, Oct. 2015.

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**, Washington, v. 46, n. 4, p. 1147-1152, Apr. 2002.

MACAL, Charles M. et al. Modeling the transmission of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a dynamic agent-based simulation. **Journal of Translational Medicine**, London, v. 12, n. 1, p. 1-12, May 2014.

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

MARTINS, André et al. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from a Brazilian university hospital. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, São Paulo, v. 18, n. 3, p. 331-335, Jan. 2014.

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

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**, London, v. 10, n. 1, p. 173-188, June 2010.

MELO-CRISTINO, José et al. First case of infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. **Lancet**, London, v. 382, n. 9888, p. 205, July 2013.

MIMICA, Marcelo Jenné. Atualização sobre detecção laboratorial de resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus aureus*. **Arquivos Médicos dos Hospitais e da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo**, São Paulo, v. 57, n. 1, p. 129-134, Nov. 2012.

MOELLERING, Robert C. MRSA: the first half century. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Birmingham, v. 67, n. 1, p. 4-11, Jan. 2012.

MONECKE, Stefan et al. Diversity of SCCmec Elements in *Staphylococcus aureus* as Observed in South-Eastern Germany. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 11, n. 9, p. e0162654, Sept. 2016.

NOVICK, Richard P.; GEISINGER, Edward. Quorum sensing in staphylococci. **Annual Review of Genetics**, New York, v. 42, n.1, p. 541-564, Mar. 2008.

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

OLIVEIRA, Caio Ferreira de et al. Emergência de *Staphylococcus aureus* resistentes aos antimicrobianos: um desafio contínuo. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, Salvador, v. 13, n. 2, p. 242-247, Ago. 2014.

OTTER, Jonathan A.; FRENCH, Gary L. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the case for a genotypic definition. **Journal of Hospital Infection**, Birmingham, v. 81, n. 3, p. 143-148, July 2012.

_____. Molecular epidemiology of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. **The Lancet Infectious Diseases**, London, v. 10, n. 4, p. 227-239, Apr. 2010.

OTTO, Michael. Community-associated MRSA: what makes them special? **International Journal of Medical Microbiology**, London, v. 303, n. 6, p. 324-333, Aug. 2013.

_____. MRSA virulence and spread. **Cellular microbiology**, Oxford, v. 14, n. 10, p. 1513-1521, Oct. 2012.

PANOMKET, Pawana et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin in Sanprasitthiprasong Hospital. **Journal of the Medical Association of Thailand**, Bangkok, v. 97, Suppl. 4, p. S7-S11, Apr. 2014.

PANTOSTI, Annalisa. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with animals and its relevance to human health. **Frontiers in Microbiology**, Switzerland, v. 3, n. 127, p. 1-12, Apr. 2012.

PARK, Ki-Ho et al. Comparison of the clinical features, bacterial genotypes and outcomes of patients with bacteraemia due to heteroresistant vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* and vancomycin-susceptible *S. aureus*. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Birmingham, v. 67, n. 8, p. 1843-1849, Apr. 2012.

PARK, Min-Jeong et al. Accessory Gene Regulator Polymorphism and Vancomycin Minimum Inhibitory Concentration in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Annals of Laboratory Medicine**, Seoul, v. 35, n. 4, p. 399-403, Apr. 2015.

PATERSON, GK et al. Prevalence and characterization of human *mecC* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in England. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Birmingham, v. 69, n. 4, p. 907-910, Apr. 2014.

PITZ, Adam M. et al. Vancomycin susceptibility trends and prevalence of heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in clinical methicillin resistant *S. aureus* isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 49, n. 1, p. 269-274, Jan. 2011.

QUAVE, Cassandra L.; HORSWILL, Alexander R. Flipping the switch: tools for detecting small molecule inhibitors of staphylococcal virulence. **Frontiers in Microbiology**, Switzerland, v. 5, n. 706, p. 1-10, Dec. 2014.

RAMLI, Siti Roszilawati et al. Screening and detection of heterogenous vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* in Hospital Kuala Lumpur Malaysia, using the glycopeptide resistance detection Etest and population analysis profiling. **Infectious Disease Reports**, Kuala Lumpur, v. 4, n. 1, p. e20, Jan. 2012.

RASMUSSEN, Gunlög et al. Prevalence of Clonal Complexes and Virulence Genes among Commensal and Invasive *Staphylococcus aureus* Isolates in Sweden. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 10, p. e77477, Oct 2013.

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**, Washington, v. 49, n. 12, p. 4203-4207, Dec. 2011.

RIEDERER, K et al. Detection of Intermediately Vancomycin-Susceptible and Heterogeneous *Staphylococcus aureus* Isolates: Comparison of Etest and Agar Screening Methods. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 49, n. 6, p. 2147-2150, June 2011.

RODRÍGUEZ - NORIEGA, Eduardo; SEAS, Carlos. The changing pattern of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America: implications for clinical practice in the region. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, São Paulo, v. 14, Suppl. 2, p. S87-S96, Dec. 2010.

ROSE, Warren E. et al. Vancomycin tolerance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: influence of vancomycin, daptomycin, and telavancin on differential resistance gene expression. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 56, n. 8, p. 4422-4427, June 2012.

ROSENTHAL, Víctor Daniel et al. International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC) report, data summary of 43 countries for 2007-2012. Device-associated module. **American Journal of Infection Control**, Atlanta, v. 42, n. 9, p. 942-956, Sept. 2014.

ROSSI, Flávia et al. A Transferable Vancomycin Resistance in a Community-Associated MRSA Lineage. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 370, n. 16, p. 1524-1531, Apr. 2014.

SAKOULAS, George; MOELLERING, Robert C. Increasing Antibiotic Resistance among Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains. **Clinical Infectious Diseases**, Boston, v. 46, Suppl. 5, p. S360-S367, June 2008.

SALES, Laís Monteiro; SILVA, Tatiane Mendes da. *Staphylococcus aureus* metilina resistente: um desafio para a saúde pública. **Acta Biomedica Brasiliensia**, Rio de Janeiro, v. 3, n. 1, p. 1-13, Jun. 2012.

SANCAK, Banu et al. Vancomycin and daptomycin minimum inhibitory concentration distribution and occurrence of heteroresistance among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* blood isolates in Turkey. **BMC infectious diseases**, London, v. 13, n. 50, p. 46-54, Dec. 2013.

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**, Washington, v. 49, n. 1, p. 177-183, Jan. 2011.

SCHWEIZER, Marin L. et al. Increased mortality with accessory gene regulator (*agr*) dysfunction in *Staphylococcus aureus* among bacteremic patients. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 55, n. 3, p. 1082-1087, Mar. 2011.

SHORE, Anna C. et al. Detection of staphylococcal cassette chromosome *mec* type XI carrying highly divergent *mecA*, *mecI*, *mecR1*, *blaZ*, and *ccr* genes in human clinical isolates of clonal complex 130 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 55, n. 8, p. 3765-3773, Aug. 2011.

SIEVERT, Dawn M. et al. Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated with Healthcare-Associated Infections: Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009-2010. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, Atlanta, v. 34, n. 1, p. 1-14, Jan. 2013.

SILVEIRA, Alessandro Conrado de Oliveira et al. Is prediffusion test an alternative to improve accuracy in screening hVISA strains and to detect susceptibility to glycopeptides/lipopeptides? **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, Stanford, v. 79, n. 4, p. 401-404, Aug. 2014.

_____ et al. Molecular epidemiology of heteroresistant vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, São Paulo, v. 19, n. 5, p. 466-472, Aug. 2015.

SOLLID, Johanna U. Ericson et al. *Staphylococcus aureus*: determinants of human carriage. **Infection, Genetics and Evolution**, Maastricht, v. 21, n. 1, p. 531-541, Jan. 2014.

SOWASH, Madeleine G.; UHLEMANN, Anne-Catrin. Community-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* case studies. **Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Protocols**, Tokyo, v. 1085, p. 25-69, June 2014.

SMITH, Tara C. Livestock-Associated *Staphylococcus aureus*: The United States Experience. **PLOS Pathogens**, San Francisco, v. 11, n. 2, p. e1004564, Feb. 2015.

_____ et al. Molecular and epidemiologic predictors of *Staphylococcus aureus* colonization site in a population with limited nosocomial exposure. **American Journal of Infection Control**, Atlanta, v. 40, n. 10, p. 992-996, Dec. 2012.

STEFANI, Stefania et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): global epidemiology and harmonization of typing methods. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Oxford, v. 39, n. 4, p. 273-282, Apr. 2012.

_____ ; GOGLIO, Antonio. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: related infections and antibiotic resistance. **International Journal of Infectious Diseases**, Oxford, v. 14S4, n. 1, p. S19-S22, Oct. 2010.

STEGGER, M. et al. Rapid detection, differentiation and typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harbouring either *mecA* or the new *mecA* homologue *mecALGA251*. **Clinical Microbiology and Infection**, Switzerland, v. 18, n. 4, p. 395-400, Apr. 2012.

STRYJEWSKI, Martin E.; COREY, G. Ralph. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: An Evolving Pathogen. **Clinical Infectious Diseases**, Boston, v. 58, Suppl. 1, p. S10-19, Jan. 2014.

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**, Tokyo, v. 17, n. 1, p. 52-57, Feb. 2011.

TONG, Steven Y.C.; CHEN, Luke F.; FOWLER, Vance G. Colonization, pathogenicity, host susceptibility, and therapeutics for *Staphylococcus aureus*: what is the clinical relevance? **Seminars in Immunopathology**, Switzerland, v. 34, n. 2, p. 185-200, Mar. 2012.

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

VANDENESCH, François; LINA, Gerard; HENRY, Thomas. *Staphylococcus aureus* hemolysins, bi-component leukocidins, and cytolytic peptides: a redundant arsenal of membrane-damaging virulence factors. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, Switzerland, v. 2, n. 12, p. 1-15, Feb. 2012.

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**, Boston, v. 54, n. 6, p. 755-771, Feb. 2012.

_____ ; FOWLER, Vance G. Is It Time to Replace Vancomycin in the Treatment of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections? **Clinical Infectious Diseases**, Boston, v. 56, n. 12, p. 1779-1788, Jun. 2013.

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

VAS, Krisztina Eszter et al. Study of Decreased Susceptibility to Vancomycin in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains isolated from a Romanian Multidisciplinary Emergency Hospital. **Romanian Review of Laboratory Medicine**, Warsaw, v. 22, n. 2, p. 245-254, June 2014.

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

WANG, Boyuan; MUIR, Tom W. Regulation of Virulence in *Staphylococcus aureus*: Molecular Mechanisms and Remaining Puzzles. **Cell Chemical Biology**, Princeton, v. 23, n. 2, p. 214-224, Feb. 2016.

WARYAH, Charlene Babra et al. Diversity of Virulence Factors Associated with West Australian Methicillin-Sensitive *Staphylococcus aureus* Isolates of Human Origin. **BioMed Research International**, Cambridge, v. 2016, ID 8651918, p. 1-10, May 2016.

WEINER, Lindsey M. et al. Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated With Healthcare-Associated Infections: Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2011-2014. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, Atlanta, v. 37, n. 11, p. 1-14, June 2016.

World Health Organization (WHO). Antimicrobial resistance: global report on surveillance. WHO 2014. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf?ua=1> Acesso em: 15 Nov. 2016.

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

YAMAMOTO, Tatsuo et al. Genetic nature and virulence of community associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **BioMedicine**, Cambridge, v. 3, n. 1, p. 2-18, Jan. 2013.

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**, São Paulo, v. 19, n. 6, p. 614-622, Sept. 2015.

ZHANG, Shanshan et al. Systematic review and meta-analysis of the epidemiology of vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* isolates. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 10, n. 8, p. e0136082, Aug. 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**, Washington, v. 53 n. 2, p. 531-540, Feb. 2009.

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

4 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 morbidade e mortalidade. 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 são fundamentais 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 (VT-MRSA, hVISA e VISA). Estudos tem mostrado que isolados de MRSA susceptíveis à vancomicina, particularmente aqueles com CIM elevada, estão associados a falhas no tratamento com vancomicina e mortalidade em pacientes com infecções, principalmente, devido a MRSA com heterorresistência à vancomicina. Nesse contexto, o conhecimento das características moleculares de *S. aureus* resistente à meticilina e com reduzida susceptibilidade 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.

5 OBJETIVO

5.1 Objetivo geral

- Analisar as características moleculares de isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina e com reduzida susceptibilidade à vancomicina obtidos em hospitais de Porto Alegre.

5.1.2 Objetivos específicos

- Verificar a frequência de VT-MRSA e hVISA entre os MRSA;
- Avaliar a possível associação entre hVISA e VT-MRSA;
- Determinar e contrastar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos dos MRSA, VT-MRSA e hVISA;
- Realizar e comparar a tipagem do SCCmec e agr entre os MRSA, VT-MRSA e hVISA;
- Verificar a presença dos principais genes de virulência relacionados com infecções estafilocócicas: hla (alfa-hemolisina), hld (delta-hemolisina), sea (enterotoxina estafilocócica A), pvl (leucocidina de Pantón-Valentine) e tst (toxina da síndrome do choque tóxico).

6 ARTIGO CIENTÍFICO

Some molecular characteristics of vancomycin-susceptible *Staphylococcus aureus* could help to detect failure treatments due to reduced vancomycin susceptibility. Foi submetido à revista *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, cujas as normas para a publicação estão apresentadas como anexo desse documento.

Fator de Impacto: 2.955

Some molecular characteristics of vancomycin-susceptible *Staphylococcus aureus* could help to detect failure treatments due to reduced vancomycin susceptibility.

Rossato Adriana Medianeira ^{a,*}, Reiter Keli Cristine ^a, Paim Thiago Galvão da Silva ^a, Soares Renata Oliveira ^a, Sambrano Gustavo Enck ^{a, d'}, Azevedo Pedro Alves ^a.

^aBasic Health Department, Federal University of Health Science of Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.

*Corresponding author. Basic Health Department, Federal University of Health Science of Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil. Sarmiento Leite Street, 245. ZIP code 90050-170. Phone number +555133038740. Fax number: +555133038810.

E-mail address: adrimfarma@yahoo.com.br

Abstract

Background: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) with reduced vancomycin susceptibility is reported worldwide. The purpose of this study was to evaluate the frequency of reduced vancomycin susceptibility among MRSA isolates, and correlate with molecular characteristics in MRSA, VT-MRSA and hVISA isolates in Southern Brazil. **Methods:** This cross-sectional observational study was conducted with 177 MRSA isolated between 2012 and 2014 from hospitals in Porto Alegre, RS, Brazil. All isolates were submitted to antimicrobial susceptibility testing, determination of vancomycin MIC and MBC for the identification of VT-MRSA, molecular typing and detection of virulence genes by conventional PCR. Moreover, MRSA isolates were screened for hVISA by BHIA-3V and BHIA-6V, and further confirmed with modified population analysis profiling - area under the curve method. **Results:** Of the 177 MRSA, 24 (13.6%) were VT-MRSA and 9 (5.1%) exhibited the hVISA phenotype. The presence of hVISA was significant among the VT-MRSA isolates ($p < 0.001$). SCCmec type II and III were the most frequent in VT-MRSA and hVISA, respectively. In VT-MRSA isolates the attendance of SCCmec II was significant ($p = 0.025$). The presence of *agr* group II was significant in VT-MRSA ($p = 0.032$) and hVISA ($p = 0.046$). **Conclusion:** The frequency of VT-MRSA and hVISA among MRSA isolates were considerable in Southern Brazil. Therefore, we suggest that isolates with *agr* II and SCCmec types II or III, that are susceptible to vancomycin in conventional tests, could be associated with treatment failures by vancomycin, maybe because they in fact present reduced vancomycin susceptibility not routinely detected.

Keywords: heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*; molecular typing; vancomycin tolerant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; virulence factors.

Introduction

The pathogenesis of staphylococcal infections is associated with the host characteristics and the expression of various virulence factors, including hemolysins, staphylococcal enterotoxins, toxic shock syndrome toxin - 1 and panton - valentine leucocidin.¹⁻³ Moreover, resistance to several antimicrobials became very important for its pathogenesis. For instance, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is related to important opportunistic nosocomial and community-acquired infections, whereas this resistance is conferred by the *mecA* gene, which is situated on a mobile genetic element, the staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*).⁴⁻⁷

With the advancement of infections caused by MRSA, vancomycin became the main therapeutic option; however, the excessive use of this antimicrobial has led to the emergence of vancomycin-intermediate *S. aureus* (VISA) and heterogeneous VISA (hVISA).^{4,8,9} hVISA is defined as strains with a vancomycin minimum inhibitory concentration (MIC) within the susceptible range ($\text{MIC} \leq 2 \mu\text{g/mL}$), but with a subpopulation of cells in the vancomycin-intermediate range (VISA, $\text{MIC} 4\text{-}8 \mu\text{g/mL}$).⁹⁻¹¹ Infections caused by hVISA and VISA are commonly associated with vancomycin treatment failure, persistent bacteremia, prolonged hospitalization and adverse clinical outcome.^{8,12-14} Furthermore, MRSA strains developed vancomycin tolerance, defined by the minimum bactericidal concentration (MBC) / minimum inhibitory concentration (MIC) ratio of $\geq 32 \mu\text{g/mL}$.^{15,16} Vancomycin-tolerant MRSA (VT-MRSA) infections are more difficult to treat, especially when associated with meningitis, endocarditis, osteomyelitis, and infections in immunocompromised patients.¹⁶ Moreover, the reduced vancomycin susceptibility is associated with dysfunction in the accessory gene regulator (*agr*) locus, a quorum sensing system that controls the expression of genes encoding secreted and cell-associated virulence factors.^{18,19}

The infections caused by MRSA susceptible to vancomycin (MICs 1.5 or 2 µg/mL) have been associated with the increase of vancomycin treatment failures and mortality.^{20,21} In this context, knowing the epidemiology and molecular characteristics of MRSA with reduced vancomycin susceptibility is required to assist in the antimicrobial therapy and control the spread of these multiresistant microorganisms. The aim of this study was to evaluate the frequency of reduced vancomycin susceptibility among MRSA isolates, and correlate with molecular characteristics in MRSA, VT-MRSA and hVISA isolates in Southern Brazil.

Methods

Bacterial isolates

This cross-sectional observational study was conducted with 177 strains of MRSA isolated between 2012 and 2014 from hospitals in Porto Alegre, RS, Brazil. The study was approved by institutional Ethics Committee, with permit number 1.212.043. The strains were isolated from respiratory tract 72 (40.7%), blood 40 (22.6%), skin and soft tissue 39 (22.0%), bone and connective tissue 10 (5.6%), medical devices 9 (5.1%), urine 5 (2.8%), and others sites 2 (1.1%). All isolates were stored at -20 °C until testing.

Antimicrobial susceptibility testing

Antimicrobial susceptibility of the isolates was determined using Kirby-Bauer disk diffusion method according to Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) guidelines.²² The tested antimicrobial agents (DME, São Paulo, Brazil) were clindamycin (2 µg), erythromycin (15 µg), levofloxacin (5 µg), rifampicin (5 µg), teicoplanin (30 µg), tetracycline

(30 µg), and trimethoprim/ sulfamethoxazole (1.25 µg/ 23.75 µg). *S. aureus* strain ATCC 25923 was used as control. Inducible clindamycin resistance, was determined using disk approximation test with erythromycin and clindamycin (D-test) as recommended by CLSI.²²

Determination of vancomycin MIC and MBC

The vancomycin susceptibility of MRSA isolates was determined using the MIC technique via the microdilution method in Mueller-Hinton broth (MHB; Oxoid, Basingstoke, England), according to the CLSI. Several concentrations (0.50 - 128 µg/mL) of vancomycin (Sigma-Aldrich, Poole, UK) were prepared in MHB, and 25 µL of antibiotic sample was loaded into each well of a microplate. For each dilution, 5 µL of a bacterial suspension (1×10^8 CFU/mL) was inoculated and grown at 37°C for 24h. The MIC values for each MRSA isolate were calculated when the bacterial colonies were completely inhibited at the lowest concentration after incubation for 24h. To determine the MBC, 10 µL of the bacterial suspension from the well in which bacterial inhibition occurred, was spread onto Brain Heart Infusion agar (BHIA; Oxoid, Basingstoke, England), incubated for 24h, and analyzed to determine the number of colony forming units. *S. aureus* ATCC 29213 strain was used as control. The data were interpreted according to the guidelines of the CLSI.²²

Identification of vancomycin-tolerant MRSA

The vancomycin tolerance test was performed as previously described by Cázarez-Domínguez et al.¹⁶ Vancomycin tolerance is defined by the minimum bactericidal concentration (MBC) / minimum inhibitory concentration (MIC) ratio of ≥ 32 µg/mL. An MIC test was

performed for each clinical *S. aureus* isolate, followed by the MBC test. *S. aureus* ATCC 29213 strain was used as control.

Screening for hVISA

All MRSA isolates were submitted to a screening test for hVISA in Brain Heart Infusion agar (BHIA; Oxoid, Basingstoke, England) containing 3 µg/mL vancomycin (BHIA-3V)²³ and 6 µg/mL vancomycin (BHIA-6V)²². Briefly, 10 µL of a bacterial suspension (1×10^8 CFU/mL) was spread onto BHIA-3V and incubated for 24h at 37°C. Cultures showed growth after 24 h were confirmed by PAP-AUC. hVISA Mu3 (ATCC 700698) control strain was included in each analysis.

PAP-AUC method

PAP/AUC was performed as described by Huang et al.¹⁴ Briefly, a 0.5 McFarland standard suspension from an overnight culture in Trypticase soy broth (TSB; Oxoid, Basingstoke, England) was prepared. Serial dilutions (10^1 to 10^5) were prepared in sterile saline, and 10 µL from each dilution was spread onto BHI agar plates containing increasing concentrations of vancomycin (0 to 8 µg/mL) and the colonies were counted after 48 h of incubation at 37°C. Calculated CFU/mL values were plotted against vancomycin concentration using program Excel® (Microsoft, Windows 7, Redmond, WA, EUA). VSSA (ATCC 29213), hVISA Mu3 (ATCC 700698) and VISA Mu50 (ATCC 700699) were included as control strains in each analysis. The ratio of the AUC of the test isolate to the AUC of Mu3 was calculated and interpreted as follows: for VSSA, a ratio of < 0.9 ; for hVISA, a ratio of $0.9 - 1.3$; and for VISA, a ratio of ≥ 1.3 .

DNA isolation

All isolates were cultured on blood agar and incubated overnight at 37°C. Genomic DNA was extracted using Chelex[®]100 (Bio-Rad, Richmond, CA) and Proteinase K (Sigma-Aldrich, Poole, UK). DNA samples were stored at -20°C until use.

Detection of virulence genes

The presence of the *hla* (alpha hemolysins), *hld* (delta hemolysins), *sea* (staphylococcal enterotoxins type A), *pvl* (panton - valentine leucocidin) and *tst* (toxic shock syndrome toxin) virulence genes were detected by conventional PCR according to Alfatemi et al.²⁴ *S. aureus* N315 (*hla* and *hld*), *S. aureus* JCSC 4469 (*sea* and *tst*) and *S. aureus* ATCC 14458 (*pvl*) were included as control strains in each assay.

Molecular typing

Multiplex PCR was used to determine the SCC*mec* type (I-X) of all MRSA isolates, according to the method published by Kondo et al²⁵ and Lawung et al²⁶. NCTC 10442 (SCC*mec* type I), N315 (SCC*mec* type II), 85/2082 (SCC*mec* type III), JCSC 4474 (SCC*mec* type IVa), JCSC 2172 (SCC*mec* type IVb), JCSC 4488 (SCC*mec* type IVc), JCSC 4469 (SCC*mec* type IVd), WIS (SCC*mec* type V), HDE 288 (SCC*mec* type VI), JCSC 6082 (SCC*mec* type VII), JCSC 6943 (SCC*mec* type IX) and JCSC 6945 (SCC*mec* type X) were included as control strains in each multiplex PCR. The accessory gene regulator (*agr*) polymorphism was determined by multiplex PCR using a previously described method.²⁷ *S. aureus* COL (*agr* I),

S. aureus N315 (*agr* II), *S. aureus* ATCC 25923 (*agr* III) and *S. aureus* A920210 (*agr* IV) were included as control strains in each analysis.

Statistical analysis

Statistical analyzes were performed using SPSS version 23.0 software (SPSS, Chicago, IL, USA). Chi-square test or Fisher's exact test for categorical variables were used to calculate *p* values. A *p* value of < 0.05 was considered as statistically significant.

Results

Antimicrobial susceptibility

Vancomycin resistance was not observed among the 177 MRSA isolates examined in the present study. All isolates were susceptible to vancomycin, with MIC values of 1 and 2 $\mu\text{g/mL}$. The results showed that 24 (13.6%) of the MRSA were vancomycin tolerant, and 9 (5.1%) exhibited the hVISA phenotype. The VISA phenotype was not detected by PAP-AUC. The presence of hVISA was statistically significant among the VT-MRSA isolates ($p < 0.001$).

The antimicrobial resistance profiles showed low levels of tetracycline resistance 39 (22.0%), followed by trimethoprim/sulfamethoxazole 48 (27.1%), rifampicin 55 (31.1%) and levofloxacin 88 (49.7%). Higher resistance levels were observed for erythromycin 137 (77.4%) and clindamycin 114 (64.4 %). Intermediate resistance levels were verified for levofloxacin 16 (9.0%) e teicoplanin 3 (1.7%). The inducible clindamycin resistance was found in 11 (6.2%) MRSA isolates. Eighty-eight (49.7%) MRSA presented multidrug resistance (MDR, resistant to three or more antimicrobial classes). Significant differences were observed in antimicrobial

resistance to clindamycin, erythromycin, levofloxacin, rifampicin, trimethoprim/sulfamethoxazole, and tetracycline between VT-MRSA and MRSA. Among MRSA isolates, hVISA had significantly higher resistance to rifampicin, trimethoprim/ sulfamethoxazole and tetracycline than non-hVISA (**Table 1**).

Frequency of virulence genes in MRSA

Of 177 MRSA isolates, the most frequent toxin genes were *hld* (90.4%) and *hla* (87.6%), followed by *tst* (27.7%), *pvl* (18.6%), and *sea* (4.5%). There was no significant difference in the presence of virulence genes between MRSA and VT-MRSA, and between hVISA and non-hVISA.

Molecular characteristics

SCC*mec* typing is presented in **Table 2**. None of the isolates showed SCC*mec* types VII and X. Among VT-MRSA, the SCC*mec* II was the most frequent followed by SCC*mec* types III, IV, I and V. The presence of SCC*mec* II in VT-MRSA was significantly higher than in MRSA ($p = 0.025$). Among hVISA isolates, the SCC*mec* III was the most frequent followed by SCC*mec* II, and an isolate of SCC*mec* I and SCC*mec* IV. There was no significant difference in the presence of SCC*mec* between hVISA and non-hVISA.

The majority of MRSA belonged to *agr* group II, followed by *agr* group I and III. *Agr* group IV was not detected (**Table 2**). Twenty-one isolates were untypable by our assay. The presence of *agr* group II was significant in VT-MRSA ($p = 0.032$) and hVISA ($p = 0.046$).

Discussion

Vancomycin is the antimicrobial of choice for the treatment of MRSA infections; however, the excessive use of this glycopeptide has led to the emergence of MRSA with reduced vancomycin susceptibility.^{4,8,9,14} In our results, 13.6% of the MRSA isolates were tolerant of vancomycin, in accordance with findings from other studies.^{15,16} The selection of VT-MRSA strains occurs likely due to exposure to suboptimal concentrations of vancomycin, which explains the rapid development of hVISA and VISA strains^{15,16,20} and the association between VT-MRSA and hVISA. This characteristic may explain the association between VT-MRSA and hVISA found in our data.

In the present study, the PAP-AUC analysis revealed that 5.1% of the MRSA isolates showed the hVISA phenotype. In previous reports, the frequency of the hVISA phenotype has ranged from 0 to 22.1% of MRSA isolates.^{11,14,28-30} The prevalence of hVISA among MRSA varies significantly with the geographic area, source of clinical isolates, and detection methods.^{14,30} There are reports that hVISA and VISA are associated with vancomycin treatment failure, persistent bacteremia (≥ 7 days), prolonged hospitalization and adverse clinical outcome.^{8,12-14}

In this analysis, all MRSA were susceptible to vancomycin, with a MIC range of 1 and 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Several studies have reported an increase in vancomycin treatment failures and mortality with vancomycin susceptible MRSA strains, particularly those with MICs of 1.5 or 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$.^{20,21} Another showed that the efficacy of vancomycin was 78.8% in patients infected for MRSA with MIC of 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, whereas the efficacy was only 30.0% in patients infected for MRSA with MIC of 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$.³¹ Some data suggests an increased incidence of hVISA when vancomycin MIC increases from 1 to 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$.^{8,32}

Epidemiological studies have demonstrated that *SCCmec* IV and V are the most common in community-associated MRSA (CA-MRSA), whereas *SCCmec* I, II, and III predominate in hospital-acquired MRSA (HA-MRSA).^{1,30} The results of our analysis show that *SCCmec* III was the most prevalence molecular types among the MRSA strains, as observed in other research.^{14,29,33} Previous reports demonstrated that *SCCmec* II and III were more prevalent in MRSA with reduced susceptibility to vancomycin.^{16,30} Our results show that the presence of *SCCmec* III was greater than *SCCmec* II among hVISA isolates. These findings corroborate other studies, which presented a higher frequency of the *SCCmec* III than *SCCmec* II in hVISA isolates.^{10,13,29} The presence of other types of *SCCmec* among hVISA isolates such as I¹¹ and IV^{16,34}, had also been reported. This suggests that hVISA is not limited in a typical clone of MRSA.

Regarding *agr* groups, *agr* group II was more frequent among MRSA isolates, as already seen in other analysis.^{5,18,34} Furthermore, some data demonstrated that *agr* group II has been frequently associated with reduced vancomycin susceptibility, as well as failures in the treatment with vancomycin.^{16,33,35} In our results the presence of *agr* group II was high among VT-MRSA and hVISA, which is associated with reduced vancomycin susceptibility.^{19,34,36,37}

In conclusion, the increase of VT-MRSA and hVISA among MRSA isolate has been a challenge in the treatment of staphylococcal infections, because it narrows therapeutic options for their treatment. Therefore, we suggest that isolates with *agr* II and *SCCmec* types II or III, that are susceptible to vancomycin in conventional tests, could be associated with treatment failures by vancomycin, maybe because they in fact present reduced vancomycin susceptibility not routinely detected.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgments

We are grateful for the financial support received from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA). We also thank Rebeca Inhoque and Janira Prichula for technical assistance.

References

1. Yamamoto T, Hung WC, Takano T, Nishiyama A. Genetic nature and virulence of community associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *BioMedicine* 2013; **3**: 2-18.
2. Yu F, Liu Y, Lv J, Qi X, Lu C, Ding Y, et al. Antimicrobial susceptibility, virulence determinant carriage and molecular characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates associated with skin and soft tissue infections. *Braz J Infect Dis* 2015; **19**: 614-22.
3. Kong C, Neoh H, Nathan S. Targeting *Staphylococcus aureus* toxins: a potential form of anti-virulence therapy. *Toxins* 2016; **8**: 72.
4. Casapao AM, Leonard SN, Davis SL, Lodise TP, Patel N, Goff DA, et al. Clinical outcomes in patients with heterogeneous vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* bloodstream infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; **57**: 4252-9.
5. Kang CK, Cho JE, Choi YJ, Jung Y, Kim NH, Kim CJ, et al. *agr* dysfunction affects staphylococcal cassette chromosome *mec* type dependent clinical outcomes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; **59**: 3125-32.
6. Ito T, Kuwahara-Arai K, Katayama Y, Uehara Y, Han X, Kondo Y, et al. Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) analysis of MRSA. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) protocols. *Methods Mol Biol* 2014; **1085**:131-48.
7. Paterson GK, Morgan FJE, Harrison EM, Cartwright EJP, Török ME, Zadoks RN, et al. Prevalence and characterization of human *mecC* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in England. *J Antimicrob Chemother* 2014; **69**: 907-10.
8. Gomes DM, Ward KE, Laplante KL. Clinical implications of vancomycin heteroresistant and intermediately susceptible *Staphylococcus aureus*.

- Pharmacotherapy* 2015; **35**: 424-32.
9. Koh YR, Kim KH, Chang CL, Yi J. Prevalence and clinical impact of heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* isolated from hospitalized patients. *Ann Lab Med* 2016; **36**: 235-43.
 10. Lin SY, Chen TC, Chen FJ, Chen YH, Lin YI, Siu LK, et al. Molecular epidemiology and clinical characteristics of hetero-resistant vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* bacteremia in a Taiwan Medical Center. *J Microbiol Immunol Infect* 2012; **45**: 435-41.
 11. Silveira ACO, Cunha GR, Caierão J, Cordova CMM, Azevedo PA. Molecular epidemiology of heteroresistant vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in Brazil. *Braz J Infect Dis* 2015; **19**: 466-72.
 12. Di Gregorio S, Perazzi B, Ordonez AM, De Gregorio S, Foccoli M, Lasala MB, et al. Clinical, microbiological, and genetic characteristics of heteroresistant vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* bacteremia in a teaching hospital. *Microb Drug Resist* 2015; **21**: 25-34.
 13. Hu HC, Kao KC, Chiu LC, Chang CH, Hung CY, Li LF, et al. Clinical outcomes and molecular typing of heterogenous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* bacteremia in patients in intensive care units. *BMC Infect Dis* 2015; **15**: 444.
 14. Huang SH, Chen YC, Chuang YC, Chiu SK, Fung CP, Lu PL, et al. Prevalence of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) and heterogeneous VISA among methicillin-resistant *S. aureus* with high vancomycin minimal inhibitory concentrations in Taiwan: A multicenter surveillance study, 2012 – 2013. *J Microbiol Immunol Infect* 2015; **1**: 1-7.
 15. Rose WE, Fallon M, Moran JJM, Joshua P, Vanderloo JP. Vancomycin tolerance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: influence of vancomycin, daptomycin, and

- telavancin on differential resistance gene expression. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; **56**: 4422-7.
16. Cázares-Domínguez V, Cruz-Córdova A, Ochoa SA, Escalona G, Arellano-Galindo J, Rodríguez-Leviz A, et al. Vancomycin tolerant, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* reveals the effects of vancomycin on cell wall thickening. *PLoS One* 2015; **10**: e0118791.
 17. Stryjewski ME, Corey GR. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an evolving pathogen. *Clin Infect Dis* 2014; **58**: S10-9.
 18. Cázares-Domínguez V, Ochoa SA, Cruz-Córdova A, Rodea GE, Escalona G, Olivares AL, et al. Vancomycin modifies the expression of the *agr* system in multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *Front Microbiol* 2015; **6**: 369.
 19. Bibalan MH, Shakeri F, Javid N, Ghaemi A, Ghaemi EA. Accessory gene regulator types of *Staphylococcus aureus* isolated in Gorgan, North of Iran. *J Clin Diagn Res* 2014; **8**: DC07-9.
 20. Van Hal SJ, Lodise TP, Paterson DL. The clinical significance of vancomycin minimum inhibitory concentration in *Staphylococcus aureus* infections: a systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2012; **54**: 755-71.
 21. Jacob JT, Diazgranados CA. High vancomycin minimum inhibitory concentration and clinical outcomes in adults with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: a meta-analysis. *Int J Infect Dis* 2013; **17**: e93-e100.
 22. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-fourth informational supplement. Document M100-S24. Wayne, PA: CLSI; 2015. p.124-39
 23. Riederer K, Shemes S, Chase P, Musta A, Mar A, Khatib R. Detection of intermediately vancomycin-susceptible and heterogeneous *Staphylococcus aureus* isolates:

- comparison of etest and agar screening methods. *J Clin Microbiol* 2011; **49**: 2147-50.
24. Alfatemi SMH, Motamedifar M, Hadi N, Saraie HSE. Analysis of virulence genes among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains. *Jundishapur J Microbiol* 2014; **7**: e107412
25. Kondo Y, Ito T, Ma XX, Watanabe S, Kreiswirth BN, Etienne J, et al. Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome *mec* type assignment: rapid identification system for *mec*, *ccr*, and major differences in junkyard regions. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; **51**: 264-74.
26. 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 Microbiol Methods* 2014; **107**: 8-12.
27. Wu D, Li X, Yang Y, Zheng Y, Wang C, Deng L, et al. Superantigen gene profiles and presence of exfoliative toxin genes in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from Chinese children. *J Med Microbiol* 2011; **60**: 35-45.
28. Hanaki H, Cui L, Ikeda-Dantsuji Y, Nakae T, Honda J, Yanagihara K, et al. Antibiotic susceptibility survey of blood-borne MRSA isolates in Japan from 2008 through 2011. *J Infect Chemother* 2014; **20**: 527-34.
29. Liu C, Chen ZJ, Sun Z, Feng X, Zou M, Cao W, et al. Molecular characteristics and virulence factors in methicillin-susceptible, resistant, and heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* from central-southern China. *J Microbiol Immunol Infect* 2015; **48**: 490-6.
30. Zhang S, Sun X, Chang W, Dai Y, Ma X. Systematic review and meta-analysis of the epidemiology of vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-

- intermediate *Staphylococcus aureus* isolates. *PLoS ONE* 2015; **10**: e0136082.
31. Takesue Y, Nakajima K, Takahashi Y, Ichiki K, Ishihara M, Wada Y, et al. Clinical characteristics of vancomycin minimum inhibitory concentration of 2 µg/ml methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients with bacteremia. *J Infect Chemother* 2011; **17**: 52-7.
 32. Chen H, Liu Y, Sun W, Chen M, Wang H. The incidence of heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* correlated with increase of vancomycin MIC. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011; **71**: 301-3.
 33. Cechinel A, Machado DP, Turra E, Pereira D, Santos RD, Rosa RG, et al. Association between accessory gene regulator polymorphism and mortality among critically ill patients receiving vancomycin for nosocomial MRSA bacteremia: a cohort study. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 2016; **2016**: 1-5.
 34. Hu J, Ma XX, Tian Y, Pang L, Cui LZ, Shang H. Reduced vancomycin susceptibility found in methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* clinical isolates in Northeast China. *PLoS ONE* 2013; **8**: e73300.
 35. Park MJ, Kim HS, Kim HS, Kim JS, Song W, Kim MY, et al. Accessory gene regulator polymorphism and vancomycin minimum inhibitory concentration in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Ann Lab Med* 2015; **35**: 399-403.
 36. Azimian A, Havaei SA, Fazeli H, Naderi M, Ghazvini K, Samiee SM, et al. Genetic characterization of a vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate from the respiratory tract of a patient in a university hospital in Northeastern Iran. *J Clin Microbiol* 2012; **50**: 3581-5.
 37. Bibalan MH, Shakeri F, Javid N, Ghaemi EA. Study the association of accessory gene regulator types and methicillin resistance/ sensitivity of *Staphylococcus aureus* isolated in Gorgan, Iran. *Infect Epidemiol Med* 2016; **2**: 1-4.

Table 1 Antimicrobial resistance rates of VT-MRSA and hVISA among MRSA isolates

Antimicrobial agents	MRSA (n=153)	VT-MRSA (n=24)	p*	Non-hVISA (n=168)	hVISA (n=9)	p*
Clindamycin	91 (59.5%)	23 (95.8%)	0.002	106 (63.1%)	8 (88.9%)	0.133
Erythromycin	113 (73.9%)	24 (100.0%)	0.003	128 (76.2%)	9 (100.0%)	0.096
Levofloxacin	68 (44.4%)	20 (83.3%)	0.003	80 (47.6%)	8 (88.9%)	0.053
Rifampicin	37 (24.2%)	18 (75.0%)	<0.001	47 (28.0%)	8 (88.9%)	<0.001
Trimethoprim/sulfamethoxazole	30 (19.6%)	18 (75.0%)	<0.001	40 (23.8%)	8 (88.9%)	<0.001
Tetracycline	22 (14.4%)	17 (70.8%)	<0.001	31 (18.5%)	7 (77.8%)	<0.001
Teicoplanin	0%	0%	-	0%	0%	-

MRSA = methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; VT-MRSA = vancomycin tolerant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; hVISA = heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*.

* Chi-square test or Fisher's exact test.

Table 2 Molecular typing at the MRSA, VT-MRSA and hVISA isolates.

Molecular typing	MRSA (n=177)	VT-MRSA (n= 24)	hVISA (n=9)
<i>SCCmec</i> type			
I	21 (11.9%)	3 (12.5%)	1 (11.1%)
II	36 (20.3%)	10 (41.7%)	2 (22.2%)
III	54 (30.5%)	5 (20.8%)	5 (55.6%)
IV	49 (27.7%)	4 (16.7%)	1 (11.1%)
V	6 (3.4%)	2 (8.3%)	0%
VI	1 (0.6%)	0%	0%
VII	0%	0%	0%
IX	1 (0.6%)	0%	0%
X	0%	0%	0%
2/ +	9 (5.1%)	0%	0%
<i>agr</i> group			
I	48 (27.1%)	7 (29.2%)	2 (22.2%)
II	62 (35.0%)	14 (58.3%)	6 (66.6%)
III	39 (22.0%)	3 (12.5%)	1 (11.1%)
IV	0%	0%	0%
2/+	7 (4.0%)	0%	0%
NT	21 (11.9%)	0%	0%

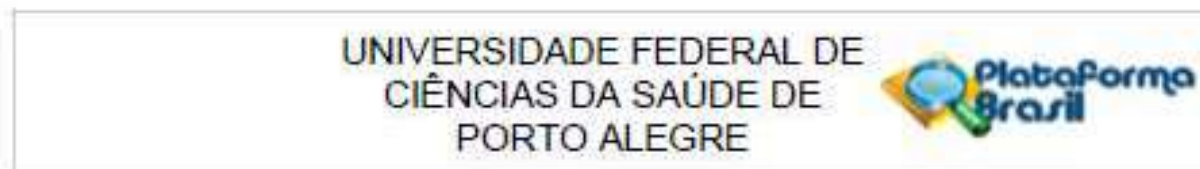
MRSA = methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; VT-MRSA = vancomycin tolerant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; hVISA = heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*; *SCCmec* = staphylococcal cassette chromossome *mec*; *agr* = accessory gene regulator.

7 CONCLUSÕES

- As taxas de tolerância e heterorresistência à vancomicina entre os isolados de MRSA foram semelhantes às encontradas em outros estudos. Além disso, a presença de heterorresistência à vancomicina foi significativa entre os isolados de VT-MRSA.
- A não susceptibilidade a tetraciclina, sulfametoxazol-trimetoprima, rifampicina e levofloxacino foi consideravelmente baixa. E altas taxas de resistência foram observadas para eritromicina e clindamicina. Entre os isolados de hVISA foi observado uma significativa resistência para rifampicina, sulfametoxazol-trimetoprima e tetraciclina.
- Quanto a tipagem do elemento *SCCmec*, o *SCCmec* do tipo II e III foram predominantes entre os isolados de MRSA e hVISA. Além disso, também foi verificado uma presença significativa do *SCCmec* do tipo II entre os isolados de VT-MRSA.
- Quando analisado o polimorfismo do gene regulador acessório, a presença do *agr* tipo II foi predominante entre os MRSA, VT-MRSA e hVISA, sendo significativa em MRSA com reduzida susceptibilidade à vancomicina (VT-MRSA e hVISA).
- A frequência dos genes de virulência *hla* (alfa-hemolisina) e *hld* (delta-hemolisina) foi consideravelmente alta entre os isolados de MRSA. Em contrapartida, baixas taxas foram observadas para a presença dos genes *sea* (enterotoxina estafilocócica A), *pvl* (leucocidina de Panton-Valentine) e *tst* (toxina da síndrome do choque tóxico).

8 ANEXOS

8.1 Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UFCSPA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo do potencial patogênico e perfis de resistência de *Staphylococcus aureus* isolados em Porto Alegre, RS, Brasil.

Pesquisador: Pedro Alves d'Azevedo

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 47891115.7.0000.5345

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

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.212.043

Apresentação do Projeto:

Projeto de dissertação de mestrado junto ao PPG-Ciências da Saúde

Objetivo da Pesquisa:

Caracterizar isolados de *Staphylococcus aureus* em relação a sua resistência à meticilina e sua resistência heterogênea à vancomicina.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não apresenta riscos. Benefícios: maior conhecimento a cerca do microorganismo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Adequado e pertinente

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

De acordo

Recomendações:

Aprovação

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovação

8.2 Trabalhos apresentados em eventos científicos

- VIII Simpósio Brasileiro de Microbiologia Aplicada [UFRGS, Porto Alegre, RS]

Resumo: Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) isolados a partir de origens clínicas diversas, em hospitais de Porto Alegre, RS, Brasil.

Adriana Medianeira Rossato, Gustavo Sambrano, Keli Cristine Reiter, Renata Soares, Thiago Galvão Paim, Pedro Alves D'azevedo.

- XV Congresso Brasileiro de Biomedicina e III Congresso Internacional de Biomedicina [ABBM, Bento Gonçalves, RS]

Resumo: Avaliação de tolerância à vancomicina em *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina.

Nathalia Martins, Adriana Medianeira Rossato, Gustavo Sambrano, Keli Cristine Reiter, Neidimar Cezar Corrêa Tolfo, Renata Soares, Thiago Galvão Paim, Pedro Alves d' Azevedo.

- II Mostra de Trabalhos de Ensino, Pesquisa e Extensão da UFCSPA [UFCSPA, Porto Alegre, RS]

Resumo: Detecção de heterorresistência à vancomicina em *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina.

Nathalia Martins, Adriana Medianeira Rossato, Gustavo Sambrano, Renata Soares, Thiago Galvão Paim, Pedro Alves d' Azevedo.

- IX Simpósio Brasileiro de Microbiologia Aplicada [UFRGS, Porto Alegre, RS]

Resumo: Tipagem molecular de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina com reduzida susceptibilidade à vancomicina.

Adriana Medianeira Rossato, Nathalia Dalsóglio Martins, Renata Oliveira Soares, Gustavo Enck Sambrano, Thiago Galvão da Silva Paim, Pedro Alves d' Azevedo.

- IX Simpósio Brasileiro de Microbiologia Aplicada [UFRGS, Porto Alegre, RS]

Resumo: Detecção de genes de virulência em *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina.

Nathalia Dalsóglio Martins, Adriana Medianeira Rossato, Renata Oliveira Soares, Gustavo Enck Sambrano, Thiago Galvão da Silva Paim, Pedro Alves d' Azevedo.

- IX Simpósio Brasileiro de Microbiologia Aplicada [UFRGS, Porto Alegre, RS]

Resumo: Avaliação perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos em isolados clínicos de hVISA.

Cezar Vinícius Würdig Riche, Adriana Medianeira Rossato, Cícero Armídio Gomes Dias, Pedro Alves d' Azevedo

8.3 Normas para publicação *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*

Some molecular characteristics of vancomycin-susceptible *Staphylococcus aureus* could help to detect failure treatments due to reduced vancomycin susceptibility. Foi submetido à revista *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, cujas as normas para a publicação estão disponíveis no seguinte link:

<https://www.elsevier.com/journals/journal-of-microbiology-immunology-and-infection/1684-1182/guide-for-authors>