



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

ANÁLISE DE TOLERÂNCIA E PERSISTÊNCIA DE *Staphylococcus aureus* INDUZIDOS POR VANCOMICINA

JÉSSICA DE CÁSSIA TEIXEIRA BIRRO

VITÓRIA
2019

JÉSSICA DE CÁSSIA TEIXEIRA BIRRO

ANÁLISE DE TOLERÂNCIA E PERSISTÊNCIA DE *Staphylococcus aureus* INDUZIDOS POR VANCOMICINA

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Kênia Valéria dos Santos

VITÓRIA
2019

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de
Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

D278a de Cássia Teixeira Birro, Jéssica, 1992-
Análise de tolerância e persistência de *Staphylococcus aureus*
induzidos por vancomicina / Jéssica de Cássia Teixeira Birro. -
2019.
112 f. : il.

Orientadora: Kênia Valéria dos Santos.
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da
Saúde.

1. Microbiologia. 2. Agentes anti-infecciosos. 3. Testes de
sensibilidade bacteriana. 4. Bactérias gram-positivas. I. Valéria
dos Santos, Kênia. II. Universidade Federal do Espírito Santo.
Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 615.1

Jéssica de Cássia Teixeira Birro

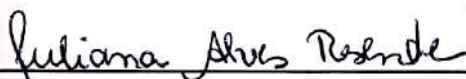
**ANÁLISE DE TOLERÂNCIA E PERSISTÊNCIA
DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* INDUZIDOS
POR VANCOMICINA**

Trabalho de Dissertação de Mestrado aprovado em 26/08/2019 para obtenção
do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, área de concentração Ciências
Farmacêuticas, da Universidade Federal do Espírito Santo

BANCA EXAMINADORA:



Prof^a. Dr^a. Gabriella Freitas Ferreira / UFJF



Prof^a. Dr^a. Juliana Alves Resende / UFES



Prof^a. Dr^a. Kênia Valéria dos Santos (orientadora) / UFES

Vitória/ES

2019

*Dedico este trabalho a Deus, porque Dele,
por Ele e para Ele são todas as coisas.*

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me sustentado até aqui, por me dar forças, saúde, ânimo e coragem para a finalização deste trabalho.

Aos meus pais, William e Jussara, e meu irmão, Matheus, pelo amor incondicional, por não me deixar desanimar frente às adversidades, pelo esforço em compreender minhas ausências e apoiar minhas decisões.

À minha orientadora, Prof.^a Kênia, por ter me aceitado para esta pesquisa, por me acompanhar desde a graduação e por acreditar em mim desde a primeira iniciação científica. Mais do que orientadora deste trabalho, me incentivou com otimismo, me deu suporte, compreendeu minhas dificuldades e me direcionou sempre que necessário. Obrigada pelos ensinamentos que levarei para a vida!

Aos membros da banca examinadora por aceitarem o convite, à Gabriella Freitas Ferreira (UFJF) e à Juliana Alves Resende (UFES – Campus Alegre), pela disponibilidade e contribuições para este estudo.

Agradeço a todos que contribuíram com essa pesquisa, em especial, às professoras Ana Paula Ferreira (UFES) e Sarah Gonçalves (UFES) pelos conselhos e pelos ensinamentos; à Gabriella Freitas Ferreira (UFJF), à Ana Cristina Gales (UNIFESP) e ao Rodrigo Cayô (UNIFESP) que gentilmente cederam espaço em seu laboratório, pelo conhecimento compartilhado e por terem prestado assistência durante todo o período em seus laboratórios.

Aos que torcem por mim, em especial, à Angélica Meriguete, à Brena Ramos, à Juliana Rodrigues, ao Rodrigo Altoé, ao Ronaldo Mendes, à Camila Schimidel e ao Bruno Siqueira, que compreenderam minhas limitações e me motivaram a persistir. Obrigada a todos pelo companheirismo, pela preocupação e por todo apoio.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade; aos colegas de mestrado, em especial, Jéssyca Dutra e Milena Bittencourt, pelo auxílio

nos momentos difíceis e por compartilharem do mesmo sonho; aos professores do programa que em sua maioria fizeram parte da minha formação durante a graduação e me incentivaram a seguir os passos científicos, em especial, Prof.^a Rita de Cássia Gonçalves, pelo exemplo de profissional e pelas palavras de incentivo que me fizeram buscar este sonho; e aos técnicos, em especial, à Daina pelo suporte ao longo dos experimentos.

Aos colegas de laboratório por todo apoio e aprendizado, em especial, as alunas de iniciação científica Bianca Bastos, Polyanna Caliri e Ludmilla Casagrande que participaram ativamente dos ensaios deste trabalho.

À Universidade Federal do Espírito Santo pela oportunidade de desenvolver essa pesquisa e pelo amadurecimento profissional e pessoal. Tenho muito orgulho de ter sido fruto desta instituição.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pesquisa de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) pelo apoio financeiro.

A todos que fizeram parte deste sonho,

Muito obrigada!

“Quando o mundo estiver unido na busca do conhecimento, e não mais lutando por dinheiro e poder, então nossa sociedade poderá enfim evoluir a um novo nível.”

Thomas Jefferson

RESUMO

Introdução: As linhagens sensíveis de *Staphylococcus aureus* com susceptibilidade reduzida à vancomicina (VAN) têm atraído a atenção de pesquisadores, principalmente nas últimas décadas, devido à relação com episódios de falha terapêutica e recidiva de infecções. As estratégias de sobrevivência microbiana em linhagens sensíveis são denominadas tolerância e persistência capazes de alterar transitoriamente o metabolismo de parte da população na presença de antimicrobianos bactericidas como forma de escape. Portanto, o objetivo deste estudo foi investigar se diferentes concentrações de vancomicina são capazes de induzir tolerância ou persistência em *S. aureus*. **Materiais e métodos:** Cinco linhagens de *S. aureus* foram expostas de forma intermitente a 10 µg/mL de VAN durante 6 h. Além disso, uma linhagem foi escolhida para ser exposta à 100 µg/mL de VAN por 6 h. Selecionaram-se as linhagens derivadas da ATCC 29213 (parental), E10.6 e E100, para dar continuidade aos ensaios. Confirmou-se o grau de pureza das linhagens derivadas por MALDI-TOF MS e por padrão de similaridade genética por PFGE. Em seguida, caracterizou-se tolerância/persistência a partir da susceptibilidade por determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) para VAN e ensaio de disco difusão modificado com VAN, oxacilina (OXA) e ciprofloxacino (CIP). Esses ensaios foram confirmados por ensaio de curva de morte com 50 µg/mL de VAN e, por fim, foram avaliadas as alterações fenotípicas de velocidade de crescimento, percentual de autólise em Triton X-100, nível de TBARS e potencial Zeta. **Resultados:** Todas as linhagens não alteraram o quantitativo de células viáveis quando expostas à 10 µg/mL de VAN. Para a ATCC 29213, nem mesmo 100 µg/mL de VAN foram suficientes para eliminar completamente a população. As linhagens E10.6 e E100, tiveram sua identidade confirmada, descartando qualquer contaminação. Nenhuma linhagem derivada apresentou alteração de susceptibilidade, porém a razão CBM/CIM foi menor que 32 para todas as linhagens. A linhagem parental e suas derivadas E10.6 e E100 apresentaram alto nível de tolerância/persistência para OXA e CIP ($p > 0,05$), porém esse ensaio não foi viável para VAN. Em 6 h, a linhagem E10.6 apresentou o mesmo MDK₉₉ que a linhagem parental, sendo igual a 3 h em fase exponencial e a 6 h em fase estacionária. Em contrapartida, o MDK_{99,99} foi de 6 h em fase exponencial e maior que 6 h para ambas as linhagens em fase estacionária. Quanto às alterações

fenotípicas, foram observadas alterações discretas na fase adaptativa apenas nas em 0,25 µg/mL e 0,5 µg/mL de VAN. A partir de 1 µg/mL de VAN não foi observado crescimento. Os níveis de TBARS foram aumentados para o grupo tratado com VAN, bem como os percentuais de autólise por Triton X-100, enquanto a carga superficial de membrana tornou-se mais negativa (todos com $p < 0,05$). **Conclusões:** O tratamento com diferentes concentrações de VAN não altera a contagem de viáveis, bem como não altera os níveis de tolerância/persistência para VAN, OXA e CIP. Todavia, é capaz de elevar os níveis de peroxidação lipídica e o percentual de autólise, enquanto reduz a carga de superfície nas linhagens parental e derivadas E10.6 e E100.

Palavras-chave: *S. aureus*. Vancomicina. Sobrevivência microbiana. Persistência a antimicrobianos.

ABSTRACT

Introduction: *Staphylococcus aureus* lineages with reduced susceptibility to vancomycin (VAN) gained attention researchers due to its relation between therapeutic fails and recalcitrance. Microbial survival strategies are denominated tolerance and persistence, they are able to change transiently the metabolism of a sub population exposed to bactericidal antibiotics. So, in this study we investigated if different concentrations of vancomycin are able to induce tolerance or persistence in *S. aureus*. **Materials and methods:** Five lineages of *S. aureus* were intermittently exposed to 10 µg/mL of VAN by 6 h. They were selected derivative lineages of ATCC 29213 (parental), E10.6 and E100, to continue the assays. They were confirmed the purity of derivative lineages by MALDI-TOF MS and similarity genetic by PFGE. After, they were characterized tolerance/persistence from susceptibility by minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) for VAN and modified disk diffusion test with VAN, oxacillin (OXA) and ciprofloxacin (CIP). Those assays were confirmed by time-kill curve with 50 µg/mL of VAN and, in the end, they analysed the phenotypic changes in growth taxa, autolysis percentual in Triton X-100, TBARS levels and Zeta potential. **Results:** All lineages did not change the viable cells quantitative when exposed to 10 µg/mL of VAN. For ATCC 29213, even though 100 µg/mL of VAN were sufficient to eradicate the population. No one derivative lineage changes in the susceptibility, but MBC/MIC ratio was smaller than 32 for all lineages. The parental lineage and its derivatives E10.6 and E100 showed high level to tolerance/persistence for OXA and CIP ($p > 0,05$), although this assay was not viable to VAN. In 6 h, E10.6 lineage showed the same MDK₉₉ than parental lineage, being equal to 3 h in exponential phase and to 6 h in stationary phase. In contrast, for both lineages the MDK_{99,99} was 6 h in exponential phase and bigger than 6 h in stationary phase. Little changes in adaptive phase were observed only in 0,25 µg/mL and 0,5 µg/mL of VAN. From 1 µg/mL of VAN it was not observed growth. TBARS levels were increased for the treated group with VAN, as well as the autolysis percentuals, while the membrane superficial charge has become more negative ($p > 0,05$ for all). **Conclusions:** The treatment with different concentrations of VAN do not change viable counting, as well as do not change the tolerance/persistence levels for VAN, OXA and CIP. Although, it is able to increase the lipidic peroxidation levels and

autolysis percentual, while reduce the surface charge in parental and derivative lineages.

Key words: *Staphylococcus aureus*. Vancomycin. Microbial survival. Antibiotic persistence.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma de caracterização fenotípica e molecular de <i>S. aureus</i>	44
Figura 2 - Esquema de ajuste de inóculo bacteriano a 10^4 UFC/mL em espectrofotômetro	47
Figura 3 - Esquema de caracterização do perfil de crescimento da linhagem ATCC® 29213™	48
Figura 4 - Esquema de exposição de <i>S. aureus</i> à vancomicina	49
Figura 5 - Microdiluição em caldo para vancomicina em faixa de concentração de 0,125 – 32,0 µg/mL	51
Figura 6 - Esquema de avaliação de susceptibilidade a partir da concentração inibitória mínima (CIM)	52
Figura 7 - Esquema de ensaio de disco difusão modificado	58
Figura 8 - Curva de crescimento da linhagem parental ATCC 29213	64
Figura 9 - Gráfico da linhagem parental ATCC 29213 em fase <i>log</i> de crescimento .	66
Figura 10 - Efeito de vancomicina sobre o número de células viáveis de <i>S. aureus</i> após 6 horas de exposição	66
Figura 11 - Cultivos das linhagens derivadas após exposição intermitente à 10 µg/mL vancomicina	57
Figura 12 - Cultivos da linhagem derivada após 6 horas de exposição à em 100 µg/mL vancomicina	68
Figura 13 - Padrão de bandas da linhagem parental ATCC 29213 e da linhagem derivada E10.6, em gel de agarose em cuba de eletroforese por campo pulsado....	70
Figura 14 - Curva de crescimento, densidade óptica em comprimento de onda de 600 nm (DO_{600}) <i>versus</i> tempo (h), para a linhagem parental ATCC 29213 e suas derivadas E10.6 e E100	71
Figura 15 - Curvas de crescimento das linhagens derivadas E10.6 e E100 e da linhagem parental ATCC 29213 sob pressão seletiva	72
Figura 16 - Diferenças de diâmetro de halo de inibição (mm) antes e após a retirada dos discos de antimicrobianos ($T_{72} - T_{24}$), ciprofloxacino e oxacilina, para a linhagem parental ATCC 29213 e as derivadas E10.6 e E100	75

Figura 17 - Cinética de morte das linhagens ATCC 29213 e derivada E10.6 em 50 µg/mL de vancomicina (50 µg/mL) em fase estacionária (A) e na fase exponencial (B) durante 6 horas.....	76
Figura 18 - Colônias com fenótipo regular em (A) e com fenótipo alterado (<i>Small colony variants</i>) em (B) crescidas em ágar BHI após exposição à vancomicina	77
Figura 19 - Peroxidação lipídica da linhagem parental ATCC 29213 e evoluída E10.6	78
Figura 20 - Atividade autolítica de Triton X-100 sobre as linhagens parental ATCC 29213, derivadas (E10.6 e E100) e Mu3 (hVISA).....	79
Figura 21 - Carga de superfície determinada por medida de potencial Zeta (z/mV) da linhagem parental ATCC 29213 e evoluída E10.6.....	80

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Crescimento de colônias após a retirada do disco contendo oxacilina 2,5 µg (A) E10.6, (B) E100 e (C) ATCC 29213.....73

Quadro 2 - Crescimento de colônias após a retirada do disco contendo ciprofloxacino 5,0 µg (A) E10.6, (B) E100 e (C) ATCC 29213.....74

Quadro 3 - Crescimento de colônias após a retirada do disco contendo vancomicina 2,5 µg (A) E10.6, (B) E100 e (C) ATCC 29213.....108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Linhagens de <i>S. aureus</i> incluídas no estudo.....	42
Tabela 2 - Identificação de microrganismos de acordo com os pontos de corte para a técnica de MALDI-TOF MS	53
Tabela 3 - Pontos de corte para a classificação dos níveis de tolerância/persistência	58
Tabela 4 - Valores de CIM e CBM, após exposição à vancomicina (10 µg/mL), e razão CBM/CIM das linhagens derivadas.	69
Tabela 5 - Identificação da linhagem parental ATCC 29213 e das linhagens derivadas baseada nos valores de <i>score</i> por espectroscopia de massas por MALDI-TOF.....	70
Tabela 6 - Dados para o cálculo do volume final das soluções estoque	107

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Agr – *Acessory Gene Regulator*

ATCC - *American Type Culture Collection*

ATP – Adenosina trifosfato

ATS - *American Thoracic Society*

AUC – Área sob a curva (do inglês, *Area Under the Curve*)

BHI – *Broth Heart Infusion*

BioMA-lab – Laboratório de Biologia de Microrganismos e Antimicrobianos

CAMHB – Mueller Hinton ajustado com cátions

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CBM – Concentração Bactericida Mínima

CC – Controle de crescimento

CE – Controle de esterilidade

CDC – *Centers for Disease Control and Prevention*

CIM – Concentração Inibitória Mínima

ClpP – Clp protease dependente de ATP

CLSI – *Clinical and Laboratory Standard Institute*

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Da – Dalton

D-ALA – D-alanina

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DO – Densidade óptica

DO₂₄ – Densidade óptica em 24 h

DO₆₀₀ – Densidade óptica em comprimento de onda de 600 nm

EUA – Estados Unidos da América

FAPES – Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo

g – força G

h – Hora

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

HCl – Ácido clorídrico

hVISA – *Staphylococcus aureus heteroresistente*

ISDA – *Infectious Diseases Society of America*

k – Taxa média de crescimento

Lag – Fase adaptativa

LB – Luria Bertani

Log – fase exponencial

Log₁₀ – Logaritmo na base 10

µg - Micrograma

µL – Microlitro

µm – Micrometro

MALDI-TOF MS – *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry*

MDA - Malonaldeído

MDK – Tempo mínimo de morte (do inglês, *Minimum Duration for Killing*)

MDK₉₉ - Tempo mínimo de morte para eliminar 99% da população

MDK_{99,99} - Tempo mínimo de morte para eliminar 99,99% da população

mg – Miligrama

MH – Mueller Hinton

mid-log – Metade da fase exponencial

mL - Mililitro

MRSA – *Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina

MSSA – *Staphylococcus aureus* Sensível à Meticilina

NaCl – Cloreto de sódio

nm – Nanômetro

nmol - Nanomol

OMS – Organização Mundial de Saúde

p – Probabilidade de significância

PASH - *Persistence As Stuff Happens*

PBP – Proteína ligadora de penicilina, do inglês *Protein Binding Penicillin*

PFGE – Eletroforese em Campo Pulsado (do inglês, *Pulsed-field Gel Electrophoresis*)

ppGpp – Tetrafosfato de guanosina

pppGpp – Pentafosfato de guanosina

PZ – Potencial Zeta

® - Marca registrada

R² – Coeficiente de correlação linear

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio

Rpm - Rotações por minuto

SCCmec – *Staphylococcal Cassette Chromosome mec*

SCV – *Small Colony Variants*

SOD – Superóxido dismutase

™ - *Trade Mark*

t_d – Tempo de geração

T_0 – Tempo zero

TA – Taxa de autólise

TBARS - *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*

TSA – *Tryptic Soya Agar*

TSB – *Tryptic Soy Broth*

VAN – Vancomicina

VISA – *Staphylococcus aureus* com resistência intermediária à vancomicina

VRSA – *Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina

VSSA – *Staphylococcus aureus* sensível à vancomicina

UFC – Unidade Formadora de Colônia

UFES – Universidade Federal do Espírito Santo

UFJF – Universidade Federal de Juiz de Fora

UNIFESP – Universidade Federal de São Paulo

UTI – Unidade de Tratamento Intensivo

x – vezes

°C – graus Celsius

% - por cento

> - maior

< - menor

≥ - maior que ou igual a

≤ - menor que ou igual a

= - igual

≈ - aproximadamente

WT – Linhagem parental (do inglês, *Wild-type*)

WHO – *World Health Organization*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	22
REVISÃO DE LITERATURA	24
1.1 <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> : GENERALIDADES DO PATÓGENO	24
1.2 FATORES DE VIRULÊNCIA E PATOGÊNESE DA INFECÇÃO ESTAFILOCÓCICA.....	25
1.3 RELEVÂNCIA CLÍNICA DE <i>S. AUREUS</i> E ASPECTOS DA RESISTÊNCIA À VANCOMICINA	27
1.4 FALHA TERAPÊUTICA ASSOCIADA À TERAPIA EMPÍRICA COM VANCOMICINA	30
1.4.1 <i>Aspectos da vancomicina como terapia empírica</i>	30
1.4.2 <i>S. aureus com susceptibilidade reduzida à vancomicina</i>	32
1.4.3 <i>Capacidade adaptativa de S. aureus</i>	34
1.5. PERSISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS COMO ESTRATÉGIA ADAPTATIVA	36
1.5.1 <i>Tolerância e persistência em S. aureus</i>	38
1.5.2 <i>Métodos de detecção para persistência e tolerância</i>	40
2 JUSTIFICATIVA	42
3 OBJETIVOS	44
3.1 GERAL.....	44
3.2 ESPECÍFICOS	44
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
4.1 AMOSTRAS DO ESTUDO E ANTIMICROBIANOS	45
4.2 DESENHO EXPERIMENTAL	46
4.3 PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO BACTERIANO	49
4.4 PERFIL DE CRESCIMENTO DA LINHAGEM PARENTAL	50
4.5 ENSAIO DE EXPOSIÇÃO À VANCOMICINA	51
4.6 ENSAIOS DE SUSCEPTIBILIDADE À VANCOMICINA	53
4.6.1 <i>Determinação dos valores de CIM</i>	53
4.6.2 <i>Determinação dos valores de CBM</i>	54
4.7 CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL PROTEICO POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS ASSOCIADA A MALDI-TOF	55
4.8 PADRÃO CLONALIDADE POR ELETROFORESE DE CAMPO PULSADO	57
4.9 PERFIL DE CRESCIMENTO DAS LINHAGENS DERIVADAS	58
4.10 PERFIL DE CRESCIMENTO DAS LINHAGENS DERIVADAS SOB PRESSÃO SELETIVA DE VANCOMICINA	59
4.11 PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO DE DISCO DISUFÃO MODIFICADO	60
4.11.1 ENSAIO DE DISCO DIFUSÃO MODIFICADO	60
4.12 ENSAIO DE CURVA DE MORTE	62
4.12.1 <i>Curva de morte em fase estacionária</i>	62
4.12.2 <i>Curva de morte em fase exponencial</i>	63

4.13 AJUSTE DE INÓCULO PARA OS ENSAIOS DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA, POTENCIAL ZETA DE MEMBRANA E AUTÓLISE POR TRITON X-100	63
4.13.1 <i>Ensaio de peroxidação lipídica</i>	64
4.13.2 <i>Determinação do potencial Zeta de membrana</i>	65
4.13.3 <i>Ensaio de autólise por Triton X-100</i>	65
4.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA	66
5 RESULTADOS	67
5.1 PERFIL DE CRESCIMENTO DA LINHAGEM PARENTAL	67
5.2 ENSAIO DE EXPOSIÇÃO À VANCOMICINA	69
5.3 ENSAIO DE SUSCEPTIBILIDADE À VANCOMICINA	71
5.4 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS ACOPLADO À ANALISADOR DE TEMPO DE VÔO	72
5.5 PADRÃO DE CLONALIDADE POR ELETROFORESE EM GEL DE CAMPO PULSADO	73
5.6 PERFIL DE CRESCIMENTO DAS LINHAGENS DERIVADAS	74
5.7 PERFIL DE CRESCIMENTO DAS LINHAGENS DERIVADAS SOB PRESSÃO SELETIVA DE VANCOMICINA	74
5.8 ENSAIO DE DISCO DIFUSÃO MODIFICADO	76
5.9 ENSAIO DE CURVA DE MORTE	78
5.10 ENSAIO DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA	80
5.11 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ZETA DE MEMBRANA	81
5.12 ENSAIO DE AUTÓLISE POR TRITON X-100	82
6 DISCUSSÃO	84
7 CONCLUSÕES	97
REFERÊNCIAS	98
ANEXOS	110
ANEXO A – COMPOSIÇÃO DE MEIOS DE CULTURA E REAGENTES	110
ANEXO B – PREPARO DAS SOLUÇÕES ESTOQUE DE ANTIMICROBIANOS	111
ANEXO C – RESULTADO DO ENSAIO DE DISCO DIFUSÃO MODIFICADO PARA VANCOMICINA	112

1 INTRODUÇÃO

O *Staphylococcus aureus* é um patógeno causador de infecções nosocomiais e na comunidade, comumente isolado do epitélio humano e mucosas. Apesar da disponibilidade de novos fármacos com atividade contra *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA, do inglês *Methicillin-Resistant S. aureus*), o custo e, principalmente, o grande número de estudos para vancomicina ainda mantém o uso deste glicopeptídeo como terapia empírica. Todavia, os níveis séricos abaixo de 15 µg/mL de vancomicina em pacientes com infecções estafilocócicas complicadas podem, por pressão seletiva, levar à falha terapêutica e recidiva (HONORE et al., 2019).

O crescente aumento de infecções por linhagens de *S. aureus* sensíveis à vancomicina com reduzida susceptibilidade, isto é, com concentração inibitória mínima (CIM) entre 1 e 2 µg/mL (*MIC-creep*), são um problema de saúde pública com impacto significativo nas taxas de morbidade e mortalidade no mundo (KULLAR et al., 2011). A capacidade de sobrevivência de *S. aureus*, por longos intervalos de tempo na presença de fatores ambientais limitantes e condições hostis no hospedeiro, é possível por meio de adaptação do estado fisiológico e atividades celulares. Esses mecanismos dificultam sua erradicação e favorecem a disseminação, tanto na comunidade como em hospitais (ONYANGO; ALRESHIDI, 2018).

Na última década, pesquisas voltadas para a compreensão dos mecanismos de persistência a antimicrobianos vem sendo realizadas, tendo em vista a crescente associação de microrganismos sensíveis com recidivas e a aceleração da aquisição do fenômeno de resistência. Sabe-se que populações bacterianas geneticamente idênticas são comumente compostas de populações menores, fenotipicamente distintas, com alteração transitória do seu estado metabólico na presença de condições estressoras (JOHNSON; LEVIN, 2013). Estas populações desenvolvem um fenômeno chamado persistência a antimicrobianos que pode ser dividido em tolerância e persistência, considerando o percentual da população que expressa o fenótipo característico. Quando o percentual é menor ou igual a 1% da população dá-se o nome de “persistência”.

A persistência a antimicrobianos pode ser resultante das condições ambientais, pode ser induzida por drogas; ou pode ser espontânea, com a finalidade de perpetuação da espécie. Em todos os casos, ocorre redução da susceptibilidade ao tempo de exposição ao estresse, diferente da avaliação por métodos convencionais que avaliam a susceptibilidade em relação à concentração mínima capaz de inibir o microrganismo (BALABAN et al., 2019).

Particularmente, a persistência induzida por drogas ocorre através de gatilhos como, por exemplo, a exposição de linhagens a concentrações subinibitórias (MICHIELS; FAUVART, 2016). Semelhantemente, as concentrações séricas abaixo do recomendado para eliminar uma infecção, isto é, concentrações subterapêuticas também são capazes de selecionar populações ou subpopulações por alterações fisiológicas transitórias (CONLON et al., 2016). Ao longo do tempo, o acúmulo de mutações adaptativas confere a sobrevivência a um ou mais antimicrobianos bactericidas, ampliando a tolerância e, conseqüentemente, acelerando a resistência.

Sendo assim, a dificuldade de detecção de pequenas frações de células tolerantes pode contribuir para a escolha terapêutica inadequada, seguida de evolução e disseminação de microrganismos com capacidades adaptativas irreversíveis e recalcitrantes (LEVIN-REISMAN et al., 2017). Logo, desejou-se com este estudo investigar se a linhagem de *S. aureus* ATCC 29213 exposta a diferentes concentrações de vancomicina podem desenvolver tolerância e/ou persistência.

REVISÃO DE LITERATURA

1.1 *Staphylococcus aureus*: GENERALIDADES DO PATÓGENO

O gênero *Staphylococcus* compreende microrganismos gram-positivos de 0,5 – 1,5 µm de diâmetro que podem ser visualizados em microscopia na forma de cocos isolados ou agrupados semelhantes a cachos de uva, devido à divisão celular em três planos perpendiculares (HARRIS; FOSTER; RICHARDS, 2002; SANTOS et al., 2007). Dentre as espécies colonizadoras de humanos, o *Staphylococcus aureus* está entre as mais estudadas, devido à relevância clínica e diversidade de infecções, tanto na comunidade, quanto no ambiente hospitalar.

Os *S. aureus* são anaeróbios facultativos, imóveis e não formadores de esporos (KLOOS; BANNERMAN, 1994; HARRIS; FOSTER; RICHARDS, 2002). Apresentam elevada capacidade adaptativa, podendo sobreviver em diferentes ambientes. Suas colônias são lisas, arredondadas e de coloração cinza ou amarelo-ouro. Quando em ágar sangue costumam formar halo de hemólise completa das células sanguíneas (β-hemólise) ao redor das colônias.

Os ensaios bioquímicos de caracterização desta espécie, compreendem a diferenciação de cepas de estreptococos por testes de catalase (+) e oxidase (-). Como particularidade específica da espécie, o *S. aureus* apresenta alta tolerância para meios salinos e a capacidade de fermentar o açúcar manitol em ácido láctico, tornam o ágar manitol salgado um meio seletivo. Além disso, é um microrganismo tolerante a variações de temperatura e produtor de coagulase (+), ligada ou livre, e DNase (+) (KLOOS; BANNERMAN, 1994; HARRIS; FOSTER; RICHARDS, 2002; ROSSATO; REITER; ALVES, 2018).

Como todo gram-positivo, apresentam parede celular espessa (20 – 40 nm), como revestimento protetor, cujo componente majoritário são os peptidoglicanos (50%). A parede celular também é constituída de ácidos teicóicos (40%) que podem estar associados à parede celular e à membrana celular (HARRIS; FOSTER; RICHARDS, 2002). Esses ácidos são responsáveis por conferir carga superficial negativa para os *S. aureus*, auxiliar na captação de íons metálicos, como cátions bivalentes, e na

atividade de enzimas autolíticas (ROSSATO; REITER; D' AZEVEDO, 2018). Ainda na parede celular são encontradas adesinas, autolisinas e proteínas de superfície responsáveis pela virulência do patógeno.

O crescimento e a replicação do microrganismo dependem da habilidade de adaptação individual de cada linhagem. Em geral, o *S. aureus* apresenta diversos mecanismos protetores capazes de auxiliar no processo infeccioso. O processo de crescimento bacteriano, em condições ótimas, é dividido em três fases: adaptativa (*lag*), exponencial (*log*) e estacionária. Em fase *lag*, o microrganismo encontra-se em preparação para sobrevivência. Durante a fase exponencial o crescimento torna-se mais acelerado e eficiente para assegurar o crescimento celular e, à medida que as bactérias envelhecem, seu crescimento é interrompido (HARRIS; FOSTER; RICHARDS, 2002).

1.2 FATORES DE VIRULÊNCIA E PATOGÊNESE DA INFECÇÃO ESTAFILOCÓCICA

A patogenicidade do *S. aureus* é complexa e multifatorial, pois depende da resposta imunológica do hospedeiro e da expressão de fatores de virulência que resultam na capacidade de sobrevivência bacteriana (JARRAUD et al., 2002). Em cada fase de crescimento, a produção de fatores de virulência é modulada por reguladores de resistência. O sistema *agr* (do inglês, *Acessory Gene Regulatory*) é um dos reguladores mais importante estudados para *S. aureus*. Esse é o sistema controlador central da expressão de genes de virulência que é autorregulado pela densidade celular (*quorum sensing*) através da produção e detecção de peptídeos autoindutores (ROSSATO; REITER; D' AZEVEDO, 2018). A baixa regulação (*down regulation*) ou a disfunção nesse sistema está associada a infecções persistentes, susceptibilidade reduzida à glicopeptídeos antimicrobianos, formação de biofilmes e são mais adaptados às condições *in vitro* (SOMERVILLE et al., 2002; SCHWEIZER et al., 2011; GOMES-FERNANDES et al., 2017)

A expressão de fatores de virulência quando em condições de estresse, como por exemplo na presença de antimicrobianos circulantes, é fundamental para

sobrevivência, incluindo os processos de adesão celular, manutenção, replicação e disseminação do microrganismo no hospedeiro (SANTOS et al., 2007; NABER, 2009).

Os processos de adesão e colonização, inicialmente, ocorrem em sítios primários de infecção, pele e fossas nasais, por fixação do microrganismo e são importantes para posteriormente dar início ao processo infeccioso (NABER, 2009). Os ácidos teicóicos da superfície de *S. aureus* são essenciais para esse processo (WEIDENMAIER et al., 2004). Após a colonização, o rompimento das barreiras protetoras ou o comprometimento do sistema imune, acionam mecanismos bacterianos invasores através da produção de enzimas, toxinas e hemolisinas. Então, por destruição de tecido alvo, o patógeno penetra o hospedeiro e desencadeia a resposta aguda inflamatória localizada (LOWY, 1998; KOBAYASHI; MALACHOWA; DELEO, 2015). A lesão clássica que caracteriza a infecção por *S. aureus* é o abscesso piogênico.

Patógenos como *S. aureus* apresentam uma gama de fatores de virulência capazes de evadir as células de defesa e auxiliar no desenvolvimento de infecção. São dois os mecanismos principais de virulência: a resistência a peptídeos antimicrobianos (AMPs, do inglês *Antimicrobials Peptides*) e a resistência à morte fagocitária (FOSTER, 2004; KOBAYASHI et al., 2010). Dentre os fatores de virulência, encontram-se mecanismos anti-opsonizantes e produção de toxinas (leucotoxinas e enterotoxinas) contra as células fagocitárias (HAAS et al., 2004; WANG et al., 1998) e síntese de enzimas que eliminam espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *Reactive Oxygen Species*), como catalase e superóxido dismutase (SOD). Ao colonizar novos sítios, o *S. aureus* é capaz de se multiplicar e por *quorum sensing* regula a expressão de biofilmes, por produção de uma matriz polimérica protetora contra a ação de antimicrobianos e células de defesa do sistema imunológico (NABER, 2009).

As manifestações clínicas, decorrentes dos mecanismos microbianos de patogenicidade, podem ser desde locais à sistêmicas, com elevada taxa de mortalidade, dependentes da resposta imunológica do hospedeiro e das características da linhagem (JARRAUD et al., 2002). Dentre as infecções mais comuns causadas por *S. aureus* estão as infecções de pele e tecidos moles localizadas ou difusas, como foliculite e síndrome da pele escaldada;

sepsis/bacteremia como consequência grave de infecções localizadas, com quadro de febre, taquicardia, hipotensão e taquipneia; infecções órgão-específicas (osteomielites, endocardites e pneumonia) de elevada mortalidade; e toxemias, relacionadas a liberação de toxinas com ação de superantígenos, como intoxicações alimentares e síndrome do choque tóxico (BIEN; SOKOLOVA; BOZKO, 2011; EDWARDS; MASSEY; CLARKE, 2012; SMITH et al., 2012; YAMAMOTO et al., 2013; ROSSATO; REITER; ALVES, 2018).

1.3 RELEVÂNCIA CLÍNICA DE *S. aureus* E ASPECTOS DA RESISTÊNCIA À VANCOMICINA

O *S. aureus* é um dos principais patógenos isolados no ambiente hospitalar e o segundo microrganismo mais prevalente em isolados clínicos de pacientes da comunidade. A colonização nasal e epitelial apresenta relevância na propagação do patógeno principalmente em ambientes nosocomiais (LOWY, 1998; SCHMIDT; BÉNARD; CYR, 2015). Cerca de 20 - 30% da população saudável são portadores persistentes e 50 - 60% são colonizados de forma intermitente por esse patógeno. A ausência de sintomas para a maioria dos portadores propicia a disseminação do microrganismo e eleva o risco de infecções por linhagens de colonização endógena (SAVAGE; ANDERSON, 2013; TONG et al., 2015).

As infecções estafilocócicas podem apresentar duração variável em diversos sítios, devido à sua capacidade adaptativa a diferentes ambientes. Dentre os fatores de risco associados a infecções estafilocócicas estão a idade, imunossupressão, lesões cutâneas, doenças renais, diálises e procedimentos invasivos (acesso vascular, uso de próteses e dispositivos médicos).

As bacteremias por *S. aureus* são infecções graves com elevada morbidade e mortalidade (PITTET, 1993; TONG et al., 2015). De acordo com O'Neill (2014), bacteremias por esse patógeno estão associadas a maiores períodos de internação hospitalar, gerando custos elevados com tratamento e aumento do risco de mortalidade quando comparado com bacteremias causadas por outros patógenos. Os custos de tratamento são ainda maiores quando os pacientes apresentam mais de um tipo de complicação (NISSENSON et al., 2005). Além disso, devido à urgência do tratamento

para esse tipo de infecção, normalmente é realizada terapia antimicrobiana empírica, antes do resultado de hemocultura. Entretanto, a terapia inicial inapropriada pode contribuir para resistência a antimicrobianos, elevando os custos e as taxas de mortalidade (KHATIB et al., 2006).

1.3.1 Relação histórica de linhagens MRSA com a terapia antimicrobiana

A história dos antimicrobianos e o surgimento de linhagens de *S. aureus* resistentes à meticilina tem relação direta com a manutenção do uso da vancomicina e outros glicopeptídeos para o tratamento empírico de infecções por *S. aureus*. Desde o primeiro isolado de MRSA reportado, em 1961, o uso indiscriminado de vancomicina como alternativa aos β -lactâmicos, gerou crescente surgimento de novas linhagens resistentes (CHAMBERS, 2001).

A disseminação dos clones resistentes e a aquisição do cassete estafilocócico *SCCmec* (do inglês, *Staphylococcal Cassette Chromosome Mec*) são responsáveis pela distribuição mundial de linhagens MRSA. As linhagens de *S. aureus* resistentes à meticilina possuem genes cromossômicos *mecA* ou *mecC* (PATERSON et al., 2014; ROSSATO; REITER; D' AZEVEDO, 2018). Esses genes são transportados pelo cassete estafilocócico *SCCmec* móvel, que codifica uma proteína ligadora de penicilina (PBP, do inglês *Penicillin Binding Protein*) adicional, chamada PBP2a, com fraca afinidade por β -lactâmicos (SANTOS et al., 2007; WHO, 2017; FRACAROLLI; OLIVEIRA; MARZIALE, 2017). Portanto, a PBP é inativada, enquanto a PBP2a mantém a síntese da parede celular e a sobrevivência do microrganismo. A disseminação de linhagens MRSA para o ambiente hospitalar, limitou a terapia antimicrobiana para *S. aureus* aos glicopeptídeos (SANTOS et al., 2007). De acordo com a Organização Mundial de Saúde, o *S. aureus* resistente a meticilina é enquadrado como patógeno prioritário no cenário mundial (WHO, 2017).

A resistência a antimicrobianos é um problema de saúde mundial há décadas, responsável por, aproximadamente, 700 mil mortes anuais (WHO, 2017). Nos Estados Unidos da América (EUA), a média de infecções por MRSA já relatada foi de 80.000 casos/ano, com 11.000 mortes aproximadamente (KLEVENS, 2007; MALANI, 2014). Infecções por microrganismos resistentes apresentam elevada taxa de mortalidade e

custos ao sistema de saúde, devido às complicações e a recorrência de infecções. O aumento na frequência de isolados, tanto nos hospitais, como na comunidade, com mutações que conferem resistência constitui um grave problema de saúde pública. Uma vez que quando a infecção por linhagens MRSA se estabelece, ocorre piora no prognóstico, resistência variável a outros antimicrobianos, bem como dificuldade na escolha da terapia antimicrobiana; e percentual elevado de mortalidade entre 20 a 40%, em até 30 dias (WEINER et al., 2016; DUARTE et al., 2018).

A escassez de estudos epidemiológicos mais completos e multicêntricos dificulta a identificação do perfil dos isolados atuais para *S. aureus*, principalmente em países menos desenvolvidos. A variabilidade de resistência se modifica de acordo com a região geográfica e com o material clínico analisado (RODRÍGUEZ-NORIEGA et al., 2010; MEJÍA; ZURITA; GUZMÁN-BLANCO, 2010; LEE et al., 2018). Os países de maior prevalência de MRSA estão localizados na América e na Ásia (LEE et al., 2018). Em 2009, no Brasil, a prevalência de infecções por MRSA foi de 44% a 56% (FERREIRA et al., 2009; CARVALHO; MAMIZUKA; GONTIJO FILHO, 2010). Enquanto, nos países europeus e nos EUA a prevalência foi, respectivamente, de 1 – 24% e, cerca de, 40% (DULON et al., 2011; RODRIGUES et al., 2015). A aumentada distribuição de linhagens MRSA na comunidade, elevou ainda mais os percentuais de internações por infecções resistentes (LEE et al., 2018).

O Programa SENTRY de Vigilância de Antimicrobianos (do inglês, *Antimicrobial Surveillance Program*) publicou em 2009 dados sobre a prevalência de *S. aureus* na América do Norte e na América Latina (GALES et al., 2009). De acordo com o estudo, de 1997 a 2006, houve um aumento de resistência para a maioria dos antimicrobianos por toda a América Latina, enquanto o percentual de isolados MRSA com concentração inibitória mínima (CIM) maior ou igual a 1 µg/mL diminuiu de 96,6% para 92,3% (MEJÍA; ZURITA; GUZMÁN-BLANCO, 2010). A versatilidade deste patógeno gram-positivo e sua capacidade adaptativa em diversos nichos ambientais, tem contribuído para a disseminação de linhagens com susceptibilidade reduzida e resistentes aos fármacos de escolha para tratamento.

Apesar de serem casos raros, em 2014, isolados foram identificados como *S. aureus* resistentes à vancomicina (VRSA do inglês, *Vancomycin Resistance S. aureus*)

advindos de pacientes que receberam o tratamento por mais de 30 dias com vancomicina sem eficácia terapêutica (OLIVEIRA et al., 2014). Linhagens resistentes a múltiplos antimicrobianos, como MRSA e VRSA, elevam ainda mais os custos com a terapia antimicrobiana, cerca de duas vezes mais comparada a infecções por microrganismos sensíveis (FILICE et al., 2010). Além disso, a previsão de mortalidade por infecções causadas por microrganismos resistentes superará o quantitativo de mortes por câncer (O'NEILL, 2014). Embora a plasticidade do genoma estafilocócico seja irreversível, no sentido de aumentar o número de mutações e aquisição de elementos genéticos móveis que confere resistência, as infecções por microrganismos sensíveis tem sido alvo de preocupação nas últimas décadas.

1.4 FALHA TERAPÊUTICA ASSOCIADA À TERAPIA EMPÍRICA COM VANCOMICINA

1.4.1 Aspectos da vancomicina como terapia empírica

Especificamente para infecções estafilocócicas, o uso de vancomicina é recomendado para linhagens resistentes a penicilinas, suspeita de infecção por MRSA e casos de pacientes com alergia a penicilinas e/ou cefalosporinas (AVENT et al., 2013).

O uso da vancomicina foi liberado em 1956, entretanto, na época, com a ampla utilização de meticilina, oxacilina e outras penicilinas sintéticas com menor toxicidade, seu uso retornou somente após a identificação de isolados MRSA (WISPLINGHOFF et al., 2004; LODISE et al., 2007; FOWLER et al., 2005; TROIDLE et al., 2007; RYBAK et al., 2009). A vancomicina é um antimicrobiano bactericida da classe dos glicopeptídeos que atua inibindo a síntese de parede celular de bactérias gram-positivas. Seu mecanismo de ação compreende a formação de um complexo estável com os pentapeptídeos de mureína, impedindo a formação de peptideoglicanos, principais constituintes da parede celular estafilocócica (VANDECASTEELE; BOELAERT; DE VRIESE, 2009; RUBINSTEIN; KEYNAN, 2014). Durante a síntese de peptideoglicanos, no citoplasma, o aminoácido L-alanina é convertido em D-alanina (D-ala). O D-ala é ligado à outra molécula idêntica, formando um dipeptídeo D-ala-D-ala. Então, cada dipeptídeo formado é adicionado ao tripeptídeo uracil difosfato-N-

acetilmurâmico, dando origem a um pentapeptídeo. Esse último, por sua vez, é adicionado ao peptideoglicanos.

Vancomicina se liga, com alta afinidade, ao pentapeptídeo na porção C-terminal D-ala-D-ala, impedindo a ligação do peptideoglicanos. Logo, ocorre o bloqueio da adição de precursores na cadeia de peptideoglicanos nascentes (transglicosilação) e a formação de pontes cruzadas (transpeptidação) (COURVALIN, 2005). Então, o segundo estágio da síntese da parede celular é impedido por bloqueio da etapa de transglicosilação e de transpeptidação (VANDECASTEELE; BOELAERT; DE VRIESE, 2009; SUJATHA; PRAHARAJ, 2012; RUBINSTEIN; KEYNAN, 2014; ONYANGO, 2018).

Com relação às características estruturais, a vancomicina apresenta peso molecular de 1.449 Da e, por isso, sua atividade limitada aos gram-positivos, devido à dificuldade de penetrar na membrana externa de gram-negativos (SPAGNOLO et al., 2014). Apresenta efeito diminuído na fase estacionária de crescimento bacteriano, em inóculos bacterianos maiores que 10^5 Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/mL (efeito de inóculo) e condições anaeróbicas de crescimento (RYBAK et al., 2009).

Devido à sua baixa absorção por via oral, a vancomicina é administrada por via endovenosa. Cerca de 50 – 60% do fármaco encontra-se ligado a proteínas sanguíneas. A penetração nos tecidos pode ser afetada por condições inflamatórias e comprometimento imune. Esse fármaco não é biotransformado, portanto é eliminado (90%) na forma inalterada pelos rins, com meia vida de 4 – 8 h. A estreita janela terapêutica, isto é, a dose mínima é bem próxima à dose máxima eficaz, limita a utilização de concentrações elevadas. Níveis séricos acima de 40 µg/mL são considerados tóxicos (RYBAK et al., 2009). Sinais e sintomas comuns após a infusão são eritema da face e pescoço e prurido, chamado de síndrome do homem vermelho. Esses sintomas podem ser eliminados por administração conjunta com anti-histamínicos e infusão lenta de 1,5 – 2,0 horas (10 mg de vancomicina/min) e podem estar acompanhados de queda da pressão arterial, dores musculares e espasmos (HOEFEL et al., 2004).

As características farmacocinéticas e farmacodinâmicas da vancomicina devem ser levadas em consideração e ajustadas de acordo com as condições do paciente. O parâmetro que melhor prediz a eficácia de vancomicina em infecções por *S. aureus*, independente da CIM, é a área sob a curva (AUC)/CIM. De acordo com estudos, o parâmetro AUC/CIM deve ser maior que 400 para obtenção de cura clínica ou eficácia clínica e maior que 850 para cura bacteriológica (MOISE-BRODER et al., 2004; VANDECASTEELE; DE VRIESE; TACCONELLI, 2013). Isto é, à medida que ocorre aumento da CIM, a probabilidade de atingir a cura clínica é reduzida.

Apesar de poucos estudos clínicos comprovados na área, esses valores são geralmente aceitos como alvo PK/PD para vancomicina. As diretrizes norte americanas estabelecem os níveis séricos mínimos de 15 – 20 µg/mL para obtenção de eficácia clínica (AUC/CIM > 400) no tratamento de infecções complicadas por MRSA, incluindo bacteremias (RYBAK et al., 2009; JUNG et al., 2014). Como é de conhecimento geral, doses abaixo do recomendado (subterapêuticas) são frequentes, principalmente em pacientes críticos. Fatores clínicos como taxa de filtração glomerular, doenças renais e hipoalbuminemia alteram a distribuição e a eliminação do fármaco, alterando assim os valores dos parâmetros farmacocinéticos para níveis séricos não eficazes.

1.4.2 *S. aureus* com susceptibilidade reduzida à vancomicina

As primeiras descrições relacionadas à sensibilidade reduzida ao glicopeptídeo ocorreram em pacientes com esquemas terapêuticos prolongados utilizando a vancomicina (HIRAMATSU et al., 1997; SMITH et al., 1999; MEJÍA; ZURITA; GUZMÁN-BLANCO, 2010). Desde então, a redução dos percentuais de isolados MRSA e o aumento de relatos de estafilococos com susceptibilidade reduzida à vancomicina, linhagens com resistência intermediária à vancomicina (VISA do inglês, *Vancomycin Intermediate Staphylococcus aureus*) e heterorresistentes (hVISA), é um alerta quanto a utilização desenfreada do glicopeptídeo.

Um dos fatores favoráveis para o desenvolvimento de *S. aureus* com susceptibilidade reduzida à vancomicina é a sua estrutura molecular e o mecanismo de ação deste fármaco. O tamanho e o alvo de ação da vancomicina resultam na formação de uma

barreira física na superfície da membrana bacteriana com o próprio fármaco, levando à baixa penetração da molécula (DERESINSKI, 2009; RONG; LEONARD, 2010). O longo tempo de uso do fármaco também está associado à falha ou à baixa resposta clínica no tratamento (HIRAMATSU, 1998; KIM et al., 2000). No Brasil e outros países em desenvolvimento, a ausência de monitoramento dos níveis séricos de pacientes em uso de vancomicina e as condições de saúde são fatores que predispõe o surgimento de linhagens menos susceptíveis ao fármaco (BREVES et al., 2015; VITÓRIA et al., 2019).

Considerando o número relativamente baixo de isolados VRSA no mundo até o momento, pesquisas com foco em linhagens sensíveis com susceptibilidade reduzida à vancomicina são realizadas, a fim de compreender a capacidade de sobrevivência de *S. Aureus* na presença do fármaco e a relação com falhas terapêuticas. Em geral, linhagens hVISA apresentam CIM ≤ 2 $\mu\text{g/mL}$ para vancomicina, com subpopulações (10^{-5} a 10^{-6} células) com CIM ≥ 4 $\mu\text{g/mL}$. Por esse motivo, a prevalência deste fenótipo é variável nos estudos, devido à baixa concentração de células com sensibilidade diminuída e a variedade de metodologias pouco sensíveis utilizadas para detecção (RONG; LEONARD, 2010; HOWDEN et al., 2010).

A falha terapêutica relatada para vancomicina é bem estabelecida também com base no aumento dos valores de CIM, denominado *MIC creep*. Os motivos que resultam no incremento da CIM ainda são controversos, juntamente com os outros fenômenos adaptativos, o uso da vancomicina tem sido questionável.

Em 2007, a alteração dos critérios de susceptibilidade pelo CLSI, em virtude do MIC *creep* e infecções com susceptibilidade reduzida, teve por objetivo aumentar a sensibilidade da técnica de determinação da CIM e auxiliar no manejo de terapia empírica (TENOVER; MOELLERING JR, 2007; DHAND; SAKOULAS, 2012). *In vitro*, a classificação da susceptibilidade baseada na determinação da CIM, técnica padrão-ouro, tem sido controversa. Mesmo isolados classificados como sensíveis para vancomicina, conforme o critério estabelecido pelo CLSI (2018), com valores de CIM próximos ao intervalo máximo de sensibilidade (2 $\mu\text{g/mL}$) tem sido associados com baixa eficácia clínica (SORIANO et al., 2008; PEA; VIALE, 2009; GOULD, 2012; HOLLAND; FOWLER, 2011; RICHTER et al., 2011). Episódios de bacteremias por

isolados *S. aureus* sensíveis à meticilina (MSSA), nunca expostos à vancomicina, com valor de CIM $\geq 1,5 \mu\text{g/mL}$, estão associados a piora da resposta clínica (SORIANO et al., 2008; HOLMES et al., 2011; AGUADO et al., 2012; CERVERA et al., 2014).

Durante a terapia com vancomicina, os parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos devem ser levados em consideração para garantir eficácia ou cura clínica. Linhagens MRSA com CIM igual a $2 \mu\text{g/mL}$ apresentam dificuldade em alcançar a razão AUC/CIM estabelecida, uma vez que os níveis séricos de vancomicina se encontram abaixo do preconizado ($15 - 20 \mu\text{g/mL}$) (DHAND e SAKOULAS, 2012). Mais recentemente, surgiu ainda a hipótese de que os valores de CIM para vancomicina podem ser marcadores de características específicas dos microrganismos relacionados à falha terapêutica, como por exemplo, espessamento de parede celular (FALCÓN et al., 2016).

1.4.3 Capacidade adaptativa de *S. aureus*

A capacidade adaptativa dos estafilococos é dada pela rápida modificação das atividades celulares e fisiológicas que permitem sua colonização em condições hostis, adaptação a condições estressoras e, até mesmo, bactericidas (ONYANGO; ALRESHIDI, 2018). Dentre as características que podem ser alteradas, o envelope celular bacteriano (parede celular e membrana celular) é um dos mais citados, pois é responsável por várias funções vitais da célula envolvidas na infecção e patogenicidade.

A adaptação do patógeno a partir da alteração do envelope celular funciona como mecanismo protetor de variações térmicas, exposição a fármacos e defesas do hospedeiro. Como o primeiro ponto de contato entre a bactéria e meio externo se dá pelo envelope celular, uma das respostas mais comuns ao estresse na adaptação estafilocócica é o espessamento da parede celular (ONYANGO; ALRESHIDI, 2018). Por esse motivo, a parede celular é um dos principais alvos dos antimicrobianos convencionais para estafilococos, pois atuam inibindo uma ou mais etapas de sua síntese. Muitos outros mecanismos podem ocorrer, de forma transitória ou não, dependendo do gatilho estressor, como alteração da composição da parede celular,

pressão osmótica, redução da velocidade de crescimento e replicação, alterando os tamanhos das células bacterianas (ONYANGO; ALRESHIDI, 2018).

Outro ponto de alteração é o conteúdo citoplasmático, caso haja comprometimento do envelope. Portanto, o conjunto de alterações diante dos estímulos externos mantêm a homeostase bacteriana e, quando o estresse é eliminado, as células retornam ao fenótipo basal. Os mecanismos que favorecem a heterogeneidade fenotípica podem ser de natureza epigenética, isto é, não envolvem mudanças no genoma, garantindo a reversibilidade da condição observada. Entretanto, em alguns casos a transmissão, pode ocorrer por várias gerações, por mecanismos de herança epigenética (CONLON et al., 2016; ONYANGO; ALRESHIDI, 2018).

Com exceção da resistência, as estratégias de sobrevivência bacteriana foram negligenciadas durante muitos anos. Segundo Michiels & Fauvart (2016), parte desta negligência foi devido à falta de esclarecimento quanto à sua relevância clínica. Por anos, a concepção de que infecções resultam primariamente da resistência antimicrobiana atraiu a atenção de pesquisadores para estudos com isolados resistentes, como MRSA (CONLON, 2014). A dificuldade técnica de detecção da transição de fenótipo observado em pequenas frações de células também colaborou com o atraso de pesquisas nesta área (MICHIELS; FAUVART, 2016). As falhas terapêuticas são complexas e não podem ser explicadas apenas pelo desenvolvimento de resistência (CONLON, 2014). No estudo de Welsh et al. (2011), bacteremias reincidentes tratadas com vancomicina apresentaram falha terapêutica independente do desenvolvimento de resistência à vancomicina.

Embora os *S. aureus* resistentes a antimicrobianos sejam uma importante preocupação, falhas no tratamento com antimicrobianos são mais complexas e multifatoriais (CONLON, 2014). Isolados MSSA permanecem apresentando dificuldade e falhas no tratamento, o que tornam as infecções por isolados MSSA um problema de saúde ainda mais preocupante, com casos de falhas terapêuticas em terapias com vancomicina, linezolid e daptomicina (SENNEVILLE et al., 2011; SHIELDS et al., 2012).

1.5. PERSISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS COMO ESTRATÉGIA ADAPTATIVA

As falhas terapêuticas em infecções por microrganismos susceptíveis podem estar relacionadas a outras estratégias de sobrevivência dos microrganismos, como a persistência a antimicrobianos. Esse termo descreve populações bacterianas refratárias ao tratamento com antimicrobianos, seja *in vitro* ou no hospedeiro. O estresse gerado pelas condições do meio, como por exemplo ausência de nutrientes, tratamento com antimicrobianos, pH e presença de fagócitos, pode acionar vias metabólicas responsáveis por alterações fisiológicas que mantêm a sobrevivência das células por longos períodos (CONLON, 2014).

A persistência a antimicrobianos foi descrita pela primeira vez em 1944, quando Joseph Bigger expôs *S. aureus* frente a concentrações de penicilina e observou a morte rápida da maioria da população e sobrevivência de uma subpopulação de *S. aureus* por longo período de tempo. Após a retirada do antimicrobiano, a subpopulação residual apresentou recrescimento (BIGGER, 1944). Desde então, sabe-se que populações bacterianas geneticamente idênticas são comumente compostas de populações menores fenotipicamente distintas (JOHNSON; LEVIN, 2013). Apenas na última década, estudos nesta área retornaram apoiando o papel das estratégias de sobrevivência em infecções crônicas e recidivas (CONLON, 2014). Desde então, estudos voltados para pesquisas destes fenômenos vêm sendo realizados, porém com o uso inapropriado de termos, muitas vezes com conotação de similaridade.

Em estudo publicado em 2016, os autores descreveram os termos e propuseram a diferenciação destas estratégias de sobrevivência através de avaliação da cinética de morte. A tolerância descreve “a habilidade, herdada ou não, de microrganismos sobreviverem à exposição transitória a elevadas concentrações de um antimicrobiano sem alterar a CIM, geralmente alcançada por desaceleração de um processo essencial bacteriano” (BRAUNER et al., 2016). Por exemplo, os β -lactâmicos necessitam da síntese de parede celular ativa para eliminar bactérias, logo o crescimento bacteriano lento (forma de tolerância) irá acarretar em longa duração do tratamento para alcançar os mesmos níveis de morte para a maioria da população.

Já a persistência, segundo a definição de Brauner e colaboradores (2016), é “a habilidade de uma subpopulação advinda de uma população clonal sobreviver a concentrações elevadas de um antimicrobiano” e pode ser “tipicamente observada quando a maioria da população bacteriana é rapidamente morta enquanto uma subpopulação persiste por um período mais longo de tempo, apesar da população ser clonal”. A diferença principal entre tolerância e persistência é no tamanho das subpopulações persistentes (tipicamente menor que 1%) da população bacteriana dominante e, portanto, necessitam de períodos de tempo maiores para serem erradicadas completamente.

A tolerância, a persistência e a resistência apresentam como resultado comum a sobrevivência microbiana, entretanto possuem características diferentes quanto à susceptibilidade. Classicamente, por definição, a resistência é uma habilidade herdada que permite a sobrevivência e a replicação bacteriana na presença de elevadas concentrações de um antimicrobiano, comumente detectada pela determinação dos valores de CIM (BRAUNER et al., 2016).

A tolerância e a persistência são ainda divididas em subtipos de acordo com os mecanismos envolvidos. As tolerantes são divididas em tolerantes por *lag* e tolerantes por crescimento lento. A tolerância por *lag* ocorre em função de alterações de nichos ou meio de cultura (AMATO; ORMAN; BRYNILDSEN, 2013) com extensão da fase adaptativa. Quando a duração dessa fase é maior que o tempo de tratamento com o antimicrobiano, é observado um efeito protetor da fase *lag*. A tolerância por crescimento lento ocorre em condições de restrição de nutrientes (carbono, por exemplo). Nesta situação, as bactérias reduzem a taxa de crescimento bacteriano, reduzindo assim a atividade de antimicrobianos bactericidas.

Em contrapartida, as persistentes são divididas em dose dependente e tempo dependente. A persistência do tipo dose dependente está relacionada a fatores genéticos envolvidos na resistência (resistomas), pois através de estímulos, em fase *lag*, são capazes de super expressar fatores de resistência, como bombas de efluxo, e anular o efeito do antimicrobiano (ADAMS et al., 2011; AMATO; ORMAN; BRYNILDSEN, 2013). A persistência dose dependente está relacionada também com o fenômeno de heteroresistência, bem descrito para *S. aureus*. Esse fenômeno é

capaz de alterar a expressão do fenótipo de algumas células originadas de uma população clonal, ao longo de gerações, possibilitando a visualização de colônias em placa. Já a persistência tempo dependente está associada a fatores genéticos de tolerância, por isso apresentam semelhança com os tipos de tolerância. A persistência pode ainda ser subdividido em Tipo I ou acionada (longa fase *lag*) e Tipo II ou espontânea (taxa de crescimento diminuída) semelhantes a tolerantes por *lag* e por crescimento lento, respectivamente (BRAUNER et al., 2016).

1.5.1. Tolerância e persistência em *S. aureus*

Estudos pioneiros voltados para descobertas de mecanismos reguladores de tolerância e persistência a antimicrobianos ocorreram, principalmente, com microrganismos gram-negativos, como *Salmonella* spp, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*.

O conhecimento destes fenômenos para gram-positivos é ainda limitado, porém há relatos de que os mecanismos reguladores consolidados para *E. coli* não são aplicáveis para *S. aureus*, indicando possíveis particularidades para cada microrganismo ou mecanismos ainda não totalmente elucidados (CONLON et al., 2016). Há relatos de que *S. aureus* são capazes de gerar células tolerantes e persistentes de forma semelhante a outras bactérias. Todavia, é observado aumento significativo destas células durante a transição para a fase estacionária, sendo que a tolerância pode ser estendida a mais de um antimicrobiano (KEREN et al., 2004).

Segundo Conlon et al. (2013), a aquisição de tolerância permite que *S. aureus* sobreviva a longas incubações em concentrações 10 vezes a CIM. Aparentemente, as populações estafilocócicas em fase estacionária são mais tolerantes a antimicrobianos que populações em biofilme. Um dos principais gatilhos para a indução de tolerância ou persistência é a exposição de linhagens a concentrações subinibitórias ou sub-letais (MICHIELS et al., 2016; HARMS; MAISONNEUVE; GERDES, 2016).

Não existem mecanismos específicos descritos para o surgimento do fenômeno de persistência a antimicrobianos. Geralmente, o desenvolvimento de células

fenotipicamente modificadas está relacionado a vias regulatórias do crescimento bacteriano utilizadas para sobrevivência ao estresse. A geração de células tolerantes ou persistentes em uma população pode ser estocástica ou induzida por estímulos ambientais como forma de manutenção da espécie diante de condições adversas (HARMS; MAISONNEUVE; GERDES, 2016). Vias de sinalização, como a resposta estrigente e a reposta SOS, são associadas ao controle da quantidade de células induzidas ao fenômeno, através da liberação de uma alarmona ((p)ppGpp) como segundo mensageiro.

O pentafofato (pppGpp) ou tetrafofato de guanosina (ppGpp) desempenha alguns papéis importantes na resposta celular bacteriana coordenada frente ao estresse (HAURYLIUK et al., 2015). Durante o crescimento exponencial, os níveis de (p)ppGpp são basais, nesta fase seu papel principal é de controlar a taxa de crescimento e ajustar o metabolismo bacteriano (KRIEL et al., 2012; GACA et al., 2015). Na ausência de nutrientes, os níveis de (p)ppGpp aumentam e ocorre inibição da produção de RNA ribossômico, reduzindo a taxa de crescimento celular (TRAXLER et al., 2011; GACA et al., 2015). Ao conjunto de alterações fisiológicas moduladas por (p)ppGpp dá-se o nome de resposta estrigente, responsável por regulação da virulência, sobrevivência no hospedeiro, resistência a antimicrobianos e persistência (POOLE, 2012; GEIGER et al., 2014; MAISONNEUVE; GERDES, 2014).

Em *S. aureus*, o gene *rel* apresenta papel importante na codificação de duas enzimas capazes de degradar ou sintetizar o pppGpp que está associado ao crescimento celular *in vitro* (CASSELS; OLIVA; KNOWLES, 1995; GENTRY et al., 2000). Sabe-se que proteases ClpP apresentam papel importante na formação de tolerância e persistência, visto que mutações no gene *clpP* aumentam a susceptibilidade de *S. aureus* à rifampicina e ciprofloxacino (CONLON et al., 2013). Recentemente, Corrigan e colaboradores (2016), descobriram que o pentafofato de guanosina, pppGpp, é capaz de interagir com sete alvos de proteínas em *S. aureus* capazes de desacelerar o crescimento bacteriano e, portanto, levam a um estado metabólico menos ativo (CASSELS; OLIVA; KNOWLES, 1995; GENTRY et al., 2000; CORRIGAN et al., 2016).

Apesar de muitos mecanismos relacionados à tolerância e persistência ainda não estarem esclarecidos, é importante ressaltar que a resistência é um evento secundário

ao aparecimento de tolerância (LEVIN-REISMAN et al., 2017). Uma razão para a rápida aquisição de tolerância é a frequência maior de mutações para tolerância, devido ao maior número de genes relacionados à tolerância comparado aos genes relacionados a resistência (D'COSTA et al., 2006; GIRGIS; HARRIS; TAVAZOIE, 2012; BRAUNER et al., 2016). Em experimento revolucionário realizado com *E. coli*, após 4,5 h de tratamento com ampicilina, foi observado aparecimento de tolerância, por extensão da fase *lag*, seguido de tolerância e resistência parcial e, por fim, aquisição completa de resistência (LEVIN-REISMAN et al., 2017). Logo, sendo a tolerância um evento intermediário entre linhagens sensíveis e resistentes, sua ocorrência amplia a probabilidade de aparecimento de mutações mais raras relacionadas à resistência (COHEN; LOBRITZ; COLLINS, 2013). Assim, a prevenção da tolerância é uma ferramenta eficaz para retardar a evolução da resistência.

O desafio é compreender melhor os mecanismos de transição do metabolismo das células, visando a manutenção de um estado metabólico mais ativo, a fim de que o uso de agentes bactericidas seja mais efetivo nos alvos celulares.

1.5.2 Métodos de detecção para persistência e tolerância

A dificuldade técnica de detecção da transição de fenótipos, em pequenas frações de células, tem sido um fator limitante para implantação de novas técnicas na rotina laboratorial (MICHIELS et al., 2016). Portanto, é de fundamental relevância a padronização de métodos de detecção mais confiáveis para persistência a antimicrobianos. Pode ser realizada a busca de mecanismos moleculares que permitem a sobrevivência da população ou subpopulações, por exemplo a busca por mecanismos que reduzem o metabolismo microbiano; ou por mecanismos de heterogeneidade, como curva de morte bimodal (uma subpopulação) ou multimodal (mais de uma subpopulação) e elevada estocasticidade. Estas características devem ser consideradas para nortear os testes de identificação *in vitro* das subpopulações persistentes (BALABAN et al., 2019).

A partir dos métodos convencionais, a persistência a antimicrobianos aparentemente pode ser distinguível do fenômeno de resistência. Em concentrações elevadas, linhagens resistentes por definição são capazes de se multiplicar. Porém, linhagens

com persistência a antimicrobianos podem ser erroneamente classificadas como linhagens sensíveis dependendo do nível de persistência. A detecção de persistência não pode ser realizada por determinação da CIM ou por disco difusão, visto que linhagens persistentes apresentam valores de CIM iguais a linhagens sensíveis (BRAUNER et al., 2016; BALABAN et al., 2019). Entretanto, a combinação do método de determinação da CIM e a cinética de morte oferece melhor direcionamento para caracterização *in vitro* de susceptibilidade a antimicrobianos (BRAUNER et al., 2016). O valor de CIM direciona quanto à ausência de resistência ou susceptibilidade reduzida, enquanto o ensaio de curva de morte determina do tempo mínimo de morte (MDK, do inglês *Minimum Duration for Killing*).

A avaliação da cinética de morte é mais indicada, visto que nem toda a população clonal é morta em uma mesma velocidade, pois, por meio da redução da atividade metabólica, uma fração da população persiste à ação dos fármacos bactericidas. Além disso, em geral, é possível identificar populações tolerantes quando 99% da população é erradicada (MDK_{99} = redução de 2 *log*), ao passo que persistentes são identificados apenas quando 99,99% da população é erradicada ($MDK_{99,99}$ = redução de 4 *log*) (BRAUNER et al., 2016). Aparentemente, erradicar 99% e 99,99% da população bacteriana representam erradicar quase a população completa de bactérias, entretanto, admitindo inóculo bacteriano de $1,0 \times 10^8$ UFC/mL (100.000.000 UFC/mL), 1% representa 1.000.000 de UFC/mL e 0,01% representa 10.000 UFC/mL. Logo, 1% e 0,01% da população bacteriana são quantidades de células viáveis suficientes para contribuir com falha terapêutica e restauração da infecção.

Para as populações persistentes é caracteristicamente observada, no ensaio de curva de morte, uma curva com mais de uma fase (bimodal) indicando a presença de uma subpopulação, heterogênea em relação à população geral. Essa característica não é uma regra, podendo coexistir várias subpopulações, gerando assim uma curva com várias fases (multimodal). Importante ressaltar que para descartar fenômenos associados a subpopulações resistentes e heteroresistência, a concentração do antimicrobiano utilizado no ensaio de curva de morte deve ser várias vezes maior que a CIM (BRAUNER et al., 2016).

2 JUSTIFICATIVA

Recorrentes falhas terapêuticas e recidivas de infecções por *S. aureus*, mesmo em linhagens sensíveis à vancomicina, denotam o aparecimento de novas estratégias de sobrevivência deste microrganismo, diferentes dos conhecidos mecanismos de resistência. Infecções por linhagens tolerantes ou persistentes demandam adaptações do esquema terapêutico, incluindo ampliação do tempo de tratamento e das dosagens, a fim de erradicar estes microrganismos sobreviventes.

A estimativa é que, até 2050, sejam gastos mais de 100 trilhões de dólares, com infecções por microrganismos resistentes a antimicrobianos. Já se sabe que microrganismos com mutações associadas à tolerância e persistência são capazes de adquirir resistência mais rapidamente, o que contribui para o aumento do número de microrganismos resistentes.

Além disso, a vancomicina apresenta estreita faixa terapêutica, de forma que é frequente a ocorrência de concentrações abaixo dos níveis séricos mínimos recomendados, as quais são, potencialmente, indutoras de tolerância e persistência. Entretanto, os testes de susceptibilidade de rotina, como disco-difusão e determinação da concentração inibitória mínima não conseguem detectar linhagens tolerantes ou persistentes, sendo esses microrganismos categorizados como susceptíveis.

Assim, falhas terapêuticas de infecções por microrganismos susceptíveis, tem demandado uma abordagem diagnóstica diferenciada para detecção dos fenômenos de tolerância e persistência de *S. aureus* frente às diferentes classes de antimicrobianos. Portanto, neste estudo investigamos o potencial indutor de concentrações subterapêuticas de vancomicina na seleção de linhagens de *S. aureus* tolerantes e persistentes. Acreditamos que a detecção de mecanismos de sobrevivência bacteriana possa contribuir para implementação de medidas que otimizem a terapia antimicrobiana, padronização de métodos para detecção de subpopulações com susceptibilidade reduzida à vancomicina e prevenção de falha terapêutica e desenvolvimento de resistência.

Portanto, diante do exposto surgiu a hipótese de que diferentes concentrações de vancomicina são capazes de induzir tolerância e/ou persistência em *S. aureus*.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Investigar se a exposição intermitente a diferentes concentrações de vancomicina induz tolerância e/ou persistência em linhagem de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

3.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar o grau de pureza por caracterização molecular das linhagens *S. aureus* ATCC 29213 e suas derivadas E10.6 e E100 após exposição intermitente a diferentes concentrações de vancomicina;
- Determinar a susceptibilidade da linhagem *S. aureus* ATCC 29213 e suas derivadas E10.6 e E100 após exposição a diferentes concentrações de vancomicina;
- Determinar qualitativamente o nível de tolerância/persistência à vancomicina, oxacilina e ciprofloxacino das linhagens de *S. aureus* ATCC 29213 e suas derivadas E10.6 e E100;
- Avaliar se exposição intermitente a 10 µg/mL de vancomicina altera a cinética de morte da linhagem derivada E10.6 em relação à linhagem de *S. aureus* ATCC 29213;
- Determinar as características fenotípicas das linhagens *S. aureus* ATCC 29213 e suas derivadas E10.6 e E100;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAS DO ESTUDO E ANTIMICROBIANOS

Este estudo foi conduzido utilizando a linhagem *Staphylococcus aureus subsp. aureus* da *American Type Culture Collection* (ATCC®) 29213™, denominada linhagem parental, além de quatro amostras clínicas de *S. aureus* com diferentes pulsotipos, isoladas de bacteremias em outro estudo do nosso grupo de pesquisa (VITÓRIA et al., 2019) (Tabela 1). Todas as linhagens encontram-se armazenadas em meio de preservação (ANEXO A), a temperatura de 20 °C negativos, e fazem parte da bacterioteca do Laboratório de Biologia de Microrganismos e Antimicrobianos (BioMA-lab).

Tabela 1 - Linhagens de *Staphylococcus aureus* incluídas no estudo.

Linhagem	Pulsotipo	CIM ^[1] de vancomicina (µg/mL)	Classificação de Susceptibilidade à Vancomicina ^[2]
ATCC® 29213™	controle	1,0	Sensível
Amostra clínica 20	24	0,5	Sensível
Amostra clínica 166	15	1,0	Sensível
Amostra clínica 200	14	0,5	Sensível
Amostra clínica 214	9	1,0	Sensível

^[1]CIM: Concentração Inibitória Mínima.

^[2]Classificação conforme ponto de corte descrito no manual *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), 2018.

Os antimicrobianos utilizados nos testes foram: cloridrato de vancomicina, oxacilina e ciprofloxacino, todos da Sigma-Aldrich® (EUA). O preparo das soluções estoque dos antimicrobianos está descrito no ANEXO B, conforme descrito pelo CLSI, 2015.

4.2 DESENHO EXPERIMENTAL

Os testes foram realizados de acordo o fluxograma de identificação baseado na proposta de Brauner e colegas (2016), com modificações, ilustrado na figura 1, a fim de analisar tolerância e/ou persistência nas linhagens de *Staphylococcus aureus* expostos a diferentes concentrações de vancomicina.

São descritos oito passos de caracterização de tolerância e/ou persistência. Primeiramente, realizou-se caracterização das fases de crescimento bacteriano com a linhagem de *S. aureus* ATCC 29213 para determinação de curva de crescimento. O tempo médio referente à metade da fase exponencial (*mid-log*) foi posteriormente utilizados nos testes subsequentes de exposição intermitente à vancomicina e curva de morte.

Passo 1. A linhagem de referência ATCC 29213 e as quatro amostras clínicas de *S. aureus* foram cultivadas até a fase *mid-log* e desafiadas com diferentes concentrações de vancomicina 10 µg/mL. A linhagem de *S. aureus* ATCC 29213 foi escolhida para dar continuidade aos ensaios de caracterização de tolerância/persistência induzida por vancomicina, considerando suas características de susceptibilidade mais bem definidas. Assim, esta linhagem também foi exposta a concentração de 100 µg/mL de vancomicina. Ao final das exposições, foram obtidas duas linhagens denominadas derivadas.

Passo 2. As linhagens selecionadas foram avaliadas fenotipicamente quanto a susceptibilidade à vancomicina, por determinação da CIM e da concentração bactericida mínima (CBM). As amostras cuja razão CBM/CIM foi maior ou igual a 32 foram classificadas como tolerante/persistentes, enquanto que razões inferiores foram investigadas quanto à tolerância/persistência conforme descrito no próximo passo.

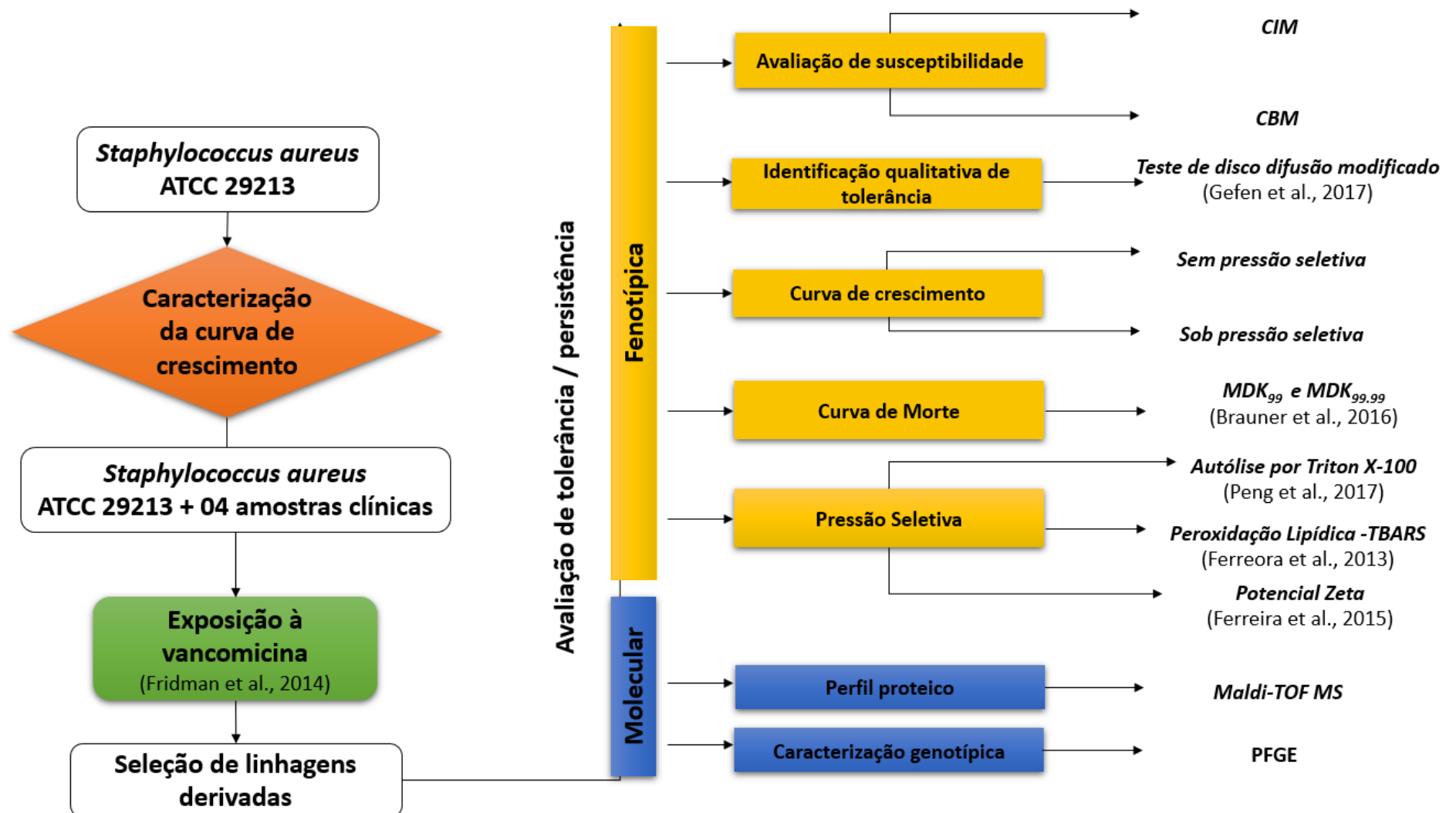


Figura 1 - Fluxograma dos ensaios realizados a partir da exposição à vancomicina de linhagem de referência de *Staphylococcus aureus*, bem como suas derivadas, baseado no protocolo proposto por Brauner e colaboradores (2016) com modificações.

Passo 3. A fim de descartar possibilidade de contaminação e confirmar a espécie das linhagens, realizamos análises moleculares por espectrometria de massas com fonte de ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI, do inglês *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*) associada a analisador de tempo de voo (TOF, do inglês *Time Of Fly*), para as linhagens parental ATCC 29213 e para as linhagens derivadas escolhidas, E10.6 e E100, e por padrão de similaridade dos fragmentos de DNA obtido por técnica de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE, do inglês *Pulsed Field Gel Eletrophoresis*) apenas para as linhagens parental ATCC® 29213™ e derivada E10.6.

Passo 4. Como avaliação fenotípica da taxa de crescimento, comparamos o perfil de crescimento das linhagens derivadas E10.6 e E100 em relação à linhagem parental ATCC 29213 sem a presença de antimicrobiano e em concentrações de 0,25 µg/mL a 50 µg/mL de vancomicina. As medidas foram realizadas por leitura de densidade óptica durante 24 h para obtenção das curvas de crescimento.

Passo 5. Em seguida, foi realizada uma triagem qualitativa para tolerância/persistência para a linhagem parental ATCC 29213 e suas derivadas E10.6 e E100. A técnica realizada conforme protocolo de Gefen e colaboradores (2017) com modificações se baseia no ensaio de disco difusão convencional com algumas alterações. As amostras são incubadas na presença de discos com antimicrobiano até formação do halo de inibição. Com base na característica de tolerância/persistência, após a retirada do disco com antimicrobiano seguido de nova incubação, observa-se o crescimento de colônias dentro do halo de inibição. A partir do quantitativo de colônias, determinamos o nível de tolerância/persistência de cada linhagem.

Passo 6. Para confirmação de tolerância e persistência, conforme recomendado em consenso por Balaban e outros (2019), realizamos o ensaio de curva de morte para a linhagem derivada E10.6 e sua linhagem parental ATCC 29213. O ensaio teve por objetivo identificar tolerância e persistência à vancomicina, por meio da quantificação do MDK₉₉ e MDK_{99,99}, respectivamente. Esses parâmetros representam o tempo mínimo que dado antimicrobiano leva para eliminar 99% da população bacteriana (redução de 2 log) e 99,99% da população bacteriana (redução de 4 log)

respectivamente. As linhagens derivadas com MDK maior que o MDK da linhagem parental foram classificadas como tolerantes/ persistentes.

Passo 7. Consecutivamente, foi determinado o tipo de tolerância e persistência, *lag* ou por crescimento lento, através da quantificação do MDK com inóculo em fases estacionária e exponencial de crescimento, separadamente. As linhagens derivadas que apresentaram MDK maior comparado à linhagem parental, apenas no ensaio com inóculo em fase estacionária, foram caracterizadas como tolerantes por *lag*. Entretanto, quando o MDK encontrado foi maior que o MDK da linhagem parental em ambas as condições de inóculo, foram caracterizadas como tolerantes por crescimento lento.

Passo 8. Por fim, realizamos análise fenotípicas quanto à taxa de autólise, carga de superfície e peroxidação lipídica para avaliar o comportamento das linhagens derivadas expostas à vancomicina.

4.3 PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO BACTERIANO

A padronização do inóculo bacteriano foi realizada apenas com a linhagem parental ATCC 29213 e teve por objetivo reduzir o número de variáveis interferentes nos testes e maior confiabilidade de comparação entre as diferentes linhagens.

Inicialmente, a linhagem ATCC 29213 foi cultivada em caldo *Broth Heart Infusion* (BHI) (Oxoid® LTD., England) a 37 °C por 24 horas (h). Em seguida, foi realizado novo cultivo em ágar BHI (24 h a 37 °C). Então, colônias puras foram selecionadas para ajuste em solução de cloreto de sódio (NaCl) (Nuclear) 0,9% (m/v). Utilizando espectrofotômetro (modelo SP-22, Bioespectro), ajustou-se a solução bacteriana à densidade óptica em comprimento de onda de 600 nm (DO_{600}) de, aproximadamente, 0,269, equivalente a $2,6 \times 10^8$ UFC/mL (Figura 2).

Feito isso, foram realizadas quatro diluições sucessivas na proporção 1 : 10 e obteve-se inóculo final de $2,6 \times 10^4$ UFC/mL. Esse método foi utilizado para ajuste de inóculo bacteriano em todos os ensaios seguintes, salvo quando especificado diferente.

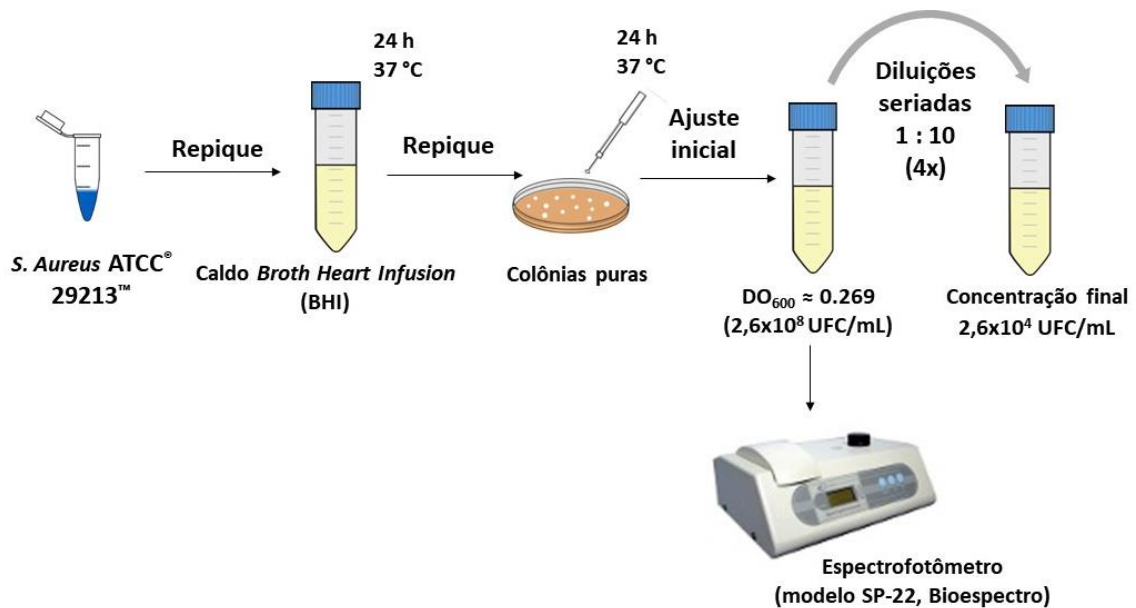


Figura 2 - Esquema de ajuste de inóculo bacteriano a 10^4 UFC/mL em espectrofotômetro.

4.4 PERFIL DE CRESCIMENTO DA LINHAGEM PARENTAL

O perfil de crescimento bacteriano foi determinado com finalidade de definir os tempos de início e duração de cada fase de crescimento de *S. aureus* com base na ATCC 29213 necessários para realização do ensaio de exposição à vancomicina.

O inóculo bacteriano foi ajustado conforme descrito no item 4.3 e incubado a 37 °C, sob agitação orbital de 150 rpm (*Shaker incubator*, Agimax®). A cada 30 minutos foram retiradas alíquotas de 100 µL para monitoramento da DO_{600} , seguido de diluições seriadas, em salina 0,9%, na proporção de 1: 10 (10^{-1} a 10^{-5}) e cultivo, em triplicata, em ágar BHI por técnica de micro gota (10 µL), conforme protocolo de Romeiro (2018), com modificações.

Após incubação a 37 °C por 24 horas, foi realizado contagem de colônias viáveis. O monitoramento foi encerrado quando os valores de DO_{600} lidos em espectrofotômetro apresentaram-se estáveis por mais de duas leituras, indicando o fim da fase exponencial (Figura 3).

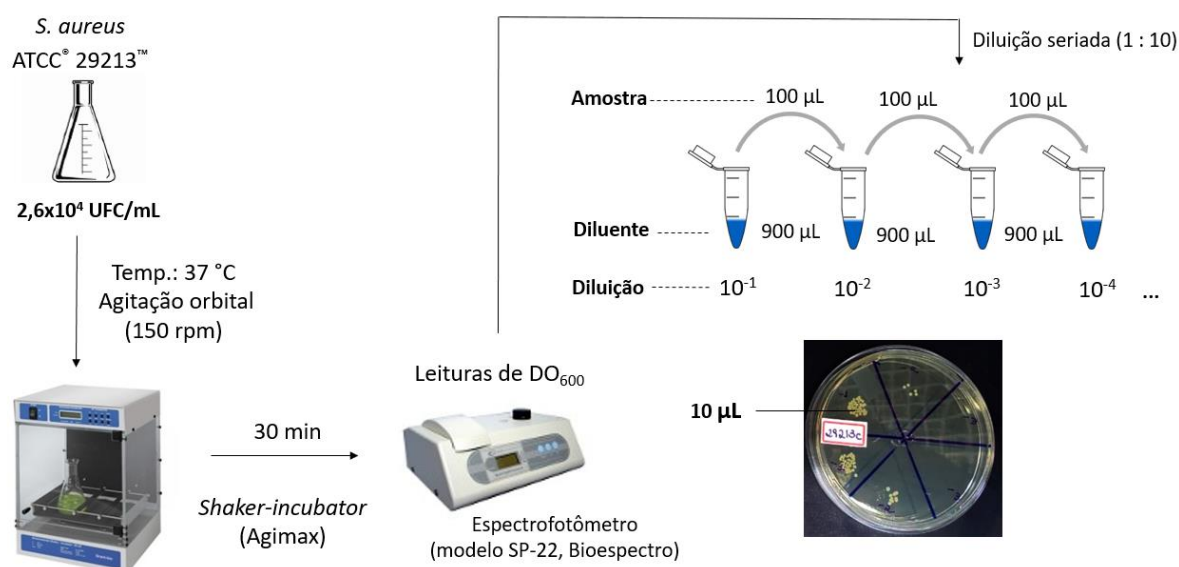


Figura 3 - Esquema de caracterização do perfil de crescimento da linhagem ATCC® 29213™.

4.5 ENSAIO DE EXPOSIÇÃO À VANCOMICINA

Partindo da hipótese principal, quatro amostras clínicas de *S. aureus* de diferentes pulsotipos (descritas no item 4.1) e a linhagem ATCC 29213 foram expostas de forma intermitente a diferentes concentrações de vancomicina. Esse ensaio foi baseado no protocolo proposto por Fridman e colegas (2014) com modificações.

Foram realizadas 6 exposições intermitentes de 10 µg/mL de vancomicina para cada linhagem (Figura 4). Foi estabelecido duração de 6 h para cada exposição considerando a cinética de morte da linhagem ATCC 29213 realizada previamente em outro estudo desenvolvido por nosso grupo de pesquisa que revelou atividade bacteriostática de vancomicina em concentrações de 10 µg/mL durante esse intervalo de tempo (CHAGAS, 2016 dados não publicados).

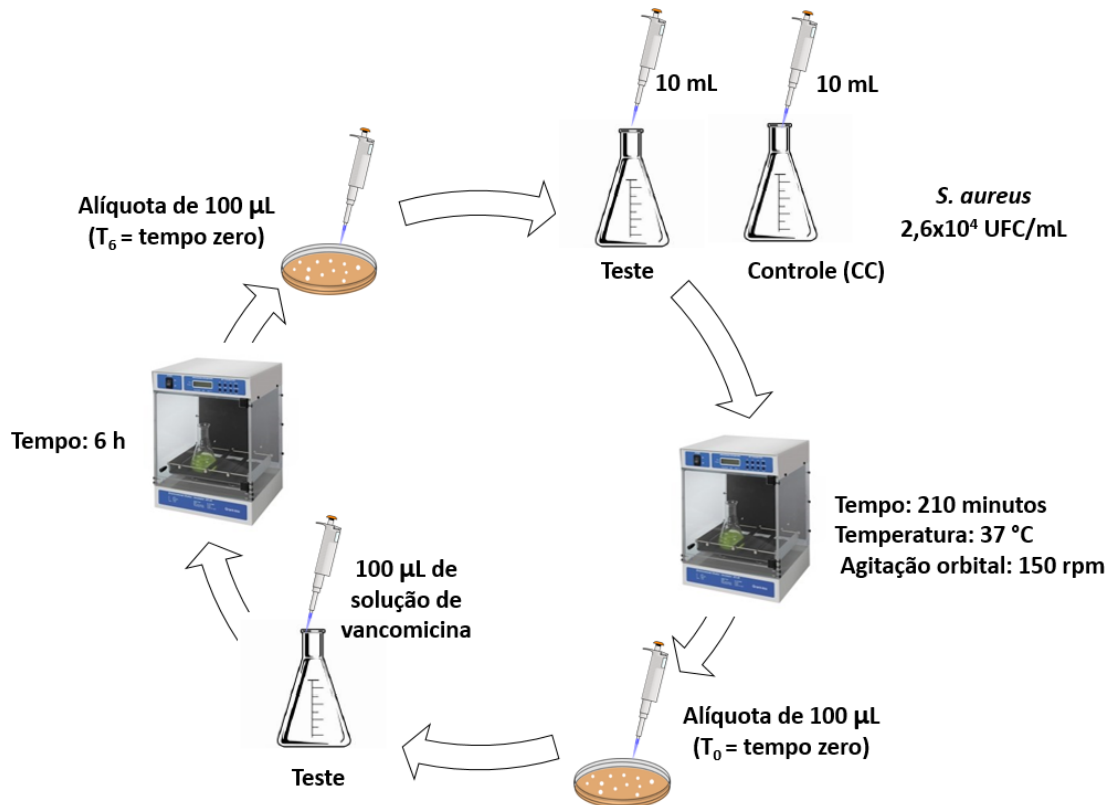


Figura 4 – Esquema de exposição da linhagem ATCC® 29213™ e das amostras clínicas 20, 166, 200 e 214 na presença de 10 µg/mL de vancomicina.

A linhagem ATCC 29213 e as amostras clínicas foram ajustadas conforme item 4.3 e, então, cada ajuste foi distribuído igualmente em dois frascos (10 mL de ajuste/frasco), um frasco controle de crescimento (CC) e um frasco teste. Cada frasco foi então incubado sob agitação orbital (150 rpm a 37 °C) até a fase exponencial (210 minutos). Dado esse tempo, retirou-se uma alíquota de 100 µL de cada frasco para diluição seriada 1 : 10 (10⁻¹ a 10⁻⁵), seguido de cultivo para contagem de colônias viáveis. Então, foram adicionados 100 µL de solução de vancomicina (1000 µg/mL) no frasco teste, obtendo-se concentração final de 10 µg/mL. O frasco controle (CC) foi mantido sem adição de vancomicina.

Logo, todos os frascos foram novamente incubados sob agitação orbital (150 rpm a 37 °C). Ao final de 6 horas, foram retiradas alíquotas de 100 µL para subcultivo em ágar BHI. Após crescimento (24 h a 37 °C), parte do cultivo foi novamente ajustado, seguido de nova exposição e outra parte foi congelada em meio de preservação.

A linhagem ATCC 29213 foi selecionada para dar continuidade aos ensaios, visto que seu perfil de susceptibilidade é sabidamente sensível à vancomicina, com uso desta

linhagem como referência em testes laboratoriais. Então, utilizando o mesmo protocolo, a linhagem ATCC 29213 foi exposta uma vez a 100 µg/mL de vancomicina por 6 horas para avaliar os efeitos de concentrações elevadas de vancomicina.

As linhagens derivadas da ATCC 29213 de ambas as exposições foram selecionadas para dar continuidade aos ensaios, visto que a sua linhagem parental é sabidamente sensível à vancomicina e utilizada como referência em testes laboratoriais. Logo, as seis linhagens derivadas da ATCC 29213 obtidas em 10 µg/mL de vancomicina foram denominadas E10.1, E10.2, E10.3, E10.4, E10.5, E10.6 e a linhagem derivada obtida após exposição em 100 µg/mL de vancomicina foi denominada E100.

4.6 ENSAIOS DE SUSCEPTIBILIDADE À VANCOMICINA

A análise da susceptibilidade da linhagem parental ATCC 29213 e suas linhagens derivadas foi realizada com o propósito de avaliar os efeitos da exposição. Para isto, foram determinadas a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima.

4.6.1 Determinação dos valores de CIM

Primeiramente, o ensaio de microdiluição em caldo para determinação do valor da CIM de vancomicina foi realizado conforme descrito no manual CLSI (2018), a fim de reavaliar a susceptibilidade após os ciclos de exposição à vancomicina. As amostras foram ajustadas conforme o item 4.3. As concentrações crescentes testadas (0,125 – 32,0 µg/mL de vancomicina) foram obtidas por diluições seriadas duplicadas realizadas diretamente em caldo Mueller Hinton II cátion ajustado (CAMHB, do inglês *Cation-adjusted Broth*) (Becton Dickinson e Company, EUA), a partir de solução estoque de 1000 µg/mL de vancomicina.

Em microplaca de fundo chato (NEST®), adicionaram-se às colunas 100 µL do caldo CAMHB com vancomicina na concentração de interesse, seguido de adição de 100 µL do ajuste de cada amostra a ser testada nas linhas. Os poços destinados ao controle de crescimento (CC) continham 100 µL do ajuste de cada amostra e caldo CAMHB sem vancomicina. Os poços destinados ao controle de esterilidade (CE)

continham apenas 200 μL de caldo CAMHB sem acréscimo de antimicrobiano e sem inóculo bacteriano. As amostras foram incubadas por 24 horas a 37 °C (CLSI, 2018). Após a incubação, determinaram-se os valores de CIM a partir da menor concentração em que não foi observado turbidez e estabeleceu-se a classificação de cada amostra de acordo com os pontos de corte estabelecidos no CLSI (2018) (Figura 5).

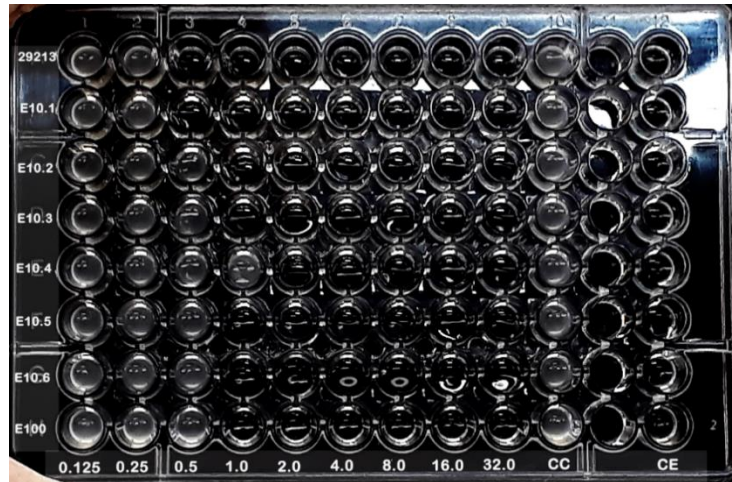


Figura 5 - Microdiluição em caldo para vancomicina em faixa de concentração de 0,125 $\mu\text{g/mL}$ – 32,0 $\mu\text{g/mL}$. As linhagens bacterianas estão dispostas em linhas e as concentrações dispostas em colunas, em ordem crescente da esquerda para a direita. CC representa a coluna de controle de crescimento e o CE representa a coluna do controle de esterilidade. Foram realizados dois experimentos independentes.

4.6.2 Determinação dos valores de CBM

Após a leitura dos valores de CIM, foi realizada a determinação do valor de CBM, de acordo com protocolo do CLSI (1999). Cada amostra foi individualmente avaliada, com retirada de todo o conteúdo dos poços (200 μL) a partir do valor determinado para CIM.

O conteúdo de cada poço foi cultivado em ágar BHI, com o auxílio de alça de Drigalski, e incubado por 24 horas a 37 °C (Figura 6). Após incubação, foi realizada contagem de colônias viáveis e determinada o valor de CBM a partir da menor concentração em que foi observado redução de 99,9% (3 *log*) da população bacteriana inicial.

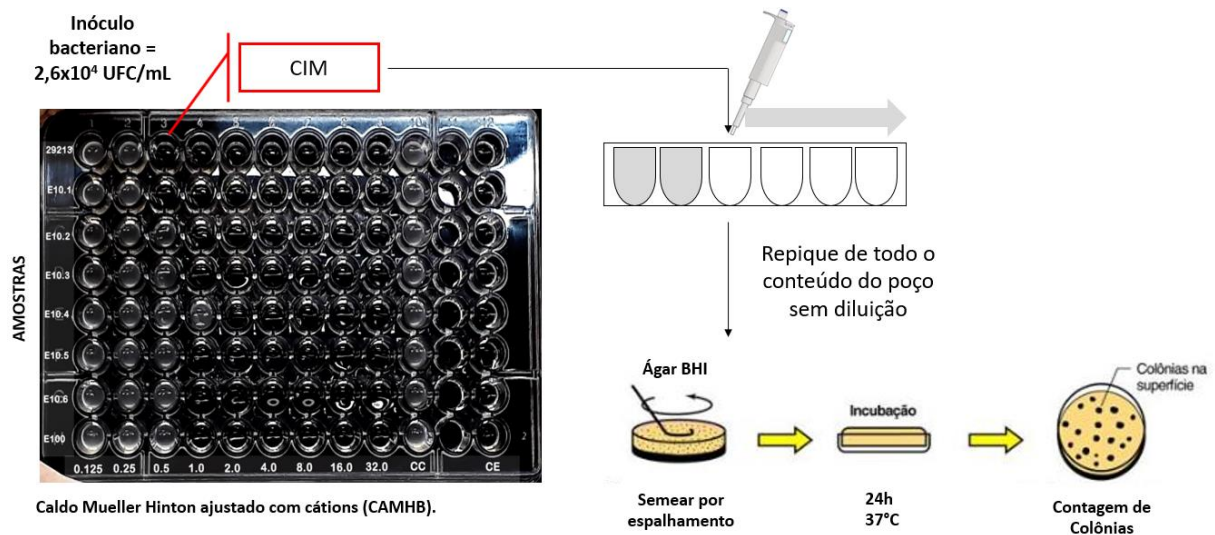


Figura 6 - Esquema de avaliação de susceptibilidade a partir da concentração inibitória mínima (CIM). A partir do último poço em que foi observado crescimento bacteriano (cinza), foi realizado cultivo do conteúdo da microplaca em ágar BHI, indicado pela seta cinza, para posterior contagem de colônias viáveis. Foram realizados dois experimentos independentes.

4.7 CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL PROTEICO POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS ASSOCIADA A MALDI-TOF

Após estes ensaios de susceptibilidade, duas linhagens derivadas de *S. aureus* ATCC 29213 foram selecionadas para dar continuidade as análises de tolerância/persistência. Utilizou-se como critério de exclusão o tempo e a concentração de vancomicina exposta, a fim de avaliar possíveis alterações ao longo do crescimento bacteriano. Portanto, foram escolhidas as linhagens derivadas E10.6 e E100, sendo que a linhagem parental ATCC 29213 foi mantida como controle dos testes.

A linhagem parental ATCC 29213 e as linhagens derivadas E10.6 e E100 tiveram sua identificação confirmada por MALDI-TOF (do inglês, *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Fly*), utilizando o espectrômetro de massa Microflex LT e o software MALDI Biotyper 3.3 (Bruker Daltonics, EUA).

Inicialmente, foi realizada a extração das proteínas totais de cada linhagem de acordo com as recomendações do fabricante (Bruker Daltonics, EUA). Após repique em meio BHI, com uma alça (1 μ L), colônias puras foram selecionadas, adicionadas em um tubo de 1,5 mL e diluídas em 300 μ L de água destilada estéril. Em seguida,

adicionaram-se 900 µL de etanol absoluto (Carlo Erba Reagents, Itália) e agitou-se cuidadosamente a solução. Então, centrifugou-se a mistura a 18.928 *g* por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em 50 µL de ácido fórmico a 70% (Sigma-Aldrich®, EUA) e acrescido de 50 µL de acetonitrila pura (Sigma-Aldrich®, EUA). Esta solução foi novamente centrifugada a 18.928 *g* durante 2 minutos e 30 µL do sobrenadante foi armazenado a -20 °C para posterior análise.

Então, para identificação das amostras, pipetou-se 1 µL do extrato proteico de cada linhagem de interesse para uma placa de aço inoxidável com 96 poços, fornecida pelo fabricante. Esperou-se a completa secagem do inóculo, em temperatura ambiente. A matriz de ácido alfa-4-ciano-hidroxicinâmico (Bruker Daltonics, EUA) de concentração igual a 500 mg/mL foi diluída em uma solução de ácido trifluoroacético 2,5% (acetonitrila 50%, água 50% e ácido trifluoroacético 2,5%). Em seguida, adicionou-se 1 µL da matriz diluída à placa de aço.

Após secagem a temperatura ambiente, adicionou-se o extrato proteico calibrante da cepa *Escherichia coli* DH5α. Após o processamento das linhagens e do calibrante, a placa foi inserida no equipamento para análise.

Esse ensaio foi realizado em colaboração com o Laboratório Especial de Microbiologia Clínica (LEMC/ALERTA) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) por supervisão da Prof.^a Dr.^a Ana Cristina Gales e do Prof. Dr. Rodrigo Cayô. A identificação pela técnica do MALDI-TOF MS foi realizada de acordo com o valor de “score” liberado pelo aparelho. Foram admitidos os critérios especificados na tabela 2, em que os valores de score obtidos para cada linhagem foram analisados por meio de um banco de dados, pelo qual foi possível identificar o microrganismo de interesse.

Tabela 2 - Identificação de microrganismos de acordo com os pontos de corte para a técnica de MALDI-TOF MS.

Resultado	Identificação
Score $\geq 2,30$	Confiável quanto a gênero e espécie.
$2,00 > \text{Score} < 2,29$	Confiável quanto ao gênero e provável quanto à espécie.
$1,70 > \text{Score} < 1,90$	Provável quanto ao gênero.
Score $< 1,69$	Microrganismo não identificado.

4.8 PADRÃO CLONALIDADE POR ELETROFORESE DE CAMPO PULSADO

A clonalidade da linhagem parental ATCC 29213 e da linhagem derivada E10.6 foi determinada por eletroforese de campo pulsado usando como enzima de restrição a SmaI (Roche Diagnostics, EUA).

Primeiramente, as linhagens foram cultivadas em ágar sangue (Oxoid®, Inglaterra) para o isolamento de colônias puras. Três a cinco colônias foram repicadas em 10 mL de caldo *Tripitc Soy Broth* (TSB) (Oxoid®, Inglaterra) por 24 horas, sob agitação a 37°C. Após esse período, as culturas bacterianas foram centrifugadas por 15 minutos a 1008 *g* e o sobrenadante foi desprezado.

Então, ressuspendeu-se o homogenato em 1 mL de solução de NaCl 0,9% e o conteúdo foi transferido para um tubo *ependorf*. O tubo foi centrifugado por 1 minuto a 16.128 *g* e o sobrenadante foi descartado. Retirou-se 10 µL da suspensão bacteriana e transferiu-se para novo tubo, adicionaram-se 300 µL de tampão EC, 15 µL de lisostafina e, por fim, 340 µL de agarose 2% (*Ultrapure™ Low Melting Point Agarose*, Invitrogen, EUA). Após solidificação, os blocos de gel de agarose foram transferidos para uma placa e incubados a 37°C por 10 - 12 horas em tampão 2 mL EC e 200 µL de lisozima.

Após esse tempo, o tampão foi removido e os blocos foram lavados, duas vezes, com 2 mL de CHEF-TE. Posteriormente, os blocos de gel foram cobertos com 2 mL de tampão ES contendo 1 mg/mL de proteinase K (USB Corporation, EUA). Em seguida, os blocos foram incubados durante 12 horas a 50°C.

Após 12 horas, os blocos foram lavados com 2 mL de CHEF-TE (4 vezes) e então foram armazenados em tampão CHEF-TE, a 5°C, até o momento da digestão do ácido desoxirribonucleico (DNA, do inglês *Desorribonucleic acid*) bacteriano. Os blocos de agarose foram cortados de acordo com o tamanho do suporte e lavados em 200 µL da solução DNS, 4 vezes em 1 hora. Após a remoção do tampão DNS, os blocos foram incubados por 1 hora com o tampão sem enzima a 5°C. Em seguida, foram incubados com o tampão contendo a enzima de restrição a 5°C e, então, submetidos a clivagem com a enzima *SmaI* (New England Biolabs, EUA) a 25°C por 12 a 18 horas.

A corrida das bandas foi realizada em gel de agarose 1% imerso em TBE 0,5x no sistema CHEF-DR III (Bio - Rad Laboratories Inc., EUA) a temperatura de 14°C e corrente elétrica de 200 V (6 V/cm). O tempo de corrida foi aproximadamente 23 horas. Posteriormente, o gel foi corado com brometo de etídio 0,08 µL/mL e fotografou-se em sistema de fotodocumentação sob luz ultravioleta. Os perfis moleculares foram analisados através do programa *Bionumerics* versão 5.0 (Applied Maths, Bélgica).

Esse ensaio também foi realizado em colaboração com o Laboratório Especial de Microbiologia Clínica (LEMC/ALERTA) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) por supervisão da Prof.^a Dr.^a Ana Cristina Gales e do Prof. Dr. Rodrigo Cayô. Os resultados obtidos forneceram o padrão de similaridade molecular das linhagens analisadas, a fim de descartar a possibilidade de contaminação das amostras.

4.9 PERFIL DE CRESCIMENTO DAS LINHAGENS DERIVADAS

A partir do experimento de exposição à vancomicina, duas linhagens derivadas da ATCC 29213 foram escolhidas para dar continuidade as análises de tolerância/persistência. Então, as linhagens derivadas E10.6 e E100 foram selecionadas, respectivamente, com maior tempo de exposição à vancomicina e maior concentração de vancomicina exposta, a fim de avaliar possíveis alterações ao longo do crescimento bacteriano. A linhagem parental ATCC 29213 foi utilizada como controle do teste.

O ajuste de inóculo bacteriano de cada amostra foi realizado conforme descrito no item 4.3. Em seguida, 200 μL do ajuste de cada amostra foram adicionados individualmente nas colunas da microplaca de 96 poços de fundo chato, a qual foi incubada sob agitação orbital (205 rpm) a 37 °C por 24 horas no aparelho EPOCH 2 *Microplate Spectrophotometer* (BioTek®, EUA). Como controle de esterilidade, distribuiu-se caldo BHI isento do ajuste bacteriano na última coluna da microplaca. Os valores de DO foram lidos no comprimento de onda de 600 nm em intervalos de 30 minutos, armazenados pelo *software* Gen5 do equipamento e recuperados após o término do ensaio para análise.

4.10 PERFIL DE CRESCIMENTO DAS LINHAGENS DERIVADAS SOB PRESSÃO SELETIVA DE VANCOMICINA

As linhagens derivadas E10.6 e E100 foram testadas em diferentes concentrações de vancomicina, a fim de testar o comportamento das linhagens derivadas, quanto a duração das fases de crescimento e velocidade de crescimento bacteriano, quando novamente na presença do fármaco.

As linhagens derivadas E10.6 e E100 foram ajustadas conforme descrito no item 4.3. Em seguida, em cada coluna, foram adicionados 100 μL do ajuste de cada amostra em microplaca de 96 poços de fundo chato. Então, partindo de uma solução estoque de 1000 $\mu\text{g/mL}$ de vancomicina, foram realizadas diluições seriadas duplicadas em caldo para obter cinco concentrações: 0,25 $\mu\text{g/mL}$, 0,5 $\mu\text{g/mL}$, 1,0 $\mu\text{g/mL}$, 10,0 $\mu\text{g/mL}$ e 50,0 $\mu\text{g/mL}$ de vancomicina.

Foram adicionados 100 μL de cada concentração ao longo das linhas da microplaca, de forma crescente. O primeiro tempo (T_0) foi lido imediatamente antes da adição do antimicrobiano e, então, a microplaca foi incubada a 37 °C, sob agitação orbital de 205 rpm no aparelho EPOCH 2 por 24 horas. As leituras de DO_{600} foram realizadas a cada 30 minutos, armazenadas pelo *software* Gen5 do equipamento e recuperadas após o término do ensaio para análise. Foram realizados dois experimentos independentes.

4.11 PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO DE DISCO DISUFÃO MODIFICADO

Primeiramente, o teste foi realizado em dois meios de cultura diferentes: ágar Mueller Hinton e ágar Luria Bertani (LB), preparado conforme o ANEXO A. Foram testados três antimicrobianos bactericidas de diferentes classes (vancomicina, oxacilina e ciprofloxacino) recomendados pelo CLSI (2018) para *S. aureus*, a fim de testar a presença de tolerância e/ou persistência e seus níveis. Por fim, foram testadas diferentes quantidades dos antimicrobianos (1 µg, 1,5 µg, 2 µg, 2,5 µg e 5 µg), de forma que a concentração alcançada no halo de inibição, após 24 horas de incubação, deveria estar abaixo dos valores de CIM (sub-CIM) das linhagens testadas. Esta condição é necessária viabilizar o teste, a fim de permitir o crescimento de colônias a partir da retirada do fármaco. Testou-se ainda se a adição de discos nutrientes de glicose após a retirada dos fármacos auxiliou no processo de crescimento de colônias.

Após os ensaios, definiu-se o ágar LB como meio de cultivo para o ensaio e as concentrações com melhor formação do halo de inibição foram de 2,5 µg para oxacilina e vancomicina, ao passo que foram utilizados 5 µg para ciprofloxacino. Não houve necessidade de suplementação com disco de glicose após a retirada do disco contendo antimicrobiano.

4.11.1 ENSAIO DE DISCO DIFUSÃO MODIFICADO

O princípio do teste é baseado na visualização do crescimento das células bacterianas tolerantes/persistentes, após a retirada do disco contendo antimicrobiano. Trata-se de uma modificação do método de Kirby-Bauer (BAUER, 1959), com o intuito de diferenciar linhagens sensíveis, tolerantes/persistentes e resistentes frente aos antimicrobianos bactericidas de interesse.

A fim de testar a hipótese de que concentrações de vancomicina são capazes de induzir o desenvolvimento de tolerância/persistência a antimicrobianos, realizou-se o ensaio de disco difusão modificado com base no protocolo de Gefen e colaboradores (2017), com modificações, ilustrado esquematicamente na figura 7.

Esse ensaio foi realizado com as linhagens derivadas E10.6, E100 e a linhagem parental ATCC 29213. As linhagens foram cultivadas em caldo BHI e incubadas a 37 °C por 24 horas, seguido de repique em ágar BHI por mesmo período de incubação. As amostras foram então ajustadas em solução de NaCl 0,9% até que, por leitura em que espectrofotômetro, a DO₆₀₀ atingisse valor próximo de 0,269, equivalente a $2,6 \times 10^8$ UFC/mL.

O ensaio é dividido em duas etapas: aplicação do disco de antimicrobiano e retirada do disco de antimicrobiano (Figura 7).

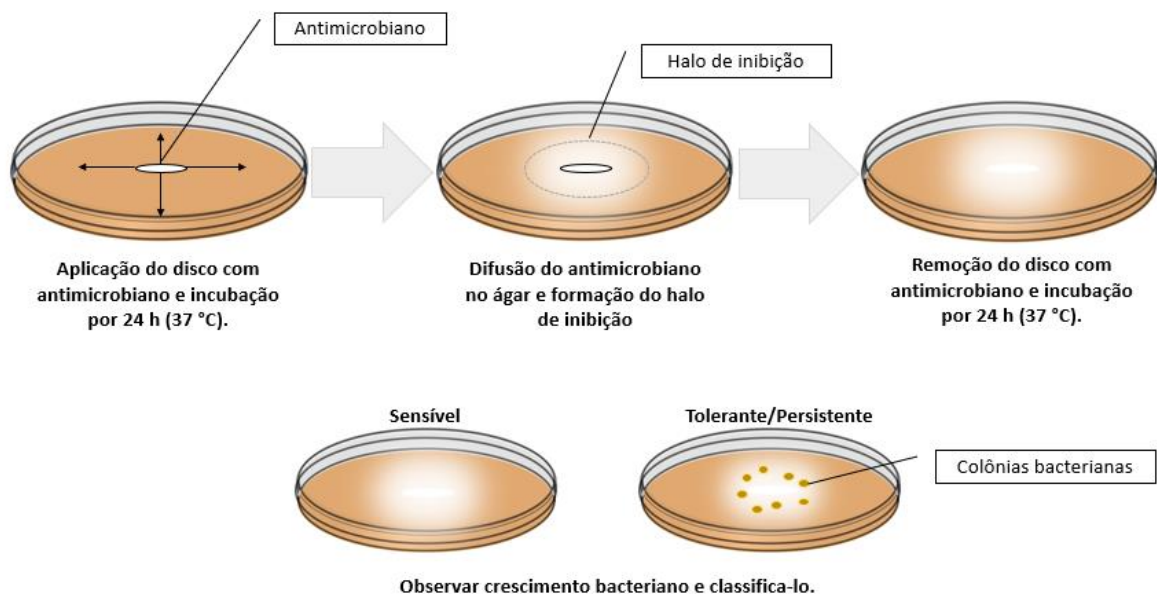


Figura 7 – Esquema de ensaio de disco difusão modificado para identificação de tolerância e/ou persistência.

Na primeira etapa, as amostras ajustadas foram semeadas, com swab de algodão, em meio sólido de forma a garantir que o ajuste fosse espalhado de forma homogênea por toda a placa em três sentidos diferentes. Esperou-se secar por 10 minutos. Após esse tempo, com auxílio de uma pinça metálica, adicionaram-se os discos impregnados com os antimicrobianos de interesse, previamente confeccionados e secos, com distância suficiente entre os discos para não gerar confluência de halos. A cada aplicação dos discos, utilizando a pinça metálica, delicadamente pressionou-se os discos para garantir a fixação dos mesmos e incubou-se a 37 °C por 24 h.

Após esse tempo, na segunda etapa, os discos impregnados com antimicrobianos foram retirados e as placas foram novamente incubadas (37 °C, 24 h). Ao final, as linhagens foram observadas quanto ao crescimento ou não de colônias e classificadas quanto aos níveis de tolerância/persistência de acordo com o número de colônias crescidas dentro do halo de inibição (Tabela 3).

Tabela 3 – Pontos de corte para a classificação dos níveis de tolerância/persistência.

Nível de Tolerância/persistência	Ponto de corte (número de colônias)
Baixo	0 – 10
Médio	10 – 100
Alto	> 100 ou tapete bacteriano

Fonte: Gefen et al. (2017).

4.12 ENSAIO DE CURVA DE MORTE

Foi realizado ensaio de curva de morte para a linhagem parental ATCC 29213 e sua derivada E10.6. Escolheu-se a concentração de 50 µg/mL de vancomicina considerando que os níveis séricos acima de 30 µg/mL são tóxicos.

Nesse ensaio foi realizada a quantificação do tempo mínimo em que 50 µg/mL de vancomicina levam para eliminar 99% da população bacteriana (MDK₉₉) e 99,99% da população bacteriana (MDK_{99,99}). A determinação foi conforme o protocolo proposto por Brauner e colaboradores (2016) com modificações. As análises foram realizadas em fases de crescimento diferentes (estacionária e *mid-log*), a fim de classificar tolerância e/ou persistência e seus subtipos.

4.12.1 Curva de morte em fase estacionária

A partir de uma cultura de 24 horas, foi realizado ajuste de inóculo, conforme item 4.3, e retirou-se uma alíquota de 100 µL para contagem de células viáveis e determinação inóculo bacteriano no tempo zero (T₀). Então, adicionou-se vancomicina em quantidade suficiente para que a solução obtivesse concentração final equivalente à 50 µg/mL e incubaram-se os tubos sob agitação (200 rpm por 6 h a 37°C).

A cada 60 minutos, foram retiradas alíquotas de 100 µL para diluição seriada em salina 0,9% na proporção de 1 : 10 (10^{-1} a 10^{-5}) e cultivo em ágar BHI por espalhamento com alça de Drigalski. Após incubação das placas (24 h, 37°C), foi realizada a contagem de células viáveis para determinação do MDK₉₉ (redução de 2 *log*) e do MDK_{99,99} (redução de 4 *log*).

4.12.2 Curva de morte em fase exponencial

Primeiramente, foi realizado ajuste do inóculo bacteriano, conforme o item 4.3 e incubação em 10 mL de meio BHI por 3,5 h, equivalente a fase *mid-log*, determinado no item 4.4. Após aguardar esse tempo, foi adicionado vancomicina na concentração equivalente à 50 µg/mL. Imediatamente antes da adição do antimicrobiano, foi retirada uma alíquota de 100 µL para contagem de células viáveis e determinação exata do inóculo bacteriano para o cálculo de redução da população.

A cultura foi monitorada por 6 h após a adição do antimicrobiano, com retirada de uma alíquota de 100 µL para diluição seriada e cultivo em ágar BHI. As placas foram incubadas por 24 h, a 37°C foi realizada a contagem de células viáveis para determinação de do MDK₉₉ (redução de 2 *log*) e do MDK_{99,99} (redução de 4 *log*).

4.13 AJUSTE DE INÓCULO PARA OS ENSAIOS DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA, POTENCIAL ZETA DE MEMBRANA E AUTÓLISE POR TRITON X-100

A necessidade de maior quantitativo de células para os ensaios de peroxidação lipídica, potencial Zeta (PZ) de membrana e autólise por Triton X-100 exigiu alteração ajuste de inóculo bacterianos das linhagens derivadas de interesse.

Foi realizado ajuste bacteriano das linhagens parental ATCC 29213 e derivada E10.6 de acordo com a escala 2,0 McFarland (6×10^8 UFC/mL) em 6 mL de salina 0,9 %. Posteriormente, 1 mL do ajuste foi diluído em 10 mL caldo BHI (1: 10), alcançando inóculo final de, aproximadamente, 6×10^7 UFC/mL. As culturas foram incubadas durante 1,5 horas (37 °C) até que atingissem fase exponencial de crescimento. Após esse tempo, cada amostra foi dividida em dois frascos nomeados como controle e

tratado. Apenas a amostra tratada foi colocada na presença de 10 µg/mL de vancomicina e foi incubada por mais 1 hora (37 °C).

Os ensaios de peroxidação lipídica e potencial Zeta foram realizados em parceria com a Prof.^a Dr.^a Gabriella Freitas Ferreira da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) – Campus Governador Valadares, MG.

4.13.1 Ensaio de peroxidação lipídica

Para avaliar os níveis de estresse oxidativo na linhagem parental ATCC 29213 e sua linhagem derivada E10.6 foram determinados os níveis de peroxidação lipídica, a partir do ataque de radicais livres de oxigênio (ROS, do inglês *Reactive Oxygen Species*) a lipídios em sua composição. A degradação oxidativa de ácidos graxos polinsaturados gera o malonaldeído (MDA, do inglês *Malondialdehyde*), comumente quantificado por reação com ácido tiobarbitúrico e expresso como total de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS, do inglês *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*).

Os produtos da peroxidação lipídica foram determinados por TBARS, conforme protocolo de Ferreira et al. (2013) com modificações. Após preparo do inóculo conforme item 4.13, as células de cada tubo foram sedimentadas por centrifugação a 816 g (modelo TJ-6, Beckman Instruments, EUA) durante 5 minutos e lavadas em solução de NaCl 0,9%, por 3 vezes, para retirada resíduos. Feito isso, o sedimento celular foi ressuspenso em 1000 µL de ácido fosfórico a 1,1%. Foram misturados 400 µL deste homogenato com 400 µL de ácido tiobarbitúrico (Sigma-Aldrich®) a 1% e 200 µL de ácido fosfórico a 7%. Todas as soluções foram mantidas em gelo durante a manipulação.

Posteriormente, as amostras foram aquecidas durante 60 minutos a 98 °C e depois, resfriadas em freezer (-20 °C). Em seguida, foram adicionados 2200 µL de 1-butanol (Merck®) à mistura e homogeneizou-se vigorosamente. Por fim, centrifugou-se a solução (5 minutos a 816 g) para separação da camada orgânica. Retirou-se cuidadosamente a camada superior e realizou-se leitura em espectrofotômetro UV-

Visível modelo UV-M51 (Bel Photonics) no comprimento de onda de 532 nm. O 1-butanol foi utilizado como branco.

Os valores das médias e desvios são referentes a três repetições em um único experimento independente. A relevância estatística foi analisada por teste *t* de *student* para os pares controle e tratado de cada linhagem.

4.13.2 Determinação do potencial Zeta de membrana

Para avaliar o efeito da exposição à vancomicina em relação a carga de superfície foi realizado determinação do potencial Zeta (PZ) da linhagem parental ATCC 29213 e sua linhagem derivada E10.6, conforme Ferreira et al., 2015.

Para a realização do teste, inicialmente, as linhagens foram preparadas conforme item 4.13. Em seguida, as células foram sedimentadas por centrifugação a 816 *g* durante 5 minutos e lavadas em solução de NaCl 0,9%, por 3 vezes, para retirada de resíduos. O PZ foi determinado pela técnica de micro-eletroforese *laser Doppler* utilizando o equipamento Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical Ltd, Inglaterra) a 25 °C, em ângulo de dispersão de 173°, usando um capilar dobrado de célula (DPS1060). Os resultados foram recuperados a partir do *software* Peltier acoplado ao equipamento.

Os valores representam as médias e os desvios de doze repetições em um experimento independente. A análise de relevância estatística foi obtida por teste *t* de *student* para os pares controle e tratado de cada linhagem.

4.13.3 Ensaio de autólise por Triton X-100

O ensaio de autólise foi realizado, conforme Peng et al. (2017) com modificações, para a linhagem parental ATCC 29213, suas linhagens derivadas E10.6, E100 e a linhagem Mu3 (hVISA). A linhagem Mu3 foi utilizada nesse ensaio como controle de persistência. O objetivo deste ensaio foi avaliar a taxa de lise celular por utilização do surfactante aniônico Triton X-100.

Após preparo das linhagens conforme item 4.13, as células foram sedimentadas por centrifugação a 816 *g* durante 5 minutos e lavadas em solução de NaCl 0,9%, por 3 vezes, para retirada de resíduos. O sedimento celular foi ressuspensionado em tampão Tris-HCl a 0,05 mol/L até que os valores de $DO_{600} \approx 1,0$ para as amostras. Os valores de DO_{600} inicial (DO_0) foram medidos para cada amostra e anotados. Em seguida, adicionou-se solução de Triton X-100 a 0,05% (v/v) e incubaram-se as amostras a 37 °C com agitação orbital (150 rpm). Após 24 horas, foi mensurada a DO_{600} (DO_{24}) de todas as amostras. O percentual de autólise foram calculados conforme Kim e outros (2012), em que a taxa de autólise é dada por $TA = [(OD_0 - OD_{24})/OD_0] \times 100$.

Os valores obtidos representam os dados de um experimento independente. As médias e os desvios obtidos para cada linhagem são referentes a duas repetições de um mesmo ensaio. A relevância estatística foi analisada por teste ANOVA de duas vias para os pares controle e tratado de cada linhagem.

4.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Nosso estudo parte da hipótese alternativa de que concentrações subterapêuticas de vancomicina induzem tolerância e persistência em *S. aureus*, cujas variáveis dependentes (qualitativa) são tolerância e persistência e as variáveis independentes (quantitativas) são as concentrações subterapêuticas de vancomicina. A hipótese nula é que concentrações subterapêuticas de vancomicina não induzem tolerância e persistência.

As análises estatísticas foram realizadas com o software *Prism* 6 para Windows (GraphPad Prism® versão 6.01, 2012) considerando o nível de significância igual a 95% ($p > 0,05$). Os ensaios foram avaliados quanto à relevância estatística por teste *t* de *student* e ANOVA de duas vias.

5 RESULTADOS

5.1 PERFIL DE CRESCIMENTO DA LINHAGEM PARENTAL

A linhagem parental ATCC 29213 apresentou o tempo médio de, aproximadamente, 6 h para alcançar a fase estacionária e 3,5 h para alcançar a fase *mid-log*, ou seja, metade da fase exponencial (Figura 8). Esse tempo foi utilizado como tempo de referência para adição de vancomicina nos ensaios de exposição e curva de morte.

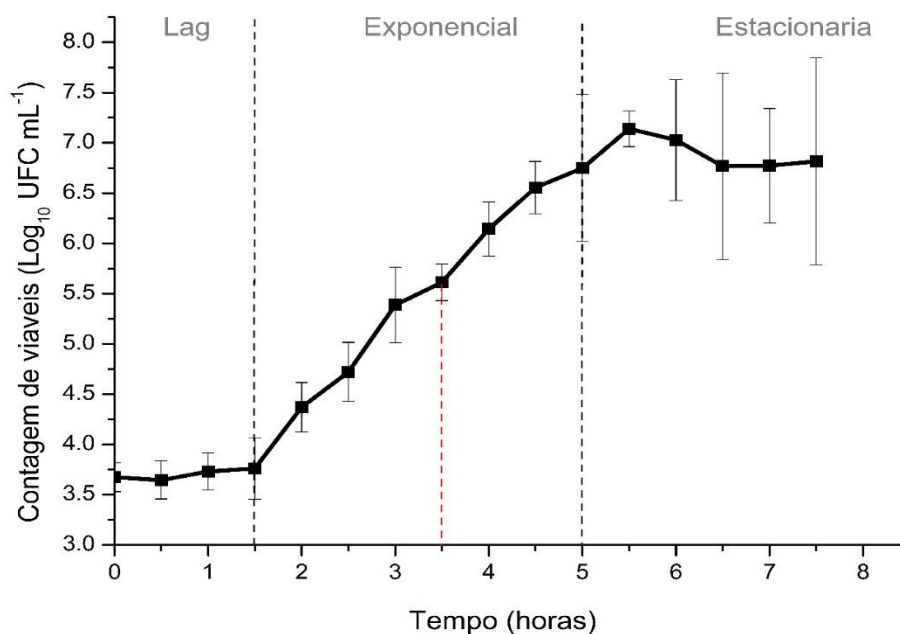


Figura 8 - Curva de crescimento da linhagem parental ATCC 29213 (inóculo = 10⁴ UFC/mL), contagem de colônias (Log₁₀ UFC/mL) versus tempo (horas). Linha vermelha representa o tempo de metade da fase exponencial. Os valores representam as médias aritméticas e os desvios de dois experimentos independentes.

Seu tempo médio de geração (t_d) foi de, aproximadamente, 26 minutos, o qual foi obtido a partir da média aritmética dos resultados de duas repetições técnicas (Equações 1 e 2).

$$n = \frac{(\log N_f - \log N_0)}{\log 2} \quad (1)$$

$$n = \frac{(\log 10^7 - \log 10^3)}{\log 2}$$

n=13,28

$$td = \frac{\text{tempo decorrido } (t)}{\text{número de gerações } (n) \text{ no tempo } t} \quad (2)$$

$$td = \frac{60 \frac{\text{min}}{\text{h}} \times 5,5 \text{ h}}{13,28}$$

$$td = 24,85 \text{ min/geração}$$

Logo, a média dos dois experimentos resultou em tempo de geração igual a 26,04 minutos (Equação 3).

$$td = \frac{24,85 + 27,23}{2}$$

(3)

$$td = 26,04 \text{ min/geração}$$

A taxa média de crescimento (k) dada pelo valor de “ a ” da equação da reta $f(x) = ax + b$, da fase *log*. Assim, através da regressão linear dos pontos correspondentes a fase exponencial (1,5 h - 4,5 h) encontramos a equação da reta $f(x) = 0,0132x + 2,4825$, cujo valor de “ a ” indica taxa de crescimento média igual a 0,0132 (Figura 9). O coeficiente de correlação linear (R^2) igual a 0,9894 garante uma boa linearidade dos pontos médios da fase exponencial, logo é possível prever o crescimento celular de forma linear a partir da equação da reta geração na fase *log*.

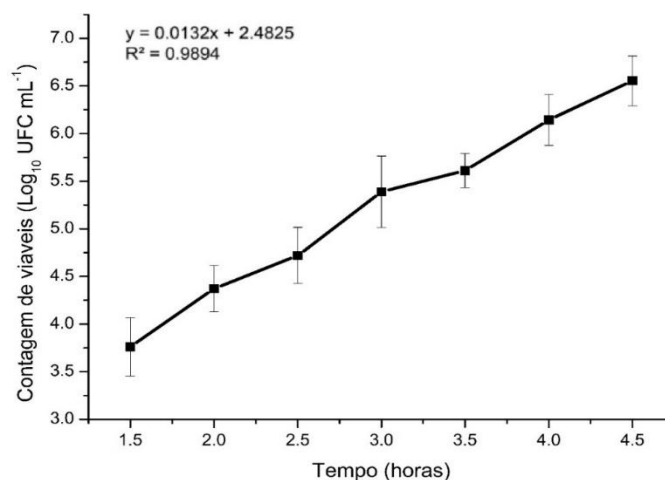


Figura 9 – Equação da reta da fase *log* de crescimento da linhagem parental ATCC 29213.

5.2 ENSAIO DE EXPOSIÇÃO À VANCOMICINA

O tratamento de quatro amostras clínicas e da linhagem ATCC 29213 com 10 µg/mL de vancomicina, durante seis horas, não alterou significativamente a contagem de células viáveis em relação ao inóculo inicial (T_0) ($p > 0,05$) (Figura 10 e 11). Isoladamente, o quantitativo de células viáveis após o tratamento não obedeceu a um padrão, em nenhuma das cinco amostras, por seis experimentos independentes.

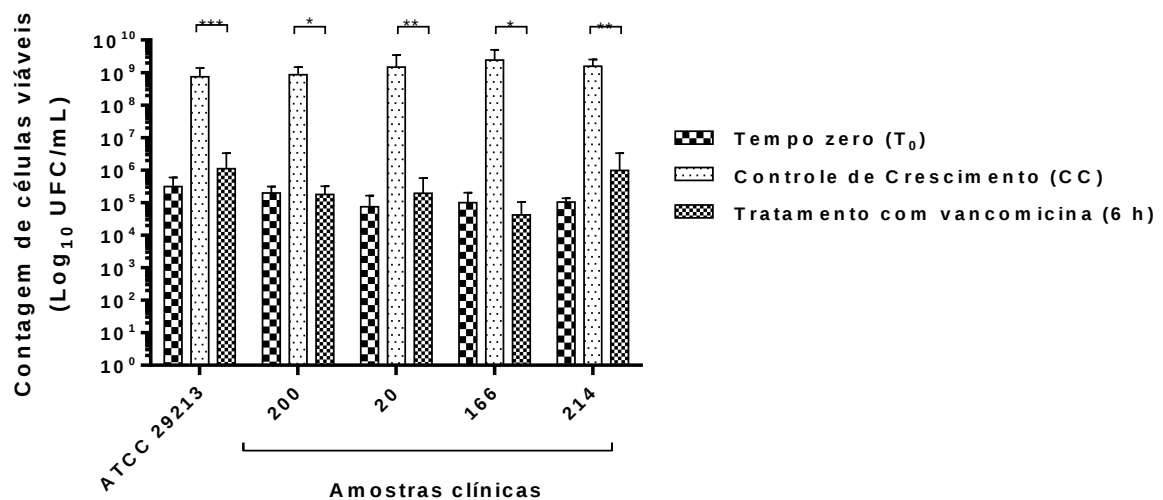


Figura 10 – Efeito de vancomicina sobre o número de células viáveis de *S. aureus* (10⁴ UFC/mL) após 6 horas de exposição. A contagem de viáveis foi realizada no tempo zero (T_0) e no tempo seis horas (T_6) nos tubos contendo vancomicina (10 µg/mL) e nos tubos sem vancomicina denominados controle de crescimento (CC). No eixo x estão dispostas a linhagem ATCC 29213 e as amostras clínicas 20, 166, 200 e 214. Os valores plotados representam as médias aritméticas e os desvios de seis experimentos independentes.

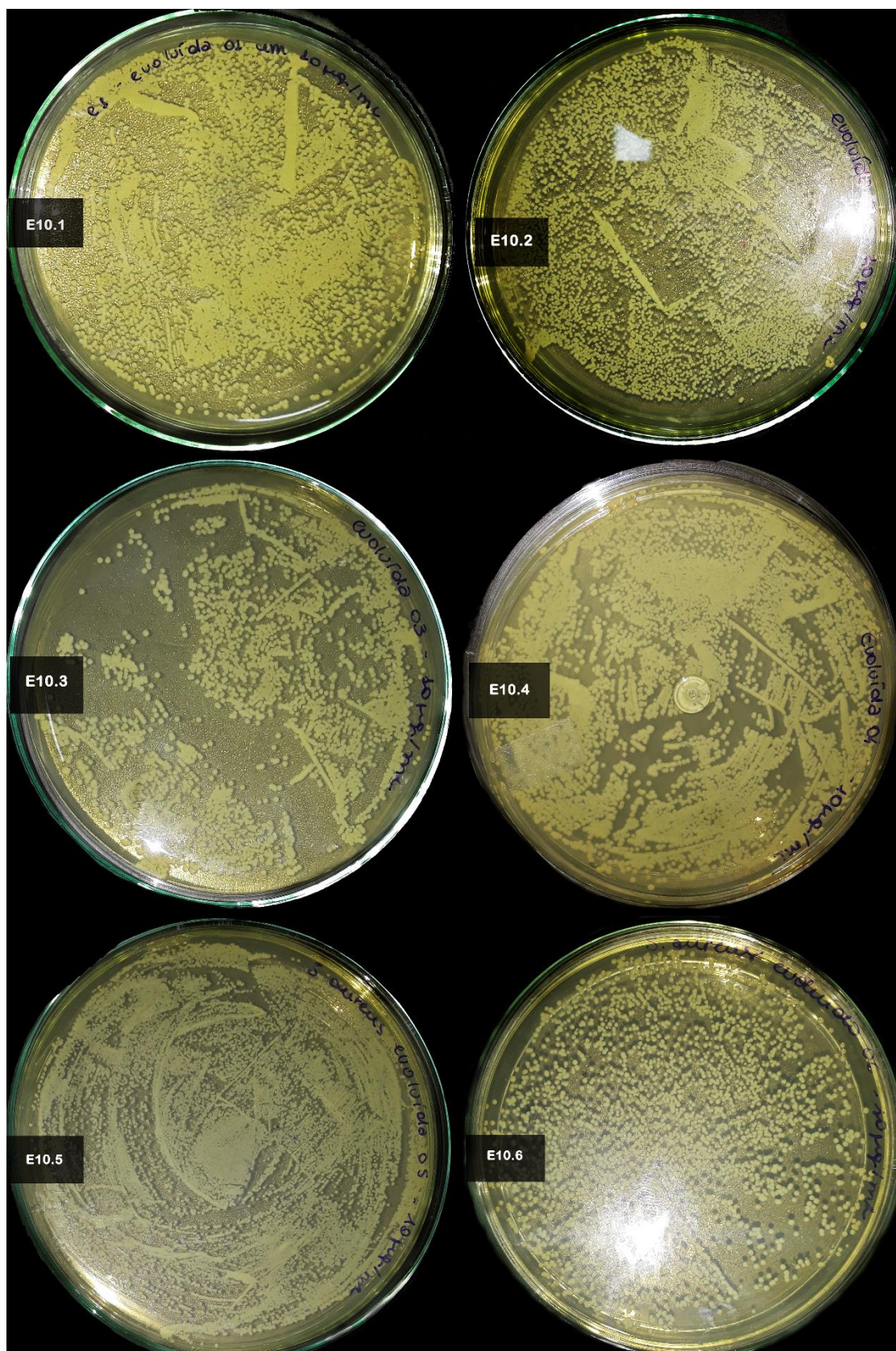


Figura 11 - Cultivos das linhagens derivadas (E10.1 – E10.6) após exposição intermitente por 6 horas em 10 µg/mL de vancomicina.

Além disso, a linhagem ATCC 29213 também sobreviveu na presença de 100 µg/mL de vancomicina por 6 horas (Figura 12).



Figura 12 – Cultivo da linhagem derivada E100 após 6 horas de exposição em 100 µg/mL de vancomicina.

Para cada amostra exposta foram obtidas seis linhagens derivadas, com exceção da linhagem ATCC 29213 com sete linhagens derivadas. Considerando a aleatoriedade da sobrevivência em *S. aureus* dos diferentes pulsotipos, para dar continuidade aos testes, escolheu-se a linhagem parental ATCC 29213 e suas linhagens derivadas, devido a sua ampla utilização em rotina laboratorial como linhagem de referência e por sua susceptibilidade à vancomicina bem definida.

5.3 ENSAIO DE SUSCEPTIBILIDADE À VANCOMICINA

O tratamento com vancomicina, por seis horas, não foi capaz de alterar a susceptibilidade das linhagens derivadas à vancomicina. Considerando a variação de $\pm 1,0$ valor de CIM prevista pela técnica (CLSI, 2018), os valores das médias geométricas de CIM e de CBM foram iguais entre as linhagens parental ATCC 29213

e derivadas. Sendo assim, todas as linhagens são sensíveis à vancomicina (VSSA) de acordo com a classificação do manual CLSI (2018).

Além disso, as linhagens derivadas apresentaram valores de CBM próximos aos valores de CIM para vancomicina, logo o resultado da razão CBM/CIM de todas as amostras encontra-se próximo 1,0 (Tabela 4).

Tabela 4 - Valores de CIM e CBM, após exposição à vancomicina (10 µg/mL e 100 µg/mL), e razão CBM/CIM das linhagens derivadas. O controle utilizado para o teste foi a linhagem ATCC 29213. Os valores dispostos na tabela representam as médias geométricas de dois experimentos independentes.

Amostras	CIM	CBM	CBM/CIM
ATCC 29213	0,5	0,7	1,4
E10.1	0,7	1,0	1,4
E10.2	1,0	1,0	1,0
E10.3	1,0	1,0	1,0
E10.4	1,4	1,4	1,0
E10.5	1,0	1,0	1,0
E10.6	1,0	1,0	1,0
E100	1,0	1,0	1,0

Uma característica fenotípica observada durante o cultivo em ágar BHI, para determinação dos valores da CBM, foi a redução do tamanho das colônias ao longo das concentrações e a pigmentação amarela menos intensa.

Além disso, observou-se crescimento das linhagens derivadas E10.6 e E100 em concentrações de 8 µg/mL e 16 µg/mL de vancomicina. Por esse motivo, estas duas linhagens foram escolhidas para dar continuidade aos ensaios.

5.4 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS ACOPLADO À ANALISADOR DE TEMPO DE VÔO

A identificação molecular das linhagens parental ATCC 29213 e derivadas E10.6 e E100, foi confirmada quanto ao gênero e espécie por espectrometria de massas por MALDI-TOF. Todas as linhagens apresentaram valor de *score* superior a 2,30, que,

de acordo com o banco de dados, é confirmatório para a espécie *Staphylococcus aureus* (Tabela 5).

Tabela 5 – Identificação da linhagem parental ATCC 29213 e das linhagens derivadas baseada nos valores de *score* por espectroscopia de massas por MALDI-TOF.

AMOSTRAS	SCORE	IDENTIFICAÇÃO
ATCC 29213	2,436	<i>Staphylococcus aureus</i>
E10.6	2,438	<i>Staphylococcus aureus</i>
E100	2,411	<i>Staphylococcus aureus</i>

Score $\geq 2,30$: Confiável quanto a gênero e espécie (conforme especificado em tabela 2, item 4.7).

5.5 PADRÃO DE CLONALIDADE POR ELETROFORESE EM GEL DE CAMPO PULSADO

O mesmo padrão de similaridade dos fragmentos de DNA, número e tamanho, foi encontrado nos canais de eletroforese para as linhagens parental ATCC 29213 e derivada E10.6 (Figura 13).

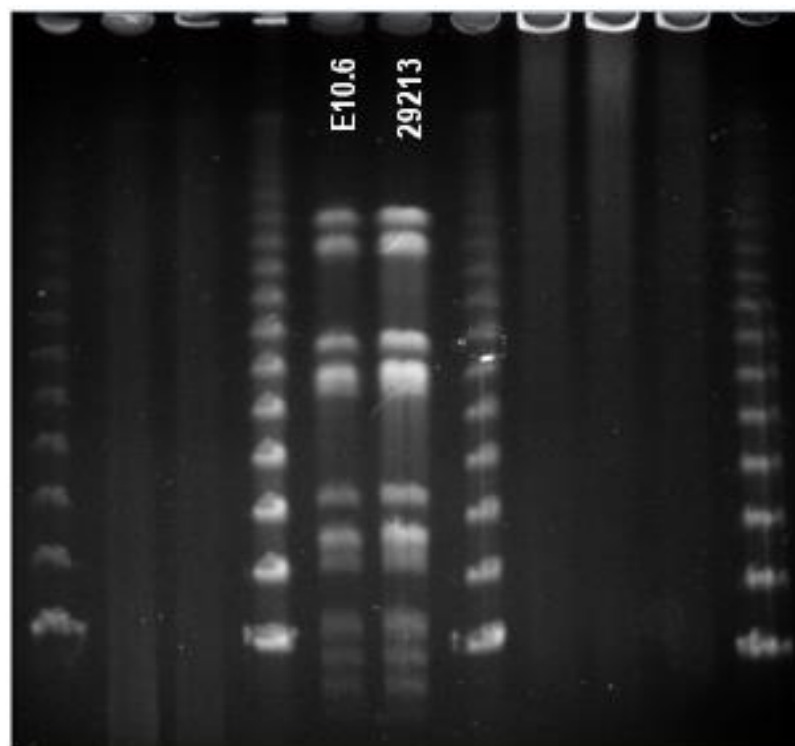


Figura 13 - Padrão de bandas da linhagem parental ATCC 29213 e da linhagem derivada E10.6, em gel de agarose, após corrida de 24 horas, em cuba de eletroforese por campo pulsado.

5.6 PERFIL DE CRESCIMENTO DAS LINHAGENS DERIVADAS

A cinética de crescimento das linhagens derivadas E100 e E10.6 não foi alterada após a exposição à vancomicina, portanto apresentaram cinética de crescimento igual à linhagem parental ATCC 29213, com duração de aproximadamente 2,5 horas de fase *lag* e cerca de 7 horas de fase exponencial (Figura 14).

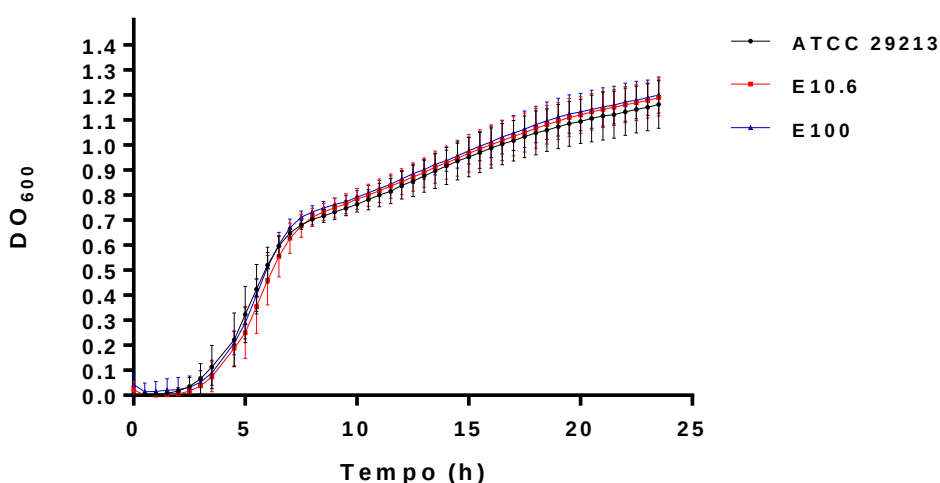


Figura 14 - Curva de crescimento gerada por leitura de densidade óptica em comprimento de onda de 600 nm (DO₆₀₀) *versus* tempo (h) para a linhagem parental ATCC 29213 e suas derivadas E10.6 e E100. Os dados representam as médias aritméticas das densidades ópticas e os desvios de oito repetições.

5.7 PERFIL DE CRESCIMENTO DAS LINHAGENS DERIVADAS SOB PRESSÃO SELETIVA DE VANCOMICINA

Em concentrações sub-CIM de vancomicina (Figura 15A e 15B), de maneira geral, observou-se perfil de crescimento semelhante entre as linhagens derivadas e a linhagem parental. Em relação à curva de crescimento sem pressão seletiva, uma pequena extensão da fase *lag* foi observada em todas as linhagens para 5 horas e 7 horas, respectivamente em 0,25 µg/mL e 0,5 µg/mL.

Além disso, as linhagens derivadas apresentaram discreto aumento da fase exponencial em relação à linhagem parental (Figura 15A). A partir da concentração equivalente a 1,0 µg/mL de vancomicina, aparentemente, as linhagens foram inibidas,

pois as alterações nas leituras de DO_{600} foram muito próximas de zero, isto é, indicativas de crescimento celular baixo ou ausente (Figuras 15C, 15D e 15E).

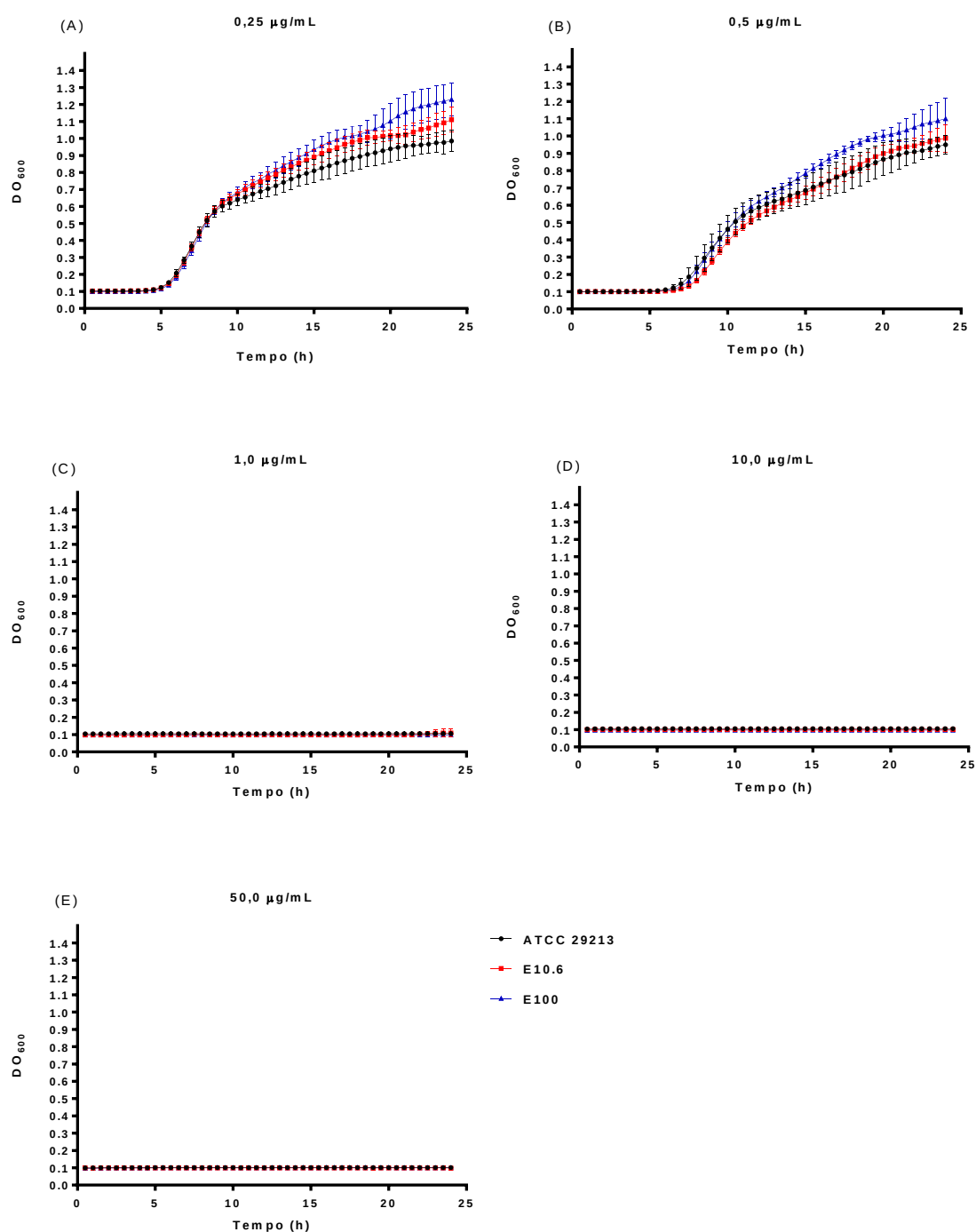
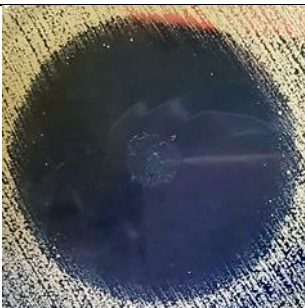
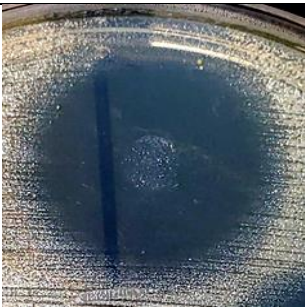
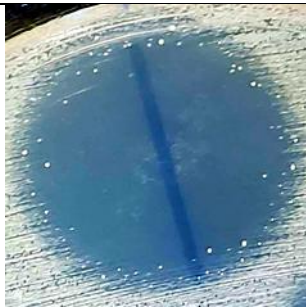
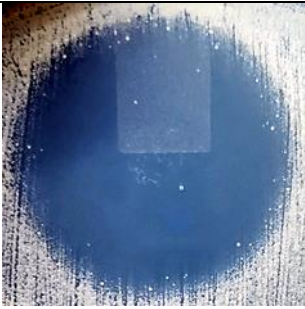
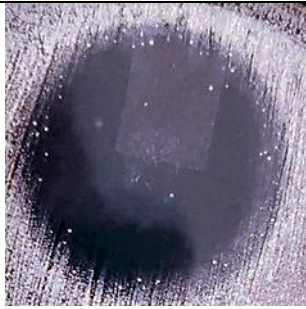


Figura 15 – Curvas de crescimento das linhagens derivadas E10.6 e E100 e da linhagem parental ATCC 29213 na presença de diferentes concentrações de vancomicina: (A) 0,25 $\mu\text{g/mL}$, (B) 0,5 $\mu\text{g/mL}$, (C) 1,0 $\mu\text{g/mL}$, (D) 10,0 $\mu\text{g/mL}$ e (E) 50 $\mu\text{g/mL}$. Os dados representam as médias aritméticas das densidades ópticas e desvios de dois experimentos independentes.

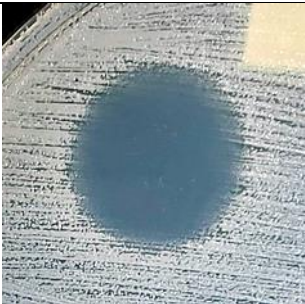
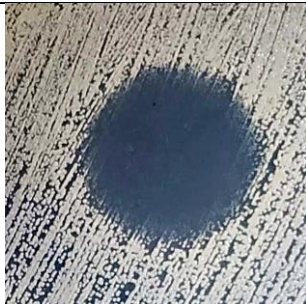
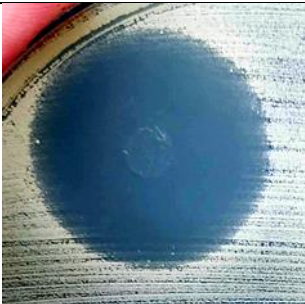
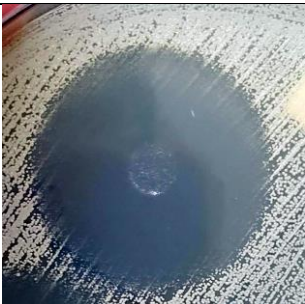
5.8 ENSAIO DE DISCO DIFUSÃO MODIFICADO

A linhagem parental ATCC 29213 e suas derivadas E10.6 e E100 apresentaram recrescimento para oxacilina e ciprofloxacino em ágar LB (Quadro 1 e 2). Entretanto, não foi possível avaliar tolerância/persistência para vancomicina, pois o halo de inibição formado foi muito pequeno (ANEXO C). Conforme os critérios qualitativos de Gefen e colaboradores (2017), todas as linhagens testadas em ágar LB foram classificadas com alta tolerância/persistência para oxacilina e para ciprofloxacino.

Quadro 1 – Crescimento de colônias após a retirada do disco contendo oxacilina 2,5 µg em E10.6, E100 e ATCC 29213.

Amostras	Oxacilina 2,5 µg	
	24 h	72 h
ATCC® 29213™		
E10.6		
E100		

Quadro 2 – Crescimento de colônias após a retirada do disco contendo ciprofloxacino 5,0 µg em E10.6, E100 e ATCC 29213.

Amostras	Ciprofloxacino 5,0 µg	
	24 h	72 h
ATCC® 29213™		
E10.6		
E100		

Observou-se que a linhagem E100 apresentou maior tolerância/persistência à ciprofloxacino, enquanto a linhagem derivada E10.6 apresentou maior tolerância à oxacilina. Todavia, esses resultados não foram estatisticamente significativos ($p > 0,05$) (Figura 16).

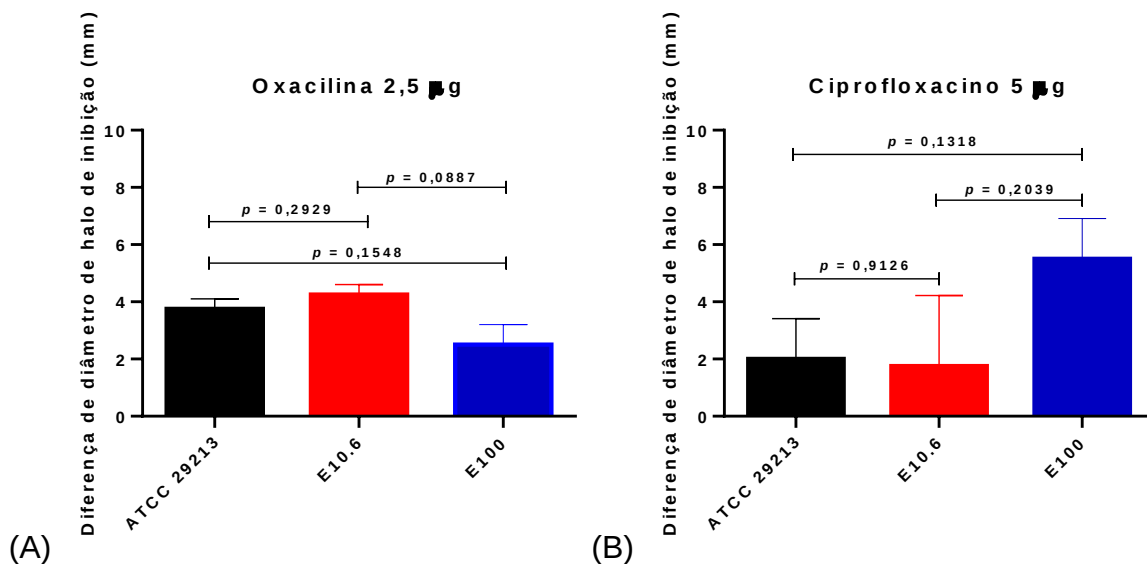
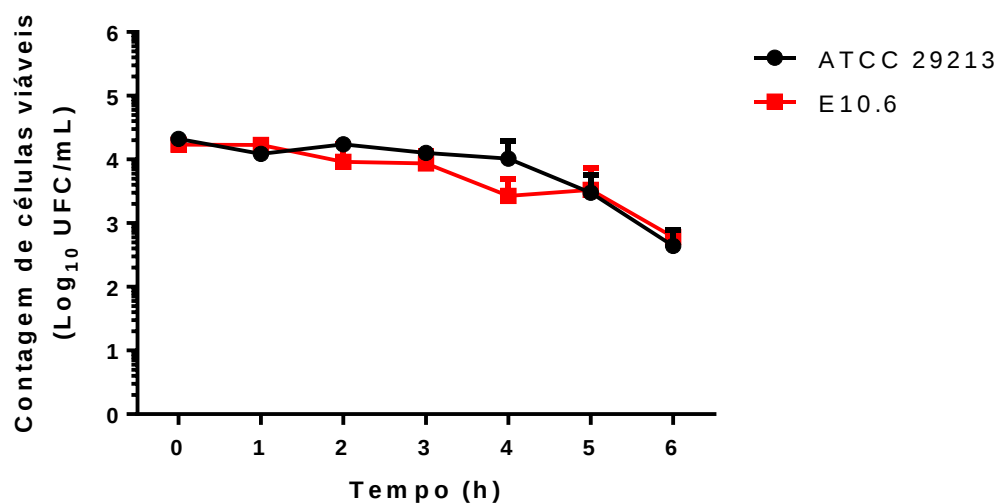


Figura 16 - Diferenças de diâmetro de halo de inibição (mm) antes e após a retirada do disco de antimicrobiano ($T_{72} - T_{24}$) para cada linhagem. A linhagem parental ATCC 29213 foi utilizada como controle do teste. Os dados representam as médias aritméticas e os desvios das diferenças dos halos de inibição de dois experimentos independentes para oxacilina (A) e ciprofloxacino (B). Os resultados não apresentaram diferença significativa em teste *t* de student ($p > 0,05$).

5.9 ENSAIO DE CURVA DE MORTE

A cinética de morte das linhagens parental ATCC 29213 e derivada E10.6, durante seis horas de exposição à 50 µg/mL de vancomicina, revelou o mesmo nível de sobrevivência para ambas as linhagens (Figura 17). Embora o MDK_{99,99} não tenha sido determinado em fase *lag* (MDK_{99,99} > 6h), em fase exponencial observamos, para ambas as linhagens, MDK₉₉ próximo de 6 horas. Portanto, não foi possível classificar as linhagens quanto aos subtipos de tolerância e/ou persistência tempo-dependente, isto é, por *lag* ou crescimento lento.

(A) Estacionária



(B) Exponencial

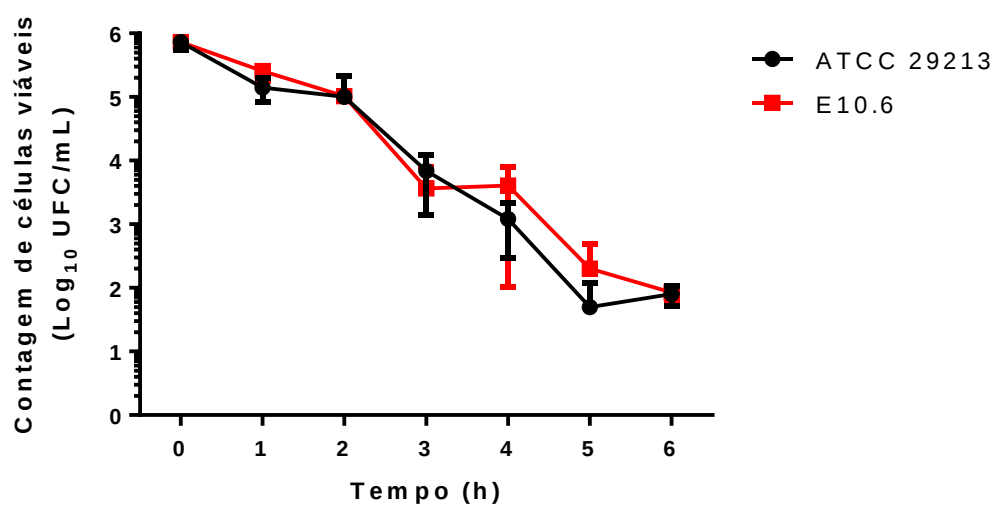


Figura 17 - Cinética de morte das linhagens ATCC 29213 e derivada E10.6. As culturas em inóculo inicial de 10^4 UFC/mL foram expostas a 50 $\mu\text{g/mL}$ de vancomicina em fase estacionária (A) e na fase exponencial (B) durante 6 horas. Os dados representam as médias aritméticas e os desvios de dois ensaios independentes.

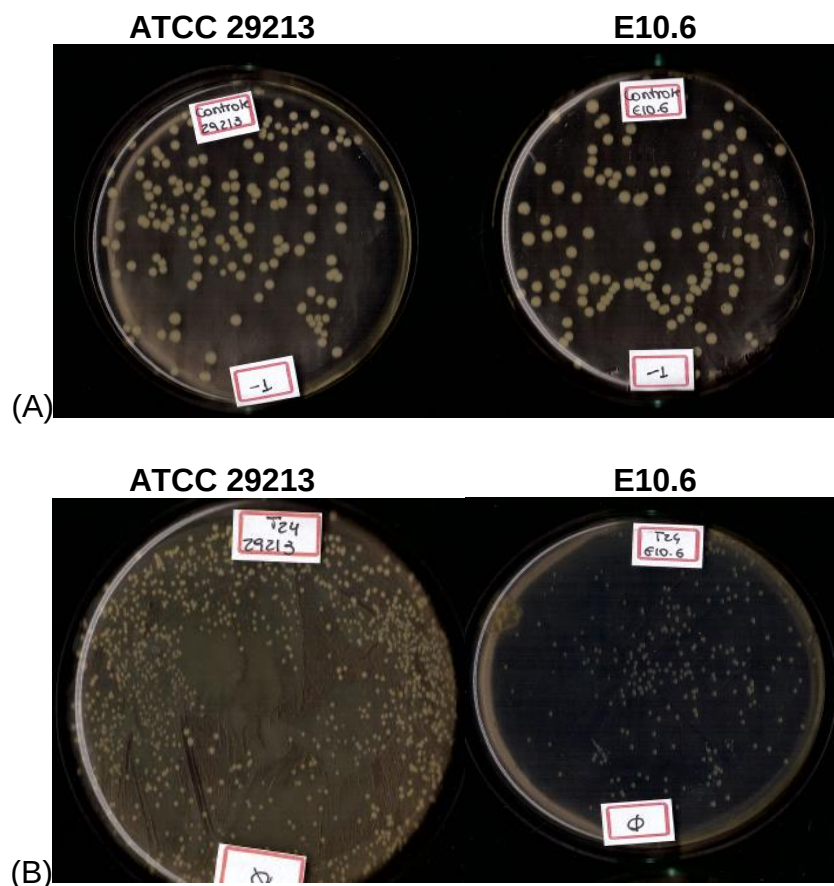


Figura 18 – Colônias com fenótipo regular em (A) e com fenótipo alterado (*Small colony variants*) em (B) após 24 horas de exposição à 50 µg/mL de vancomicina em ágar BHI.

5.10 ENSAIO DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

Os níveis basais de peroxidação lipídica foram de, aproximadamente, 1300 e 1200 nmol de TBARS para a linhagem parental ATCC 29213 e derivada E10.6, respectivamente. Após o tratamento com 10 µg/mL de vancomicina por 1 h, os níveis de peroxidação lipídica foram elevados para 1710 e 1628 nmol de TBARS, respectivamente, com relevância estatística ($p < 0,05$) (Figura 19).

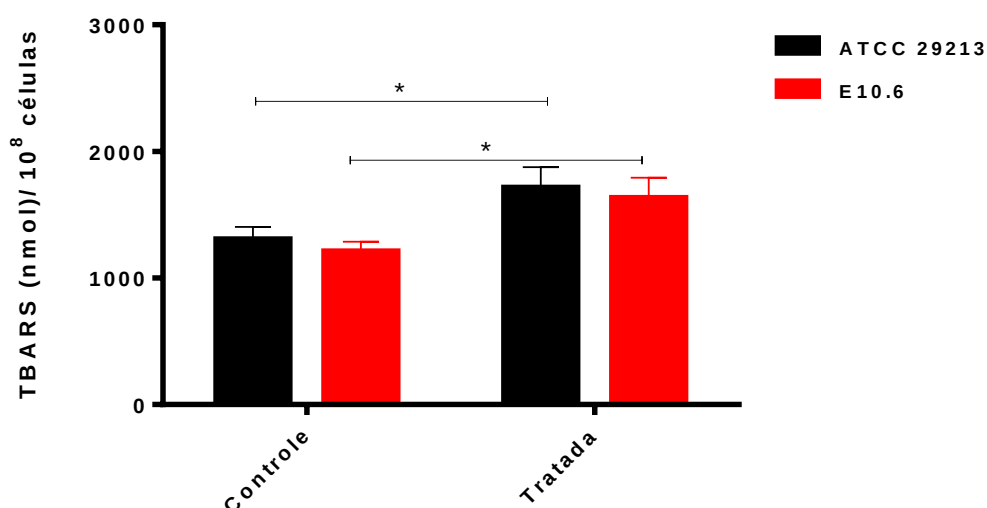


Figura 19 – Peroxidação lipídica da linhagem parental ATCC 29213 e evoluída E10.6. Os níveis de TBARS foram medidos em duas condições: sem tratamento (par controle) e após tratamento com 10 µg/mL de vancomicina por 1 h (par tratado). Os valores de TBARS foram calculados utilizando a fórmula $A = \epsilon \cdot c \cdot l$, em que A é o valor lido de absorvância para a amostra, c representa o caminho óptico (1 cm) e ϵ o coeficiente de extinção molar ($156 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Os pares, controle e tratado, foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$), respectivamente $p = 0,0219$ e $p = 0,0217$. Os dados representam as médias aritméticas e os desvios de três repetições de um experimento independente.

5.11 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ZETA DE MEMBRANA

A carga de superfície da linhagem derivada E10.6 apresentou-se significativamente mais negativa quando comparada à linhagem parental ATCC 29213, antes e após o tratamento com vancomicina (1 hora) ($p < 0,05$) (Figura 20).

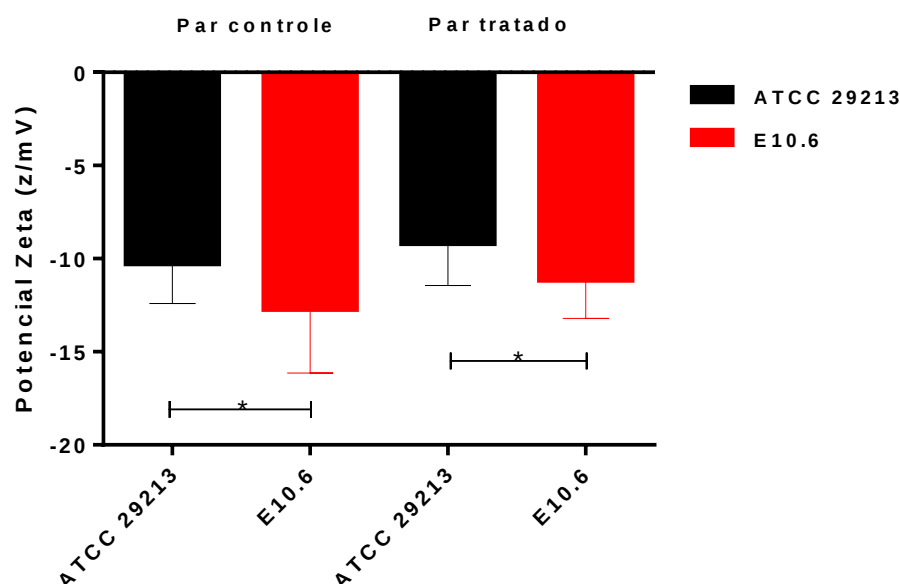


Figura 20 – Carga de superfície determinada por medida de potencial Zeta (z/mV) da linhagem parental ATCC 29213 e evoluída E10.6 em duas condições: sem tratamento (par controle) e após tratamento com 10 µg/mL de vancomicina por 1 hora (par tratado). Os pares, controle e tratado, foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$), respectivamente $p = 0,0482$ e $p = 0,0369$. Os dados representam as médias aritméticas e os desvios de doze repetições de um experimento.

5.12 ENSAIO DE AUTÓLISE POR TRITON X-100

O percentual de autólise induzido por Triton X-100 foi avaliado em relação ao percentual de DO_{600} inicial, conforme Peng e outros (2017). O tratamento com vancomicina (10 µg/mL) por 1 h aumentou significativamente os percentuais de autólise para as linhagens ATCC 29213, E10.6 e Mu3 (hVISA) ($p < 0,05$) (Figura 21).

A linhagem derivada E100 apresentou menor percentual de autólise em relação às outras linhagens testadas, incluindo o controle hVISA, tanto em condição basal, como após o tratamento com vancomicina, porém esse dado não apresentou relevância significativa ($p > 0,05$).

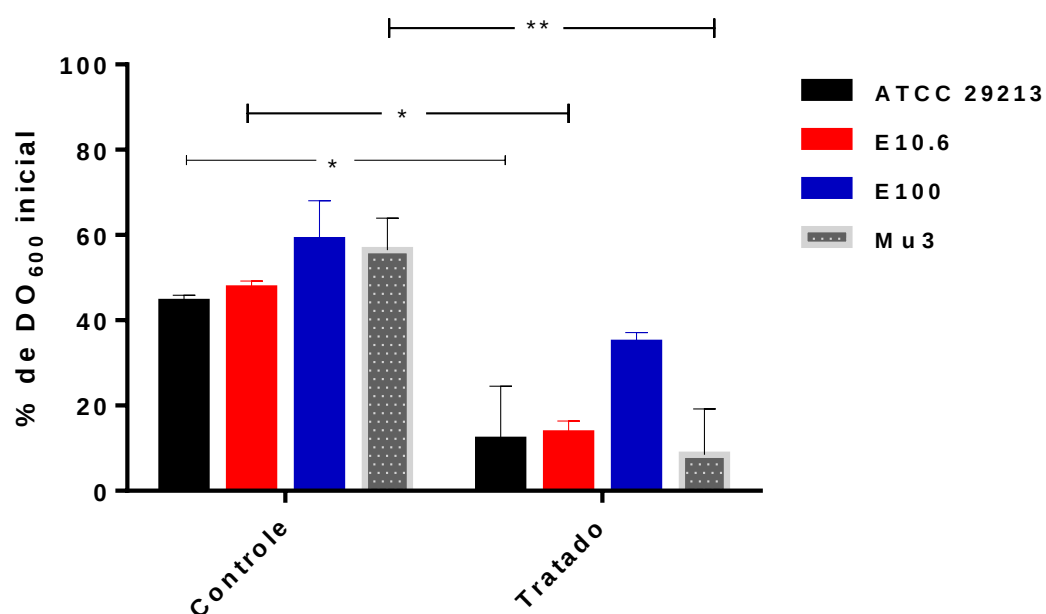


Figura 21 - Atividade autolítica de Triton X-100 sobre as linhagens parental ATCC 29213 e derivadas (E10.6 e E100), bem como o controle Mu3 (hVISA), em duas condições: sem tratamento (controle) e após tratamento com 10 $\mu\text{g/mL}$ de vancomicina por 1 hora (tratado). A autólise foi observada a partir da redução da DO_{600} e é representada pelo percentual da razão de DO $[(T_0 - T_{24}) / T_0] \times 100$. Reduzida atividade autolítica (ANOVA de duas vias $p < 0,05$). As médias e os desvios são representados pelas DO_{600} de todas as linhagens em diferentes grupos de um experimento.

6 DISCUSSÃO

O *Staphylococcus aureus* é um dos principais agentes patogênicos causadores de bacteremias, com elevado potencial de mortalidade. Com base na emergência de MRSA, o padrão de tratamento farmacológico com vancomicina ainda é mantido no Brasil e em outros países em desenvolvimento (LIU et al., 2011; OBARA et al., 2016). Isso se deve ao perfil de segurança do fármaco, o baixo potencial de indução de resistência e os custos em relação aos outros fármacos disponíveis no mercado (BRUNIERA et al., 2015). Entretanto, a eficácia da vancomicina é alvo de questionamentos em microrganismos sensíveis com susceptibilidade reduzida, devido a sua atividade bactericida lenta.

Após 70 anos da descoberta de tolerância e persistência, estudos voltados para esses fenômenos retornaram para investigar sua relação com falha terapêutica e infecções recalcitrantes (CONLON, 2014). Portanto, em nosso estudo investigamos o efeito da exposição de diferentes concentrações de vancomicina em linhagens sensíveis de *S. aureus*, pois embora ainda sejam raros os casos de resistência à vancomicina, é possível que os efeitos dessa exposição estejam relacionados com a os fenômenos de tolerância e persistência.

Observamos um padrão semelhante de sobrevivência em cinco linhagens diferentes de *S. aureus* sobreviventes à exposição de 10 µg/mL de vancomicina por 6 h. Nenhuma das linhagens alterou significativamente o número de células viáveis em relação ao quantitativo inicial de células em 6 h. O resultado de curva de crescimento sem a presença de vancomicina prevê início da fase estacionária em 6 h, então, de acordo com esses dados, a vancomicina apresentou efeito bacteriostático em concentração dez vezes maior que a CIM. Um mecanismo protetor semelhante é observado para linhagens tolerantes e persistentes, bactérias com estas características são capazes de coincidir o estado metabólico reduzido com o tempo de tratamento do antimicrobiano após sucessivas exposições (FRIDMAN et al., 2014).

Outra característica de linhagens tolerantes e persistente observada ao longo dos ensaios foi a capacidade de retomar o crescimento após a retirada da droga que indica viabilidade celular.

A sobrevivência de linhagens tolerantes e persistentes se dá a partir da retomada do crescimento após a retirada do antimicrobiano por meio de mecanismos de geração de subpopulações heterogêneas (BIGGER, 1944; BALABAN et al., 2019). Vários fatores podem contribuir para o desenvolvimento de células tolerantes e persistentes, porém o mecanismo pelo qual esses fenômenos são desencadeados em *S. aureus* e outros microrganismos ainda não foi totalmente elucidado. Sabe-se que antimicrobianos selecionam células de uma linhagem capazes de se diferenciar transitoriamente em populações fenotipicamente diferentes (LEWIS, 2010).

Escolhemos a linhagem de referência ATCC 29213 para dar continuidade aos estudos dos fenômenos de tolerância/persistência considerando aspectos de susceptibilidade bem definidos e utilização desta linhagem como controle de teste de susceptibilidade de rotina. Por isso, os testes subsequentes mantiveram apenas as linhagens derivadas da linhagem ATCC 29213.

Entretanto, ainda que concentrações maiores de vancomicina fossem aplicáveis à realidade clínica, haja vista sua toxicidade em níveis séricos superiores à 30 µg/mL, a concentração de 100 µg/mL do glicopeptídeo não foi suficiente para eliminar completamente a linhagem ATCC 29213 durante 6 horas. Em concordância com nossos achados, a linhagem parental também apresentou taxa morte mais lenta na presença de 43 x CIM de vancomicina por 24 h (LÖWDIN; ODENHOLT; CARS, 1998).

Associado a isto, a dificuldade de reprodutibilidade dos ensaios parece reforçar a sobrevivência aleatória característica de tolerância e persistência explicada pela hipótese de geração do fenômeno por PASH (do inglês, *Persistence As Stuff Happens*). De acordo com esta hipótese, o padrão aleatório de sobrevivência pode ser explicado por falhas transitórias, erros no ciclo de replicação celular, ou ainda, por redução da velocidade do metabolismo de *S. aureus* na presença de antimicrobianos (ALLISON; BRYNILDSEN; COLLINS, 2011). Em concordância com nossos achados, Conlon e outros (2013) observaram que uma linhagem de *S. aureus* persistente foi capaz de sobreviver por cinco dias na presença de vancomicina em igual concentração. Essas evidências, juntamente com nossos achados, nos levaram à hipótese de que as linhagens do estudo apresentaram tolerância ou persistência

tempo-dependente, associada à taxa de crescimento lento ou à extensão da fase *lag*, visto que, tanto a concentração de 100 µg/mL, quanto de 10 µg/mL apresentaram taxa de morte semelhantes.

Foi descartada a possibilidade de contaminação das linhagens derivadas por perfil proteico das linhagens derivadas E100 e E10.6 e similaridade genética entre a linhagem parental e a derivada E10.6, assegurando a confiabilidade dos resultados seguintes.

Na rotina laboratorial, o principal parâmetro de direcionamento clínico é dado pelo perfil de susceptibilidade de um microrganismo em relação a um antimicrobiano de interesse. Portanto, utilizamos o ensaio de determinação da concentração inibitória mínima para descartar o desenvolvimento de resistência ou incremento da CIM após a exposição à vancomicina.

Os dados encontrados foram reportados como média geométrica, devido a maior caráter discriminatório entre as linhagens (DAVIES, 1990). Considerando o erro previsto para o ensaio ($\pm 1,0$) e os pontos de corte estabelecidos pelo CLSI (2018), a susceptibilidade não foi alterada (CIM = 1,0), logo, seria esperado que concentrações de 10 e 100 vezes a CIM fossem capazes inibir o crescimento da linhagem ATCC 29213. Isso de fato ocorreu ao longo das exposições, porém, a inibição não impediu a viabilidade celular, indicando ausência de efeito bactericida da vancomicina em 6 horas. É possível ainda que pequenas alterações na CIM, a níveis decimais, não quantificadas também tenham influenciado na susceptibilidade reduzida observada, porém esta hipótese não foi avaliada. Sendo assim, nossa hipótese foi mantida, pois, segundo os critérios de caracterização proposto por Brauner e colaboradores (2016), a CIM deve ser mantida igual ou menor em relação à linhagem parental, no caso de amostras tolerantes ou persistentes.

O perfil de susceptibilidade não é recomendado para identificar mecanismos adaptativos em subpopulações persistentes, visto que a susceptibilidade transitória é dependente da taxa de morte bacteriana (BALABAN et al., 2019). Então, realizamos outros ensaios descritos para a detecção de tolerância e persistência.

O valor da concentração bactericida mínima (CBM) é baseado na redução de 3 *log* a partir do inóculo inicial (10^4 UFC/mL). Assim, a partir deste ponto de corte, o crescimento de colônias numericamente menor que 100 UFC/mL foi desconsiderado. Como consequência, a CBM de vancomicina para as linhagens derivadas foi dada em concentrações próximas aos valores de CIM. Segundo o CLSI (1999), o método de CBM apresenta desvantagens técnicas e dificuldade de distinção de linhagens com taxas mais lentas de morte. É possível que a presença do antimicrobiano com lenta atividade bactericida tenha interferido no fenótipo bacteriano de taxa de crescimento, por indução de mecanismos adaptativos ou por seleção de microrganismos menos susceptíveis já existentes, impedindo a detecção por estas técnicas.

Assim sendo, os resultados encontrados para razão CBM/CIM apresentam-se muito distantes do ponto de corte classificatório para persistência (razão CBM/CIM ≥ 32) (CLSI, 1999; GONZALEZ et al., 2013). Esses achados concordam com o estudo controlado de Sherris (1986), em que raras linhagens de *S. aureus* apresentaram razão CBM/CIM ≥ 32 para antimicrobianos bactericidas. Outra possibilidade é que a técnica seja pouco sensível para baixas concentrações de células fenotipicamente alteradas, ou seja, subpopulações heterogêneas, como é o caso de tolerantes e persistentes. Outra hipótese seria a formação de biofilme dada as condições experimentais de crescimento em microplaca, sendo assim, nestas condições os resultados observados refletiriam apenas as condições das células planctônicas de menor proporção comparadas às células do biofilme.

Além disso, foi observado crescimento de colônias abaixo do ponto de corte em concentrações de 8 e 16 $\mu\text{g/mL}$ de vancomicina, respectivamente, nas linhagens derivadas E10.6 e E100. Os achados de morfologia reduzida e crescimento de raras colônias em concentrações elevadas de vancomicina sugerem alterações do fenótipo normal como mecanismo de sobrevivência na presença do glicopeptídeo. Esse fenótipo é conhecido como *Small Colony Variants* (SCVs) e apresenta como características a morfologia reduzida de colônias em ágar, diminuição da expressão de toxinas, aumento na expressão de adesinas, crescimento intracelular e resistência a antimicrobianos (MASSEY; BUCKLING; PEACOCK, 2001; GRANT; HUNG, 2013). Segundo Kahl (2013), a instabilidade dessas colônias permite a reversão do fenótipo *wild-type* e, portanto, proteção temporária contra a atividade bactericida podendo

eventualmente favorecer a persistência da infecção. A visualização de SCVs é uma evidência da presença de um fenótipo adaptativo à vancomicina nesta linhagem.

Para testar nossa hipótese, utilizamos o ensaio de disco difusão modificado, a fim de realizar a detecção qualitativa e classificação dos níveis de tolerância e persistência, como uma alternativa de triagem rápida e menos laboriosa para auxiliar na conduta clínica.

A avaliação de tolerância ou persistência à vancomicina foi descartada, devido à sua estrutura molecular de elevado peso e tamanho que dificultam sua difusão homogênea em ágar. Não foi possível padronizar uma dose de vancomicina em disco preparado *in house* que atendesse ao princípio do método. Portanto, a análise qualitativa para vancomicina por esse método nas condições testadas não é viável.

Outro fator limitante observado foi a utilização de ágar MH para realização do ensaio. Em contrapartida, de acordo com a diferença dos halos de inibição, todas as linhagens apresentaram alta tolerância ou persistência em ágar LB para ciprofloxacino e oxacilina, conforme o ponto de corte de Gefen e colegas (2017). O estresse gerado a partir dos discos com antimicrobianos e das condições do meio LB, com elevado percentual de sal e restrição de nutrientes, pareceu estimular melhor o crescimento de *S. aureus* persistentes. Esses resultados estão em concordância com o estudo de Kubistova et al., (2017) em que o estresse salino associado a fármacos afeta significativamente a formação e o quantitativo de persistentes em *S. aureus in vitro*.

Em *S. aureus* a tolerância ou persistência para fármacos de outra classe é esperada (CONLON, 2014; KEREN et al., 2004), entretanto o mesmo nível de tolerância ou persistência encontrado para as linhagens derivadas e parental sugere a existência do fenômeno previamente à exposição da vancomicina. Segundo Balaban e outros (2019), a persistência espontânea é mais incomum e ocorre ao longo do crescimento exponencial, como foi observado no ensaio de exposição com 10 µg/mL de vancomicina. Suspeitamos também que a aleatoriedade do fenômeno seja como uma garantia de perpetuação da espécie (denominada de *bet hedding*), frente a uma condição estressora, de forma não hereditária.

Ainda que a exposição à vancomicina não tenha relação com o surgimento destas colônias, foi possível detectar um fenótipo adaptativo relacionado à tolerância ou persistência, de acordo com os critérios de “recrescimento” após a retirada do fármaco. Embora, o nível de tolerância ou persistência tenha sido classificado como alto esse resultado diverge dos valores de razão CBM/CIM. É interessante destacar que o crescimento de colônias nos halos de inibição de oxacilina são considerados indicativos de resistência à meticilina (MRSA) pelo CLSI (2005), sugerindo que as colônias crescidas dentro dos halos de inibição representem subpopulações heterogêneas com susceptibilidade reduzida. Apesar da limitação técnica em diferenciar tolerância e persistência, a simplicidade e rapidez da técnica de disco difusão modificado são um atrativo na rotina laboratorial.

Não é possível precisar apenas com o ensaio de disco difusão modificado, se há diferenças quanto à capacidade de sobrevivência em relação ao tempo de exposição do fármaco (tolerância ou persistência tempo-dependente). A técnica mais recomendada para detecção de tolerantes e persistentes é o método de curva de morte. Segundo um consenso publicado recentemente, a curva de tempo de morte é o método mais recomendado para caracterização *in vitro* de tolerância e persistência a antimicrobianos a partir da determinação do tempo mínimo de morte para eliminar a maior parte da população sensível (MDK₉₉ e MDK_{99,99}, respectivamente) e identificar a curva bifásica característica de persistência (BRAUNER et al., 2016; BALABAN et al., 2019).

Em nossos achados, o MDK₉₉ para vancomicina em 50 µg/mL foi semelhante entre as linhagens parental e derivada E10.6, tanto em fase *lag* (MDK₉₉ = 6 h), quanto em fase exponencial (MDK₉₉ = 3 h). Portanto, de acordo com a classificação proposta por Brauner et al. (2016), em seis horas, a linhagem não foi classificada como tolerante à vancomicina. Entretanto, o tempo mínimo para detecção de persistentes não foi determinado (MDK_{99,99}) e a curva bimodal não foi observada. Também não foi possível fazer comparação com o ensaio de disco difusão modificado, em virtude das características estruturais da vancomicina já mencionadas anteriormente.

Comparado com o ensaio de exposição à vancomicina em 10 µg/mL, a concentração de 50 µg/mL pareceu ser mais eficaz nas mesmas condições de crescimento e tempo

de exposição, reduzindo em 3 *log* ($MDK_{99,9} = 6$ h) o quantitativo de células viáveis para as duas linhagens. Todavia, esse resultado se contrapõe com os achados em 10 e 100 µg/mL de vancomicina no mesmo intervalo de tempo.

Algumas limitações da técnica, do ensaio de exposição e particularidades do fármaco podem ter interferido no resultado final da curva de morte. A ausência de uma padronização rigorosa da técnica é um dos principais fatores limitantes, pois dificulta a reprodutibilidade dos ensaios por diferentes grupos de pesquisa, bem como a interpretação dos resultados de tolerância e persistência de forma globalizada (BRAUNER et al., 2016; BALABAN et al., 2019).

Especificamente para as nossas condições experimentais, a detecção de persistentes utilizando um inóculo baixo (10^4 UFC/mL) dificulta a detecção de persistentes. Segundo o cálculo, o $MDK_{99,99}$ seria determinado quando apenas 1 colônia fosse encontrada no meio de cultivo. Logo, a condição do inóculo inicial, principalmente em fase estacionária, aumenta a margem de erro da técnica. De maneira geral, isoladamente o método de contagem de viáveis para detecção de tolerância e persistência é limitado quando se trata de linhagens não mutantes, pois a concentração de células heterogêneas pode chegar a 0,001% (BIGGER, 1944). Além disso, o inóculo mais concentrado poderia acarretar em resultados falsos para tolerância ou persistência por efeito de inóculo (LAPLANTE et al., 2004; VANDECASTEELE et al., 2013).

Outro fator limitante, foi a utilização de um antimicrobiano tempo-dependente para identificação de mecanismos por *lag* e por crescimento lento. Como é de conhecimento geral, as curvas de morte com vancomicina são longas e, segundo um consenso publicado recentemente, resultados confusos podem ocorrer quando o antimicrobiano utilizado para induzir tolerância ou persistência também é utilizado para avaliar a cinética de morte (BALABAN et al., 2019). Portanto, as divergências entre os resultados em diferentes concentrações de vancomicina são coerentes com a literatura atual. A escassez de informações sobre o fenômeno, principalmente para gram-positivos testados com vancomicina, é um fator limitante para a interpretação dos achados e classificação dos microrganismos.

Apesar das discordâncias entre os ensaios, entendemos que a sobrevivência observada seja independente da concentração de vancomicina, pois nenhuma concentração testada foi suficiente para eliminar totalmente a linhagem ATCC 29213. De fato, o nível de tolerância ou persistência deve se manter em relação a um fármaco quando em concentrações suficientemente elevadas (BALABAN et al., 2019). Esta é uma interpretação subjetiva, pois não realizamos ensaio de curva de morte em concentração dobrada para descartar a possibilidade de persistência dose-dependente como recomendado por Brauner e colegas (2016).

Por fim, avaliamos os possíveis efeitos da vancomicina na taxa de crescimento, percentual de autólise por Triton X-100 e peroxidação lipídica por determinação de TBARS. Na presença de um estresse temporário, como ausência de nutrientes, pH ácido ou antimicrobianos, ocorrem modificações fenotípicas aleatórias em uma subpopulação, geneticamente idêntica à sua população dominante, por indução de um estado de dormência ou persistência (LECHNER; LEWIS; BERTRAM, 2012; JOHNSON; LEVIN, 2013). O crescimento celular lento nesse estado de dormência é capaz de proteger os microrganismos contra antimicrobianos bactericidas por ausência de um metabolismo celular ativo, logo estas drogas passam a atuar como agentes bacteriostáticos (GRANT; HUNG, 2013; BALABAN et al., 2019).

Na ausência de vancomicina, as linhagens derivadas apresentaram perfil de crescimento idêntico à linhagem parental. Por outro lado, na presença de concentrações sub-CIM de vancomicina foram observadas discretas alterações na fase adaptativa das linhagens, mas, em concentração igual ou maior ao valor da CIM, nenhuma linhagem apresentou crescimento ($DO_{600} \approx 0$). O efeito inibitório da vancomicina a partir da concentração igual a CIM garante a não replicação celular, o que é esperado considerando o ensaio de susceptibilidade por determinação da CIM. Porém, como se trata de um antimicrobiano com atividade bactericida lenta, não se pode excluir a possibilidade de células viáveis presentes no meio.

Os resultados encontrados para a taxa de crescimento em concentrações igual e maiores que a CIM concordam com os achados dos ensaios de exposição à vancomicina e curva de morte em fase estacionária, pois o quantitativo de células viáveis foi mantido ao longo de 6 h. Novamente, não foi encontrada relação entre a

eficácia do fármaco e o aumento da concentração. Um fator limitante para a detecção de alterações no crescimento pode estar relacionado a baixa sensibilidade do equipamento para a detecção de baixa concentração de células em estado metabólico alterado.

Apesar da falha em detectar alteração no crescimento nas linhagens derivadas, observamos que o efeito do tratamento com vancomicina por 1 h elevou os níveis de TBARS, tanto na linhagem parental, quanto na linhagem derivada, supostamente tolerante ou persistente. Alguns autores acreditam que as células persistentes inativam a cadeia transportadora de elétrons, reduzindo a indução de ROS e, consequentemente, inibindo a morte celular (KOHANSKI et al., 2007).

A modulação da resposta ao estresse oxidativo e desenvolvimento de persistentes em *S. aureus* é mediada pela Clp protease (ClpP, do inglês *Casinolytic Protease*). Esta protease regula a fisiologia celular, a capacidade adaptativa, a atividade autolítica e a virulência bacteriana por modulação do gene *agr*. Sua função é iniciar uma resposta fisiológica adaptativa contra fatores externos, como por exemplo, o estresse oxidativo (KATAYAMA, 1988; FREES et al., 2003; MICHEL et al., 2006; MONTEIRO et al., 2017).

A função da ClpP ainda é controversa. Os resultados encontrados por Frees e colaboradores (2003) mostraram que mutantes por deleção desta protease se apresentam mais susceptíveis a ação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) quando comparados a linhagem selvagem (MICHEL et al., 2006), ou seja a protease teria um efeito protetor contra ROS (ação anti-oxidante). Entretanto, outros autores relatam que a ativação da ClpP é importante na eliminação de persistentes através da geração de ROS (CONLON et al., 2013).

Entendemos que a função da ClpP protease é iniciar uma resposta fisiológica adaptativa através da geração de ROS, no sentido de controlar o crescimento bacteriano na condição estressante (como por exemplo a exposição à vancomicina), mas se faz necessário o equilíbrio entre a geração de ROS e as vias anti-oxidantes, para que o microrganismo sobreviva sem se multiplicar, caracterizando o fenótipo tolerante ou persistente. Nesta linha de raciocínio, os níveis elevados de peroxidação

lipídica desencadeados pela exposição à vancomicina observados em nosso estudo, seria uma resposta adaptativa ao estresse gerado pelo antimicrobiano, mas a ativação de mecanismos compensatórios teria garantido a sobrevivência de subpopulações supostamente tolerantes ou persistentes.

Corroborando com nosso estudo, Liu e colaboradores (2012) já chamaram a atenção para diferenças na produção de ROS induzidos por antimicrobianos em diferentes linhagens de uma mesma espécie, sugerindo limitações das técnicas utilizadas ou até mesmo característica específica de cada linhagem. A ausência de métodos padronizados e diferenças no delineamento experimental para determinação de ROS dificultam a comparação dos resultados obtidos por diferentes grupos de pesquisa, gerando resultados contraditórios (VAN ACKER et al., 2017). Além disso, limitações da técnica podem estar relacionadas com diferenças na produção de ROS induzidos por antimicrobianos entre diferentes linhagens de uma mesma espécie (LIU et al., 2012). Em concordância com esses autores, observamos o mesmo efeito de peroxidação lipídica para as duas linhagens testadas, parental e derivada, o que indica uma possível característica da linhagem. Portanto, outros ensaios de determinação do estresse oxidativo seriam necessários para afirmar com maior propriedade os efeitos observados.

Em concordância com as análises de peroxidação lipídica para a linhagem E10.6, os resultados de autólise em 24 h foram significativamente maiores em todas as linhagens do grupo tratado ($p < 0,05$). De fato, altos níveis de espécies reativas (TBARS) são responsáveis por dano celular, incluindo a morte da célula. Porém, esses achados são contrários à sobrevivência significativa observada em seis experimentos independentes na presença de vancomicina. Além disso, as taxas de autólise das linhagens tratadas foram estatisticamente semelhantes à Mu3 (hVISA), sugerindo que as linhagens do estudo apresentem comportamento semelhante ao de populações heterogêneas.

A linhagem hVISA foi utilizada como controle de persistência em nosso ensaio de autólise, visto que a heteroresistência pode ocorrer de forma transitória em subpopulações de células bacterianas, como um tipo de persistência (dose dependente) (BRAUNER et al., 2016). Em destaque, a linhagem derivada E100 nos

chama a atenção em relação aos percentuais de autólise na presença de Triton X-100. Observamos que, tanto em níveis basais, quanto após tratamento, a linhagem E100 apresentou menor percentual de autólise comparado à linhagem hVISA, corroborando com os resultados de disco difusão modificado para oxacilina. Embora esses resultados não apresentem relevância estatística, podemos assim dizer, que apesar do tratamento com vancomicina aumentar os níveis de autólise, o comportamento autolítico das linhagens do estudo é semelhante ao comportamento de linhagens persistentes.

Em concordância com nossos achados significativos para autólise, Xu e outros (2018) relatam que a redução de autólise não é esperada para linhagens VSSA. Todavia, embora o efeito global observado seja contrário à hipótese de persistência espontânea, a sobrevivência das linhagens derivadas de *S. aureus* poderia ser explicada pelo mecanismo de PASH. Em persistentes, o mau funcionamento dos mecanismos de reparo pode levar a alterações celulares sem a ativação de vias de autólise. Estas alterações seriam responsáveis por reduzir a autólise em linhagens tolerantes ou persistentes, devido ao funcionamento irregular de autolisinas (TUOMANEN et al., 1986; SINGH et al., 2016), o que explicaria a sobrevivência de células na presença de vancomicina. Alterações na via autolítica também podem ser observadas em populações persistentes na forma do fenótipo de SCV em concordância com os achados durante o ensaio de CBM.

Encontramos ainda alterações significativas na carga de superfície da linhagem derivada E10.6. Esta linhagem apresentou carga de superfície estatisticamente mais negativa em relação à linhagem parental, corroborando com os ensaios de autólise e peroxidação lipídica. Em gram-positivos, os ácidos teicóicos são responsáveis pela carga negativa, à medida que a superfície torna-se mais negativa, moléculas positivas de vancomicina são atraídas com maior intensidade por células bacterianas (LAMBERT, 2002; WANG et al., 2018). De fato, a atração de cargas opostas atua como facilitadora da ação bactericida do antimicrobiano no alvo celular dos microrganismos, em concordância com os resultados observados em todos os ensaios fenotípicos. Porém, outros parâmetros complementares associados à susceptibilidade reduzida, como espessamento de membrana, podem ter contribuído

para a sobrevivência das linhagens derivadas analisadas, entretanto esses parâmetros não foram investigados.

O desenvolvimento do fenômeno é multifatorial e os efeitos *in vivo* ainda são difíceis de se prever, mas acreditamos que o estudo seja facilitado pela maior concentração de células tolerantes ou persistentes por exposição a mais de um estresse. Esta seria uma alternativa para aumentar a sensibilidade, como observado no ensaio de disco difusão modificado.

A variabilidade de procedimentos experimentais descritos para gerar e classificar tolerância e persistência tem dificultado a detecção e o estudo destes fenômenos (CLSI, 1999; DIMITRIJOVSKI et al., 2015). Testes complementares são necessários para um maior detalhamento e compreensão das alterações que levaram à susceptibilidade reduzida da linhagem ATCC 29213 quando exposta a 10 e 100 µg/mL de vancomicina e ajudariam a estabelecer uma correlação mais robusta com o fenótipo persistente. A busca pela compreensão do fenômeno ainda é recente, por isso a escassez de informações. Os métodos e os critérios para detecção e classificação ainda são controversos e laboriosos, com limitações para linhagens com subpopulações de baixo percentual (menor que 1%).

Conforme discutido, os efeitos contrários à sobrevivência observados nos ensaios de autólise, peroxidação lipídica e TBARS não estão claros, porém nos levam a acreditar que esses resultados refletem o efeito na população dominante. Embora a hipótese de tolerância em *S. aureus* induzida por vancomicina tenha sido descartada, não foi possível determinar o nível de persistência para vancomicina entre as linhagens. Além disso, todas as linhagens testadas apresentaram tolerância ou persistência à oxacilina e ciprofloxacino em níveis semelhantes, indicando a possibilidade da existência prévia do fenômeno como mecanismo adaptativo, ou seja, tolerância espontânea.

Os níveis séricos de vancomicina próximos de 10 µg/mL (subterapêuticos) são capazes de alterar características fenotípicas importantes do ponto de vista adaptativo sem prejudicar a viabilidade completa de uma população sensível. Esta condição *in vivo* pode ser responsável por falha terapêutica e recidiva, particularmente em pacientes imunossuprimidos e com infecções complicadas. Nesses casos, o uso

continuado da vancomicina parece questionável, tendo em vista a atividade bacteriostática, por pelo menos seis horas, em concentração de até 100 µg/mL. A ação tempo-dependente da vancomicina pareceu favorecer o fenótipo menos ativo das células.

Não sabemos se a exposição à vancomicina por tempo maior que 6 horas favorece a adaptação por maior expressão dos fenótipos analisados ou mesmo de outros parâmetros compensatórios, mas está claro que a sobrevivência observada é preocupante do ponto de vista clínico. Portanto, o estabelecimento de padrões de detecção específicos e reprodutíveis para tolerância e persistência em *S. aureus* na rotina laboratorial é importante para direcionar o tratamento antimicrobiano e estruturar diretrizes que controlem infecções por microrganismos tolerantes/persistentes e, a longo prazo, resistentes.

7 CONCLUSÕES

- O tratamento com vancomicina, durante seis horas, não reduz a contagem microbiana, bem como não altera a susceptibilidade, mas eleva os níveis de peroxidação lipídica e os percentuais de autólise sem alterar a velocidade de crescimento e influencia na carga negativa de superfície.
- Embora os percentuais de autólise sejam elevados, estes apresentam-se semelhantes a linhagem heterorresistente controle.
- A linhagem parental e a linhagem derivada E10.6 não apresentaram diferença quanto a tolerância/persistência à vancomicina, ciprofloxacino e oxacilina. Todavia, ao menos para os dois últimos antimicrobianos, foi constatado crescimento de colônias para as linhagens testadas, em níveis correspondentes, após a retirada do antimicrobiano.

REFERÊNCIAS

ADAMS, K. N. et al. Drug tolerance in replicating mycobacteria mediated by a macrophage-induced efflux mechanism. **Cell**, v. 145, n. 1, p. 39–53, 2011.

AGUADO, J. M. et al. Role of high vancomycin minimum inhibitory concentration in the outcome of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia. **Journal of Infectious Diseases**, v. 205, n. 6, p. 1024–1025, 2012.

ALLISON, K. R; BRYNILDSEN, M. P.; COLLINS, J. J. Heterogeneous bacterial persisters and engineering approaches to eliminate them. **Current Opinion in Microbiology**, v. 14, n. 5, p. 593–598, 2011.

AMATO, S. M.; ORMAN, M. A.; BRYNILDSEN, M. P. Metabolic control of persister formation in *Escherichia coli*. **Molecular Cell**, v. 50, n. 4, p. 475–487, 2013.

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

BALABAN, N. Q. et al. Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 7, p. 441–448, 2019.

BAUER, A. W. Single-disk antibiotic-sensitivity testing of staphylococci. **A.M.A. Archives of Internal Medicine**, v. 104, n. 2, p. 208, 1959.

BIEN, J.; SOKOLOVA, O.; BOZKO, P. Characterization of virulence factors of *Staphylococcus aureus* : novel function of known virulence factors that are implicated in activation of airway epithelial proinflammatory response. **Journal of Pathogens**, v. 2011, p. 1–13, 2011.

BIGGER, J. W. Treatment of staphylococcal infections with penicillin. **The Lancet**, v. 244, n. 6320, p. 497–500, 1944.

BRAUNER, A. et al. Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 5, p. 320–330, 2016.

BREVES, A. et al. Methicillin- and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in health care workers and medical devices . **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 51, n. 3, p. 143–152, 2015.

BRUNIERA, F.R. et al. The use of vancomycin with its therapeutic and adverse effects : a review. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v. 19, p. 694–700, 2015.

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

CASSELS, R.; OLIVA, B.; KNOWLES, D. Occurrence of the regulatory nucleotides ppGpp and pppGpp following induction of the stringent response in staphylococci. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 17, p. 5161–5165, 1995.

CERVERA, C. et al. Effect of vancomycin minimal inhibitory concentration on the outcome of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* endocarditis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 58, n. 12, p. 1668–1675, 2014.

CHAGAS, R. A. **Efeito de concentração subterapêutica de vancomicina sobre *Staphylococcus aureus*, no contexto do tratamento de bacteremias no paciente em hemodiálise.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Espírito Santo. Vitória, p. 75, 2016.

CHAMBERS, H. F. The Changing epidemiology of *Staphylococcus aureus* ? **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 2, p. 178–182, 2001.

CLSI. **M07-A10: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically.** 10th. ed. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute, v. 35, 2015.

CLSI. **M26-A Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents.** ed. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute, v. 19., n. 18, 1999.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing.** 28th. ed. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018.

COHEN, N. R.; LOBRITZ, M. A.; COLLINS, J. J. Microbial persistence and the road to drug resistance. **Cell Host and Microbe**, v. 13, n. 6, p. 632–642, 2013.

CONLON, B. P. et al. Activated ClpP kills persisters and eradicates a chronic biofilm infection. **Nature**, v. 503, n. 7476, p. 365–370, 2013.

CONLON, B. P. et al. Persister formation in *Staphylococcus aureus* is associated with ATP depletion. **Nature Microbiology**, v. 1, n. 5, p. 16051, 2016.

CONLON, B. P. *Staphylococcus aureus* chronic and relapsing infections: Evidence of a role for persister cells. **BioEssays**, v. 36, n. 10, p. 991–996, 2014.

CORRIGAN, R. M. et al. PpGpp negatively impacts ribosome assembly affecting growth and antimicrobial tolerance in gram-positive bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 12, p. E1710–E1719, 2016.

COURVALIN, P. Vancomycin resistance in gram-positive cocci. **Clinical Infectious Diseases**, v. 42, n. Supplement_1, p. S25–S34, 2005.

D'COSTA, V. M. et al. Sampling the antibiotic resistome. **Science**, v. 311, n. 5759, p. 374–377, 2006.

DAVIES, B. I. The importance of the geometric mean MIC. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 25, p. 471–472, 1990.

DERESINSKI, S. Vancomycin heteroresistance and methicillin-resistant

Staphylococcus aureus. **Journal of Infectious Diseases**, v. 199, n. 5, p. 605–609, 2009.

DHAND, A.; SAKOULAS, G. Reduced vancomycin susceptibility among clinical *Staphylococcus aureus* isolates ('the MIC creep'): implications for therapy. **Medicine Reports**, v. 4, p. 1-11, 2012.

DIMITRIJOVSKI, B. et al. "Tolerance" of misused terminology? enforcing standardized phenotypic definitions. **mBio**, v. 6, n. 3, p. 2015, 2015.

DUARTE, F. C. et al. Bacteremia causada por *Staphylococcus aureus* : uma análise de quinze anos da sensibilidade a antimicrobianos em um hospital terciário do Brasil. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, v. 8, n. 3, p. 232–238, 2018.

DULON, M. et al. MRSA prevalence in european healthcare settings : a review. **BMC Infectious Diseases**, v. 11, p. 1–13, 2011.

EDWARDS, A. M.; MASSEY, R. C.; CLARKE, S. R. Molecular mechanisms of *Staphylococcus aureus* nasopharyngeal colonization. **Molecular Oral Microbiology**, v. 27, n. 1, p. 1–10, 2012.

FALCÓN, R. et al. High vancomycin MICs within the susceptible range in *Staphylococcus aureus* bacteraemia isolates are associated with increased cell wall thickness and reduced intracellular killing by human phagocytes. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 47, n. 5, p. 343–350, 2016.

FERREIRA, W. A. et al. Prevalência de *Staphylococcus aureus* metilicina resistente (MRSA) em pacientes atendidos em ambulatório de dermatologia geral em Manaus - Amazonas. **Revista de Patologia Tropical**, v. 38, n. 2, p. 83–92, 2009.

FERREIRA, G. F. et al. Heteroresistance to itraconazole alters the morphology and increases the virulence of *Cryptococcus gattii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 8, p. 4600–4609, 2015.

FERREIRA, G. F. et al. The role of oxidative and nitrosative bursts caused by azoles and amphotericin B against the fungal pathogen *Cryptococcus gattii*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 8, p. 1801–1811, 2013.

FILICE, G. A. et al. Excess costs and utilization associated with methicillin resistance for patients with *Staphylococcus aureus* infection. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 31, n. 4, p. 365–373, 2010.

FOSTER, T. J. The *Staphylococcus aureus* "superbug". **Journal of Clinical Investigation**, v. 114, n. 12, p. 1693–1696, 2004.

FOWLER, V. G. et al. Persistent bacteremia due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection is associated with agr dysfunction and low-level in vitro resistance to thrombin-induced platelet microbicidal protein. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 277, p. 1140–1149, 2004.

FOWLER, V. G. et al. *Staphylococcus aureus* endocarditis a consequence of medical progress. **JAMA**, v. 293, n. 24, p. 3012, 2005.

FRACAROLLI, I. F. L.; OLIVEIRA, S. A.; MARZIALE, M. H. P. Colonização bacteriana e resistência antimicrobiana em trabalhadores de saúde : revisão integrativa. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 30, n. 6, p. 651–657, 2017.

FREES, D. et al. Alternative roles of ClpX and ClpP in *Staphylococcus aureus* stress tolerance and virulence. **Molecular Microbiology**, v. 48, n. 6, p. 1565–1578, 2003.

FRIDMAN, O. et al. Optimization of lag time underlies antibiotic tolerance in evolved bacterial populations. **Nature**, v. 513, n. 7518, p. 418–421, 2014.

GACA, A. O. et al. From (p)ppGpp to (pp)pGpp: characterization of regulatory effects of pGpp synthesized by the small alarmone synthetase of *Enterococcus faecalis*. **Journal of Bacteriology**, v. 197, n. 18, p. 2908–2919, 2015.

GALES, A. C. et al. Antimicrobial susceptibility of gram-positive bacteria isolated in brazilian hospitals participating in the SENTRY Program (2005-2008). **The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, v. 13, p. 90–98, 2009.

GEFEN, O. et al. TD-test: easy detection of bacterial tolerance and persistence in clinical isolates by a modified disk-diffusion assay. **Scientific Reports**, v. 7, n. 41284, p. 1-5, 2017.

GEIGER, T. et al. Two small (p)ppGpp synthases in *Staphylococcus aureus* mediate tolerance against cell envelope stress conditions. **Journal of Bacteriology**, v. 196, n. 4, p. 894–902, 2014.

GENTRY, D. et al. The rel gene is essential for in vitro growth of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 17, p. 4995–4997, 2000.

GIRGIS, H. S.; HARRIS, K.; TAVAZOIE, S. Large mutational target size for rapid emergence of bacterial persistence. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 31, p. 12740–5, 2012.

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

GONZALEZ, N. et al. Influence of the MBC/MIC ratio on the antibacterial activity of vancomycin versus linezolid against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in a pharmacodynamic model simulating serum and soft tissue interstitial fluid concentrations reported. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 10, p. 2291–2295, 2013.

GOULD, I. M. Vancomycin minimum inhibitory concentrations and outcome in patients with severe *Staphylococcus aureus* infection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 205, n. 5, p. 864–865, 2012.

GRANT, S. S.; HUNG, D. T. Persistent bacterial infections, antibiotic tolerance, and the oxidative stress response. **Virulence**, v. 4, n. 4, p. 273–283, 2013.

HAAS, P. et al. N-terminal residues of the chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* are essential for blocking formylated peptide receptor but not C5a receptor. **The Journal of Immunology**, v. 173, n. 9, p. 5704–5711, 2004.

HARMS, A.; MAISONNEUVE, E.; GERDES, K. Mechanisms of bacterial persistence during stress and antibiotic exposure. **Science**, v. 354, n. 6318, p. aaf4268–aaf4268, 2016.

HARRIS, L. G.; FOSTER, S. J.; RICHARDS, R. G. An introduction to *Staphylococcus aureus*, and techniques for identifying and quantifying *S. aureus* adhesins in relation to adhesion to biomaterials: review. **European Cells and Materials**, v. 4, p. 39–60, 2002.

HAURYLIUK, V. et al. Recent functional insights into the role of (p)ppGpp in bacterial physiology. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 5, p. 298–309, 2015.

HIRAMATSU, K. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 40, n. 1, p. 135–136, 1997.

HIRAMATSU, K. Vancomycin resistance in staphylococci. **Drug Resistance Updates**, v. 1, p. 135–150, 1998.

HOEFEL, H. H. et al. Vancomycin administration in an university hospital at general surgical units inpatients. **Online Brazilian Journal of Nursing**, v. 3, n. 1, p. 2–11, 2004.

HOLLAND, T. L.; FOWLER, V. G. Vancomycin minimum inhibitory concentration and outcome in patients with *Staphylococcus aureus* bacteremia: pearl or pellet? **Journal of Infectious Diseases**, v. 204, n. 3, p. 329–331, 2011.

HOLMES, N. E. et al. Antibiotic choice may not explain poorer outcomes in patients with *Staphylococcus aureus* bacteremia and high vancomycin minimum inhibitory concentrations. **Journal of Infectious Diseases**, v. 204, n. 3, p. 340–347, 2011.

HONORE, P. M. et al. Vancomycin pharmacokinetics in critically ill obese patients: can the clinician sit back and relax? **Critical Care**, v. 23, n. 1, p. 15, 2019.

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

JARRAUD, S. et al. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease. **Infection and immunity**, v. 70, n. 2, p. 631–641, 2002.

- JOHNSON, P. J. T.; LEVIN, B. R. Pharmacodynamics, population dynamics, and the evolution of persistence in *Staphylococcus aureus*. **PLoS Genetics**, v. 9, n. 1, p. e1003123, 2013.
- JUNG, Y. et al. International journal of antimicrobial agents area under the concentration – time curve to minimum inhibitory concentration ratio as a predictor of vancomycin treatment outcome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 43, n. 2, p. 179–183, 2014.
- KAHL, B. C. Infection, genetics and evolution small colony variants (SCVs) of *Staphylococcus aureus* – a bacterial survival strategy. **Infection, Genetics And Evolution**, 2013.
- KATAYAMA, Y. et al. The two-component, ATP-dependent Clp protease of *Escherichia coli*. Purification, cloning and mutational analysis of the ATP binding component. **J Biol Chem**, 263: 15226–15236, 1988.
- KATAYAMA, 1988
- KEREN, I. et al. Persister cells and tolerance to antimicrobials. **FEMS Microbiology Letters**, v. 230, n. 1, p. 13–18, 2004.
- KHATIB, R. et al. Impact of initial antibiotic choice and delayed appropriate treatment on the outcome of *Staphylococcus aureus* bacteremia. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 25, n. 3, p. 181–185, 2006.
- KIM, M. et al. Vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in Korea. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 10, p. 3879–3881, 2000.
- KLEVENS, R. M. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. **JAMA**, v. 298, n. 15, p. 1763, 2007.
- KLOOS, W. E.; BANNERMAN, T. L. Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 7, n. 1, p. 117–140, 1994.
- KOBAYASHI, S. D. et al. Rapid neutrophil destruction following phagocytosis of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Innate Immunity**, v. 2, n. 6, p. 560–575, 2010.
- KOBAYASHI, S. D; MALACHOWA, N.; DELEO, F. R. Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* abscesses. **The American Journal of Pathology**, v. 185, n. 6, p. 1518–1527, 2015.
- KOHANSKI, M. A. et al. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. **Cell**, v. 130, n. 5, p. 797–810, 2007.
- KRIEL, A. et al. Direct regulation of GTP homeostasis by (p)ppGpp: a critical component of viability and stress resistance. **Molecular Cell**, v. 48, n. 2, p. 231–241, 2012.

- KUBISTOVA, L. et al. Environmental stress affects the formation of *Staphylococcus aureus* persists tolerant to antibiotics. **Microbial Drug Resistance**, v. 24, n. 5, p. 547–555, 2017.
- KULLAR, R. et al. Impact of vancomycin exposure on outcomes in patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia: support for consensus guidelines suggested targets. **Clinical Infectious Diseases**, v. 52, n. 8, p. 975–981, 2011.
- LAMBERT, P. A. Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in gram-positive bacteria and mycobacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, n. s1, p. 46S-54S, 2002.
- LAPLANTE, K.; RYBAK, M. J. Impact of high-inoculum *Staphylococcus aureus* on the activities of nafcillin, vancomycin, linezolid, and daptomycin, alone and in combination with gentamicin, in a in vitro pharmacodynamic model. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.48, n.12, p.4665-4672, 2004
- LECHNER, S.; LEWIS, K.; BERTRAM, R. *Staphylococcus aureus* persists tolerant to bactericidal antibiotics. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 4, p. 235–244, 2012.
- LEE, A. S. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. 1, p. 18033, 2018.
- LEVIN-REISMAN, I. et al. Antibiotic tolerance facilitates the evolution of resistance. **Science**, v. 355, n. 6327, p. 826–830, 2017.
- LEWIS, K. Persister Cells. **Annual Review of Microbiology**, v.64, n.1, p. 357-372, 2010.
- LIU, C. et al. Clinical practice guidelines by the infectious diseases society of america for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in adults and children. **Clinical Infectious Diseases**, v. 52, n. 3, p. e18-55, 2011.
- LIU, Y. et al. Inhibitors of reactive oxygen species accumulation delay and/or reduce the lethality of several antistaphylococcal agents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 11, p. 6048–6050, 2012.
- LODISE, T. P. et al. Impact of empirical-therapy selection on outcomes of intravenous drug users with infective endocarditis caused by methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 10, p. 3731–3733, 2007.
- LÖWDIN, E.; ODENHOLT, I.; CARL, O. In vitro studies of pharmacodynamic properties of vancomycin against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 10, p. 2739–2744, 1998.

LOWY, F. D. *Staphylococcus aureus* infections. **New England Journal of Medicine**, v. 339, n. 8, p. 520–532, 1998.

MAISONNEUVE, E.; GERDES, K. Molecular mechanisms underlying bacterial persisters. **Cell**, v. 157, n. 3, p. 539–548, 2014.

MALANI, P. N. National burden of invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. **JAMA**, v. 311, n. 14, p. 1438, 2014.

MASSEY, R. C.; BUCKLING, A.; PEACOCK, S. J. Phenotypic switching of antibiotic resistance circumvents permanent costs in *Staphylococcus aureus*. **Current Biology**, v. 11, n. 22, p. 1810–1814, 2001.

MEJÍA, C.; ZURITA, J.; GUZMÁN-BLANCO, M. Epidemiology and surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Latin America. **The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, v. 14 Suppl 2, p. S79-86, 2010.

MICHEL, A. et al. Global regulatory impact of ClpP protease of *Staphylococcus aureus* on regulons involved in virulence, oxidative stress response, autolysis, and DNA repair. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 16, p. 5783–5796, 2006.

MICHIELS, J. E. et al. In vitro emergence of high persistence upon periodic aminoglycoside challenge in the ESKAPE pathogens. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 8, p. 4630–4637, 2016.

MICHIELS, J.; FAUVART, M. Bacterial persistence: methods and protocols. **Methods Mol. Biol.** v. 1333. p. 83–100, 2016.

MOISE-BRODER, P. A. et al. Pharmacodynamics of vancomycin and other antimicrobials in patients with *Staphylococcus aureus* lower respiratory tract infections. **Clin Pharmacokinet**, v. 43, n. 13, p. 925–942, 2004.

MONTEIRO, A. S. et al. Effects of alterations in *Staphylococcus aureus* cell membrane and cell wall in antimicrobial resistance. In: ENANY, S. (Org.). *Rise Virulence Antibiot. Resist. Staphylococcus aureus*. InTech, 2017. v. i. p. 13.

NABER, C. K. *Staphylococcus aureus* bacteremia: epidemiology, pathophysiology, and management strategies. **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, n. s4, p. S231–S237, 2009.

NISSONSON, A. R. et al. Clinical and economic outcomes of *Staphylococcus aureus* septicemia in ESRD patients receiving hemodialysis. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 46, n. 2, p. 301–308, 2005.

O'NEILL, J. Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations. **Nature**, v. 510, n. 7503, p. 15–16, 2014.

OBARA, V. Y. et al. Currently used dosage regimens of vancomycin fail to achieve therapeutic levels in approximately 40% of intensive care unit patients. **Revista**

Brasileira de Terapia Intensiva, v. 28, n. 4, p. 380–386, 2016.

OLIVEIRA, G. A. et al. Isolation in Brazil of nosocomial *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 22, n. 7, p. 443–448, 2014.

ONYANGO, L. A.; ALRESHIDI, M. M. Adaptive metabolism in staphylococci: survival and persistence in environmental and clinical settings. **Journal of Pathogens**, v. 2018, p. 1–11, 2018.

PATERSON, G. K. et al. Prevalence and properties of mecC methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in bovine bulk tank milk in great britain. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 3, p. 598–602, 2014.

PEA, F.; VIALE, P. Is the minimum inhibitory concentration of vancomycin an infallible predictor of the clinical outcome of *Staphylococcus aureus* bacteremia treated with vancomycin? **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, n. 4, p. 641–642, 2009.

PENG, H. et al. Walk (S221P), a naturally occurring mutation, confers vancomycin resistance in VISA strain XN108. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 4, p. 1006–1013, 2017.

PITTET, D. Nosocomial bloodstream infections. **A.M.A. Archives of Internal Medicinerch Intern Med**, v. 155, p. 512–555, 1993.

POOLE, K. Bacterial stress responses as determinants of antimicrobial resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.67, n.9, p.2069-2089, 2012.

RICHTER, S. S. et al. Detection of *Staphylococcus aureus* isolates with heterogeneous intermediate-level resistance to vancomycin in the United States. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 12, p. 4203–4207, 2011.

RODRIGUES, M. A. et al. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a University Hospital in the South of Brazil. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 51, n. 1, p. 35–41, 2015.

RODRÍGUEZ-NORIEGA, E. et al. Evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 7, p. e560–e566, jul. 2010.

ROMEIRO, R. S. **Técnica de microgota para contagem de células bacterianas viáveis em uma suspensão**. Disponível em: <<http://www.ufv.br/dfp/bac/uni9.pdf>>. Acesso em: 01 ago. 2018.

RONG, S. L.; LEONARD, S. N. Heterogeneous vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*: a review of epidemiology, diagnosis, and clinical significance. **Annals of Pharmacotherapy**, v. 44, n. 5, p. 844–850, 2010.

ROSSATO, A. M.; REITER, K. C.; D' AZEVEDO, P. A. *Staphylococcus aureus*:

pathogenicity, antimicrobial resistance and clinical implications. **Revista Prevenção de Infecção e Saúde**, v. 4, n. 7625, p. 1–21, 2018.

RUBINSTEIN, E.; KEYNAN, Y. Vancomycin revisited - 60 years later. **Frontiers in Public Health**, v. 2, n. October, p. 1–7, 2014.

RYBAK, M. et al. Therapeutic monitoring of vancomycin in adult patients: a consensus review of the american society of health-system pharmacists, the infectious diseases society of america, and the society of infectious diseases pharmacists. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 66, n. 1, p. 82–98, 2009.

SANTOS, A. L. et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 6, p. 413–423, 2007.

SAVAGE, J. W.; ANDERSON, P. A. An update on modifiable factors to reduce the risk of surgical site infections. **Spine Journal**, v. 13, n. 9, p. 1017–1029, 2013.

SCHMIDT, A.; BÉNARD, S.; CYR, S. Hospital cost of staphylococcal infection after cardiothoracic or orthopedic operations in france: a retrospective database analysis. **Surgical Infections**, v. 16, n. 4, p. 428–435, 2015.

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

SENNEVILLE, E. et al. Outcome and predictors of treatment failure in total hip/knee prosthetic joint infections due to *Staphylococcus aureus*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 53, n. 4, p. 334–340, 2011.

SHIELDS, R. K. et al. *Staphylococcus aureus* infections in the early period after lung transplantation: epidemiology, risk factors, and outcomes. **The Journal of Heart and Lung Transplantation**, v. 31, n. 11, p. 1199–1206, 2012.

SINGH, M. et al. In vitro tolerance of a drug-naïve *Staphylococcus aureus* FDA209P towards vancomycin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 2, p. AAC.01154-16, 2016. Disponível em: <<http://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.01154-16>>.

SMITH, T. C. et al. American journal of infection control molecular and epidemiologic predictors of *Staphylococcus aureus* colonization site in a population with limited nosocomial exposure. **American Journal of Infection Control**, v. 40, n. 10, p. 992–996, 2012.

SMITH, T. L. et al. Emergence of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. **The New England Journal of Medicine**, v. 340, n. 7, p. 493–501, 1999.

SOMERVILLE, G. A. et al. In vitro serial passage of *Staphylococcus aureus*: changes in physiology, virulence factor production, and *agr* nucleotide sequence. **Journal of**

Bacteriology, v. 184, n. 5, p. 1430–1437, 2002.

SORIANO, A. et al. Influence of vancomycin minimum inhibitory concentration on the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n. 2, p. 193–200, 2008.

SPAGNOLO, A. M. et al. *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin in healthcare settings. **Journal of Preventive Medicine Hygiene**, v. 55, p. 137–144, 2014.

SUJATHA, S.; PRAHARAJ, I. Glycopeptide resistance in gram-positive cocci: a review. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, v. 2012, p. 1–10, 2012.

TENOVER, F. C.; MOELLERING JR, R. C. The rationale for revising the clinical and laboratory standards institute vancomycin minimal inhibitory concentration interpretive criteria for *Staphylococcus aureus*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 44, n. 9, p. 1208–1215, 2007.

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

TRAXLER, M. F. et al. Discretely calibrated regulatory loops controlled by ppGpp partition gene induction across the “feast to famine” gradient in *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 79, n. 4, p. 830–845, 2011.

TROIDLE, L. et al. Complications associated with the development of bacteremia with *Staphylococcus aureus*. **Hemodial Int**, v. 11, n. 1, p. 72–75, 2007.

TUOMANEN, E. et al. The rate of killing of *Escherichia coli* by beta-lactam antibiotics is strictly proportional to the rate of bacterial growth. **Journal of general microbiology**, v. 132, n. 5, p. 1297–304, 1986.

VAN ACKER, H.; COENYE, T. The role of reactive oxygen species in antibiotic-mediated killing of bacteria. **Trends in Microbiology**, v. 25, n. 6, p. 456–466, 2017.

VANDECASTEELE, S. J.; BOELAERT, J. R.; DE VRIESE, A. S. *Staphylococcus aureus* infections in hemodialysis: what a nephrologist should know. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 4, n. 8, p. 1388–1400, 2009.

VANDECASTEELE, S. J.; DE VRIESE, A. S.; TACCONELLI, E. The pharmacokinetics and pharmacodynamics of vancomycin in clinical practice: evidence and uncertainties. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 4, p. 743–748, 2013.

VITÓRIA, M. P. et al. Low serum trough concentrations and high vancomycin minimum inhibitory concentration in methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* from hemodialysis patients in Brazil. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 41, n. 1, p. 38–43, 2019.

XU, J. et al. Phenotypic and molecular characterisation of *Staphylococcus aureus* with susceptibility derived in vitro. **Open Medicine**, v. 13, n. 1, p. 475-486, 2018.

WANG, F. et al. Insights into key interactions between vancomycin and bacterial cell wall structures. **ACS Omega**, v. 3, n. 1, p. 37-45, 2018.

WANG, Z. et al. Staphylococcal enterotoxin b-induced t-cell anergy is mediated by regulatory t cells. **Immunology**, v. 94, p. 331-339, 1998.

WEIDENMAIER, C. et al. Role of teichoic acids in *Staphylococcus aureus* nasal colonization, a major risk factor in nosocomial infections. **Nature Medicine**, v. 10, n. 3, p. 243-245, 2004.

WEINER, L. 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 & Hospital Epidemiology**, v. 37, n. 11, p. 1288-1301, 2016.

WELSH, Kerry J. et al. Predictors of relapse of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia after treatment with vancomycin. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 10, p. 3669-3672, 2011.

WHO. Antibacterial agents in clinical development. **Geneva: World Health Organization; 2017**, p. 48, 2017.

WISPLINGHOFF, H. et al. Nosocomial bloodstream infections in us hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. **Clinical Infectious Diseases**, v. 39, n. 3, p. 309-317, 2004.

YAMAMOTO, T. et al. Review article genetic nature and virulence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **BioMedicine**, v. 3, n. 1, p. 2-18, 2013.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

ANEXOS

ANEXO A – Composição de meios de cultura e reagentes

1. Meio crio-preservante:

Peptona de proteose 6,75 g

Fosfato de potássio dibásico anidro 1,8 g

Fosfato de potássio monobásico 0,45 g

Cloreto de sódio P.A 2,25 g

Glicerina P.A 45 mL

Água destilada 450 mL

A solução deve ser autoclavada a 121 °C durante 15 minutos e estocada de 2 a 8 °C.

2. Ágar Luria Bertani *in house*:

Pesar 10 g de Triptona (Kasvi, Itália), 5 g de extrato de levedura em pó (Isofar Indústria e Comércio de Produtos Químicos, Brasil), 10 g de NaCl (para testar oxacilina, foi utilizado 2% (m/v) a mais do sal) e 15 g de ágar-ágar em pó (Sigma-Aldrich®, Brasil). Dissolver os pós em 1 L de água deionizada, ajustar o pH ($\approx 7,2$) e autoclavar por 30 minutos a 121 °C. Após resfriamento (50 – 60 °C), distribuir aproximadamente 25 mL de ágar LB em placas de Petri 15 x 90 mm.

ANEXO B – Preparo das soluções estoque de antimicrobianos

As soluções estoques foram preparadas com base no volume obtido a partir da aplicação da fórmula a seguir:

$$Volume = \frac{peso \times potência}{concentração\ final}$$

Onde,

Volume é dado em mL;

Peso em mg;

Potência em µg/mg, encontrado no certificado de análise emitido pelo fabricante;

Concentração final desejada em µg/mL.

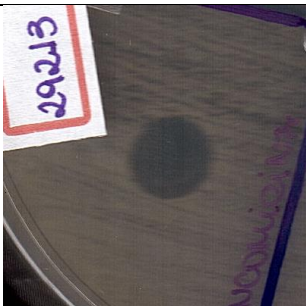
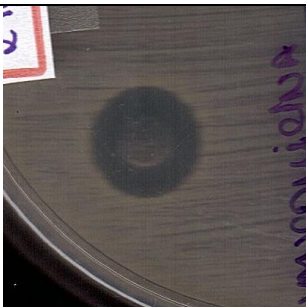
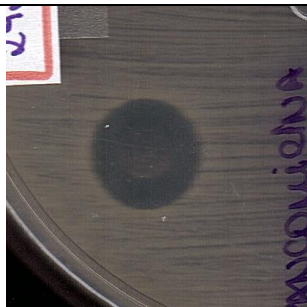
As soluções estoque foram preparadas conforme definidas as concentrações de desejadas para os testes, descritas na Tabela 6. Após completa dissolução, as soluções foram homogeneizadas e aliqotadas em microtubos, seguidas de congelamento foi a -20 °C.

Tabela 6 – Dados para o cálculo do volume final das soluções estoque.

Antimicrobiano	Concentração final (µg/mL)	Potência (µg/mg)	Diluyente	Peso (g)
Vancomicina	1000	998	Água destilada	0,01
Vancomicina	2000	998	Água destilada	0,02
Ciprofloxacino	1000	995	Água destilada	0,01
Oxacilina	1000	900	Água destilada	0,01

ANEXO C – Resultado do ensaio de disco difusão modificado para vancomicina

Quadro 3 - Crescimento de colônias, após a retirada do disco contendo 2,5 µg de vancomicina, em E10.6, E100 e ATCC 29213.

Amostras	Vancomicina 2,5 µg	
	24 h	48 h
ATCC® 29213™		
E10.6		
E100	