

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

MARALISI COUTINHO BARBOSA

**DETERMINAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE À  
VANCOMICINA E AVALIAÇÃO DE ATRIBUTOS DE VIRULÊNCIA EM  
AMOSTRAS DE *Staphylococcus aureus* ISOLADAS DE  
BACTEREMIAS**

VITÓRIA  
2018

MARALISI COUTINHO BARBOSA

**DETERMINAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE À  
VANCOMICINA E AVALIAÇÃO DE ATRIBUTOS DE VIRULÊNCIA EM  
AMOSTRAS DE *Staphylococcus aureus* ISOLADAS DE  
BACTEREMIAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial de obtenção do Grau de Mestre em Doenças Infecciosas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Ferreira Nunes

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Kênia Valéria dos Santos

VITÓRIA

2018

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)  
(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do  
Espírito Santo, ES, Brasil)  
Bibliotecário: Rafael Lima de Carvalho – CRB-6 MG-002926/O

---

B238d Barbosa, Maralisi Coutinho, 1992 -  
Determinação da suscetibilidade à vancomicina e avaliação de  
atributos de virulência em amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de  
bacteremias / Maralisi Coutinho Barbosa – 2018.  
131 f. : il.

Orientador: Ana Paula Ferreira Nunes.  
Coorientador: Kênia Valéria dos Santos.

Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas) – Universidade Federal  
do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. *Staphylococcus aureus*. 2. Bacteremia. 3. Vancomicina. 4. Virulência.  
I. Nunes, Ana Paula Ferreira. II. Santos, Kênia Valéria. III. Universidade  
Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61

---



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

PARECER ÚNICO DA COMISSÃO JULGADORA DE DISSERTAÇÃO DE  
MESTRADO

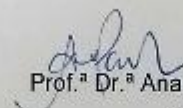
A mestranda **Maralisi Coutinho Barbosa** apresentou a dissertação intitulada "DETERMINAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE À VANCOMICINA E CARACTERIZAÇÃO DE ATRIBUTOS DE VIRULÊNCIA EM AMOSTRAS DE *Staphylococcus aureus* ISOLADAS DE BACTEREMIA" em sessão pública, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Doenças Infecciosas, do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo.

Considerando a apresentação oral dos resultados, sua qualidade e relevância, a Comissão Examinadora decidiu (✓) **aprovar** ( ) **reprovar** a dissertação habilitando a bióloga MARALISI COUTINHO BARBOSA a obter o Grau de MESTRE EM DOENÇAS INFECCIOSAS.

Vitória, ES, 12 de março de 2018.

  
Prof. Dr. Ricardo Pinto Schuenck  
(Membro Interno)

  
Prof. Dr. Servio Tulio Alves Cassini  
(Membro Externo)

  
Prof.ª Dr.ª Ana Paula Ferreira Nunes  
(Orientadora)

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Mara e Lisias, por me amarem incondicionalmente e dedicarem a maior parte de suas vidas para me conceber a maior riqueza de todas, a educação. Vocês são os maiores e melhores exemplos de seres humanos, sem vocês eu nada seria.

Ao meu irmão, Lisimar, por me ensinar a ser dedicada, disciplinada e a nunca cessar a busca por conhecimento.

À minha orientadora Prof. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Ferreira Nunes por ter aberto as portas do seu laboratório para mim, ter me instruído e ensinado muito sobre um pouco do universo acadêmico, bem como, se dedicado na construção e qualidade desta obra.

À minha coorientadora Prof. Dr<sup>a</sup>. Kênia Valéria dos Santos por também ter me acolhido como parte da sua equipe, estar sempre disposta a ajudar, esclarecer e orientar da melhor maneira possível. Você foi essencial, pois me ensinou a ter, acima de tudo, sabedoria.

Aos meus colegas do RESBAC, BioMA-Lab, LabCAS e LabGIV porque sempre estiveram dispostos a me auxiliar na preparação e realização dos experimentos além de compartilharem comigo experiências e ensinamentos. Em especial, Nayara por ter se mostrado uma verdadeira amiga ao longo desses anos!

Aos técnicos do Departamento de Patologia, em especial os do setor de microbiologia, Érica, Heloísa, Lia, Célia, Simone e Geraldo, por terem sido extremamente solícitos nos momentos em que precisei de ajuda e também por dividirem comigo tantos momentos de descontração e alegria nos cafés da tarde.

Ao Prof. Dr<sup>o</sup>. André Luis Souza dos Santos e toda a equipe do Laboratório de Investigação de Peptidases da Universidade Federal do Rio de Janeiro, em especial, a doutoranda Ana Clara Milesi Galdino, por terem me recepcionado muito bem e por me ensinarem tanto, sobre inúmeras coisas, em pouquíssimo tempo.

Aos professores doutores Ricardo e Liliana por terem cedido diversas vezes a estrutura física e os equipamentos necessários para a realização dos experimentos, bem como, estarem sempre dispostos para sanar quaisquer questionamento científico.

À minha avó, Maria de Lourdes, que me ensina todos os dias que o amor está nas pequenas coisas.

À minha família e aos meus verdadeiros amigos: muito obrigada por todo incentivo, vibrações positivas e companheirismo ao longo desses anos! Obrigada por torcerem pelo meu sucesso!

Aos meus colegas de turma, Débora, Rhayane, Sabrina, Raphael, Mariana e Karina por terem compartilhado comigo lágrimas, ansiedade, angústia mas principalmente, sorrisos, alegria, carinho e amizade. Vocês deixaram essa experiência ainda mais singular e foram essenciais para que eu conseguisse chegar até aqui!

Ao programa de pós-graduação em Doenças Infecciosas agradeço imensamente a oportunidade de aprendizado.

A CAPES, CNPq e FAPES o meu muito obrigada por tornarem este trabalho realidade!

## RESUMO

*Staphylococcus aureus* é um dos principais patógenos causador de uma gama de infecções tanto nosocomiais quanto comunitárias. Bacteremias são constantes e apresentam altos índices de mortalidade e morbidade em todo o globo. A vancomicina (van) é a terapia empírica para tratamento de infecções por cocos Gram-positivos em pacientes hemodialíticos. Em 1997 surgiram estirpes de *S. aureus* com suscetibilidade reduzida para van (VISA e hVISA). Estes isolados são associados a falhas terapêuticas por van e recidivas. O objetivo deste trabalho foi caracterizar amostras de *S. aureus* cultivadas em altas concentrações de van quanto à suscetibilidade e atributos de virulência. Quarenta e uma amostras de *S. aureus* isoladas de pacientes hemodialíticos com bacteremias (parentais) foram crescidas em 4 a 16 µg/mL de van e reisoladas após este teste, sendo denominadas derivadas. Foram isoladas derivadas de todas as 41 amostras *S. aureus*. Todas as amostras parentais e derivadas foram suscetíveis à van. A concentração mínima inibitória (CMI) de van nas amostras derivadas apresentou um aumento em relação as parentais, porém, dentro dos parâmetros de suscetibilidade pelo *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI). Vinte e quatro pulsotipos foram identificados através da técnica de PFGE e nove amostras (22%) apresentaram resistência à meticilina através do disco de cefoxitina e amplificação do gene *mecA*. Nove amostras derivadas isoladas em 16 µg/mL de van conseguiram crescer na presença de 8 µg/mL de van. A produção de biofilme e de cinco enzimas hidrolíticas foi menor nas amostras derivadas. A virulência das estirpes derivadas foi avaliada em modelo *in vivo* com *Galleria mellonella*, sendo que duas amostras derivadas apresentaram diminuição e uma aumento da virulência. Não houve diferença entre parentais e derivadas quanto a autólise, produção de δ-hemolisina, ligação ao fibrinogênio e viabilidade metabólica. Apesar de crescerem em concentrações altas de van as estirpes derivadas apresentaram crescimento lento e CMI na faixa de suscetibilidade, indicando tolerância. De todos os fatores de virulência testados a pressão seletiva com van afetou apenas a produção de biofilme e cinco enzimas hidrolíticas. No modelo *in vivo* a virulência das derivadas foi variada, indicando que ser estirpe-dependente.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*; Bacteremia; Vancomicina; Virulência; CMI.

## ABSTRACT

*Staphylococcus aureus* is one of the main pathogens causing a range of nosocomial and community infections. Bacteremias are constant and presents high rates of mortality and morbidity in worldwide. Vancomycin (van) is the empirical therapy for treatment of Gram-positive cocci infections in hemodialytic patients. In 1997, *S. aureus* strains arised with reduced susceptibility to van (VISA and hVISA). These isolates are associated with therapeutic failures by van and recurrence. The objective of this work was to characterize samples of *S. aureus* grown at high concentrations of van as for susceptibility and virulence attributes. Forty-one *S. aureus* strains isolated from hemodialytic patients with bacteremias (parental) were grown in 4 to 16  $\mu\text{g} / \text{mL}$  of van and reisolated after this test, being called derivatives. Derivatives from all 41 *S. aureus* strains were isolated. All parental and derivatives strains were susceptible to van. The minimum inhibitory concentration (MIC) of van in the derivatives strains presented an increase in relation to the parental, but within the parameters established by the *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI). Twenty-four pulsotypes were identified using the PFGE technique and nine strains (22%) showed resistance to methicillin through the cefoxitin disc and amplification of the *mecA* gene. Nine derivatives strains isolated in 16  $\mu\text{g} / \text{mL}$  van were able to grow in the presence of 8  $\mu\text{g} / \text{mL}$  van. Biofilm and five hydrolytic enzymes production were smaller in the derivatives strains. The virulence of the derivatives strains was evaluated in an *in vivo* model with *Galleria mellonella*, with two derivatives strains showing decreased virulence and one increased. There was no difference between parentals and derivatives regarding autolysis,  $\delta$ -hemolysin production, fibrinogen binding and metabolic viability. Although they grew at high van concentrations, the derivatives strains showed slow growth and MIC at the van susceptibility range, indicating tolerance. Of all the virulence factors tested, the selective pressure with van only affected the biofilm production and five hydrolytic enzymes. In the *in vivo* model the virulence of the derivatives was varied, indicating that it was strain-dependent.

Keywords: *Staphylococcus aureus*; Bacteremia; Vancomycin; Virulence; CMI.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema da estrutura do peptidoglicano.....	31
Figura 2 - Esquema representativo da ligação da vancomicina ao pentapeptídeo do peptidoglicano na parede celular bacteriana.....	31
Figura 3 - Ilustração representativa do espessamento de parede celular em amostra VISA.....	34
Figura 4 - Esquema representativo da caracterização de estirpes resistentes, tolerantes e persistentes.....	41
Figura 5 - Fluxograma representativo do delineamento experimental usado na caracterização das amostras quanto a clonalidade, perfil de suscetibilidade a oxacilina e a vancomicina.....	47
Figura 6 - Dendograma representativo do grau de similaridade entre as 41 amostras parentais de <i>S. aureus</i> isoladas de bacteremia de pacientes em tratamento hemodialítico após a fragmentação do DNA cromossômico.....	59
Figura 7 - Atividade autolítica das 41 amostras de <i>S. aureus</i> parentais, amostras padrão ATCC 29213, Mu50, Mu3 e suas respectivas amostras derivadas.....	61
Figura 8 - Atividade autolítica das amostras parentais e derivadas, conforme grupo de isolamento V4 n=15 (A), V6 n=8 (B), V12 n=9 (C) e V16 n=9 (D).....	63
Figura 9 - Curvas de crescimento de nove amostras parentais de <i>S. aureus</i> e suas respectivas derivadas (V16).....	64
Figura 10 - Produção de biofilme das amostras de <i>S. aureus</i> parentais e derivadas n=41.....	64

Figura 11 - Distribuição das 41 amostras parentais de <i>S. aureus</i> e suas respectivas amostras derivadas quanto a intensidade de formação de biofilme.....	65
Figura 12 - Produção de biofilme das amostras de <i>S. aureus</i> parentais e derivadas dos grupos V4 n=15, V6 n=8 e V12 n=9.....	65
Figura 13 - Ensaio de adesão ao fibrinogênio em 30 amostras de <i>S. aureus</i> parentais e suas respectivas amostras derivadas.....	66
Figura 14 - Distribuição das 41 amostras parentais de <i>S. aureus</i> e suas respectivas amostras derivadas quanto a produção de $\delta$ -hemolisina.....	67
Figura 15 - Foto ilustrativa da produção de $\delta$ -hemolisina em amostra parental (28) e não produção na respectiva amostra derivada (28V16).....	67
Figura 16 - Produção de cinco enzimas hidrolíticas nas amostras de <i>S. aureus</i> parentais (n=41), amostras padrão ATCC 29213, Mu50, Mu3 e suas respectivas derivadas.....	68
Figura 17 - Efeito do pré-tratamento com vancomicina sobre a viabilidade das células bacterianas parentais e derivadas.....	69
Figura 18 - Curva de sobrevivência de larvas de <i>G. mellonella</i> infectadas com as amostras 23 e 23V16 nas concentrações de $10^6$ e $10^5$ UFC/mL durante 96 horas.....	70
Figura 19 - Curva de sobrevivência de larvas de <i>G. mellonella</i> infectadas com as amostras 28 e 28V16 nas concentrações de $10^6$ e $10^5$ UFC/mL durante 96 horas.....	71
Figura 20 - Curva de sobrevivência de larvas de <i>G. mellonella</i> infectadas com as amostras 99 e 99V16 nas concentrações de $10^6$ e $10^5$ UFC/mL durante 96 horas.....	72

Figura 21 - Curva de sobrevivência de larvas de *G. mellonella* infectadas com as amostras 127 e 127V16 nas concentrações de  $10^6$  e  $10^5$  UFC/mL durante 96 horas..... 73

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição dos microrganismos notificados como agentes etiológicos de infecções primárias de corrente sanguínea em pacientes hospitalizados em unidades de terapia intensiva adulto de 2.036 hospitais de janeiro a dezembro de 2015 no Brasil.....	25
Tabela 2 - Distribuição das 41 amostras clínicas de <i>S. aureus</i> conforme crescimento em diferentes concentrações de vancomicina.....	60
Tabela 3 - CMI para vancomicina das 41 amostras de <i>S. aureus</i> parentais e suas respectivas derivadas.....	61
Tabela 4 - Perfil de pressão seletiva com vancomicina e de atributos de virulência de quatro amostras derivadas V16.....	74

## LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

- agr* - gene assessório regulatório (do inglês *assessory gene regulatory*)
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- ATCC - Coleção de Microrganismos Norte Americana (do inglês, *American Type Culture Collection*)
- AUC/MIC - área sob a curva / concentração mínima inibitória (do inglês, *Area Under the Curve/ Minimum Inhibitory Concentration*)
- BHI - *Brain Hearth Infusion*
- BHIA - *Brain Hearth Infusion Agar*
- BIOMA-Lab - Laboratório de Biologia de Microrganismos e Antimicrobianos
- CC - complexo clonal (do inglês, *Clonal Complex*)
- CaCl<sub>2</sub> - cloreto de cálcio
- CAMHB - caldo Mueller Hinton II ajustado com cátions
- CEP - Comitê de Ética em Pesquisa
- CDC - Centro de Prevenção e Controle de Doenças (do inglês, *Centers for Disease Control and Prevention*)
- CDL - cateter de duplo lúmen
- CLSI - Instituto de Normas Laboratoriais e Clínicas (do inglês, *Clinical & Laboratory Standards Institute*)
- CMI* - concentração mínima inibitória
- DNA* - ácido desoxirribonucleico (do inglês, *DeoxyriboNucleic Acid*)
- DO - densidade óptica
- DPc - desvio padrão da amostra ATCC *Staphylococcus epidermidis*
- EUA - Estados Unidos da América
- ECDC - Centro Europeu para o Controle de Doenças e Prevenção (do inglês, *European Centre for Disease Prevention and Control*)
- EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês, *Ethylenediamine tetraacetic acid*)
- FAPES - Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo
- FAV - fístula arteriovenosa nativa
- FeSO<sub>4</sub> - sulfato de ferro
- HDP - peptídeos catiônicos antimicrobianos (do inglês, *Host Defense Peptides*)
- ICS - infecções da corrente sanguínea

IRAS - infecções relacionadas à assistência a saúde

KCl - cloreto de potássio

MA - média aritmética

MBC - mínima concentração bactericida (do inglês, *Minimum Bactericidal Concentration*)

MDK - mínima duração de morte (do inglês, *Minimum Duration of Killing*)

MgCl<sub>2</sub> - cloreto de magnésio

MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O - sulfato de magnésio heptahidratado

MHB - caldo Mueller-Hinton (do inglês, *Mueller-Hinton Broth*)

MnSO<sub>4</sub> - sulfato de manganês

MSCRAMMs - moléculas adesivas da matriz reconhecedoras de componentes da superfície (do inglês, *Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules*)

MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (do inglês, *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*)

MSSA - *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina (do inglês, *Methicillin-Susceptible Staphylococcus aureus*)

NaCl - cloreto de sódio

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> - sulfato de amônio

PAP/AUC - análise de perfil populacional / área sobre a curva (do inglês, *Population analysis profile / Area Under the Curve*)

PBP - proteína ligante de penicilina

PBP 2a - proteína ligante de penicilina 2a (do inglês, *Penicillin-Binding Protein 2a*)

PBS - salina tamponada com fosfato (do inglês, *Phosphate Buffered Saline*)

PCR - reação em cadeia da polimerase (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*)

PFGE - eletroforese em campo pulsado (do inglês, *Pulsed Field Gel Electrophoresis*)

SCC<sub>mec</sub> - cassete cromossômico estafilocócico *mec* (do inglês, *Staphylococcal Cassete Chromosome mec*)

SCoN - *Staphylococcus* coagulase-negativa

SCV - variante com colônia pequena (do inglês, *Small Colony Variant*)

Smal - enzima de restrição extraída de *Serratia marcescens*

TCS - sistema de transdução de sinal de dois componentes (do inglês, *Two-Component signal transduction Systems*)

Tris-HCl - *Tris (hydroxymethyl) aminomethane* - ácido clorídrico

TRR - terapia renal repositiva

UFES - Universidade Federal do Espírito Santo

UAACN - Unidade de Assistência em Alta Complexidade em Nefrologia

hetero-VISA - *Staphylococcus aureus* heterogêneo com suscetibilidade intermediária à vancomicina (do inglês, *Heterogeneous Vancomycin Intermediate-Resistant Staphylococcus aureus*)

VISA - *Staphylococcus aureus* com suscetibilidade intermediária à vancomicina (do inglês, *Vancomycin Intermediate-Resistant Staphylococcus aureus*)

VRE - Enterococos resistentes a vancomicina (do inglês, *Vancomycin-Resistant Enterococci*)

VRSA - *Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina (do inglês, *Vancomycin-Resistant S. aureus*)

VSSA - *Staphylococcus aureus* sensível à vancomicina (do inglês, *Vancomycin-Susceptible Staphylococcus aureus*)

XTT - hidróxido de 2,3-bis(2-metóxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[fenilamina)carbonil]-2H-tetrazólio

## LISTA DE SÍMBOLOS

% - por cento

° - graus

°C - graus Celsius

*g* - força gravitacional

h - horas

kb - quilobase

M - molar

mL - mililitro

mm - milímetro

mM - milimolar

pb - pares de base

pmoles - picomoles

pH - potencial hidrogeniônico

p/v - partes por volume

U - unidade de medida

UFC/mL - unidades formadoras de colônia por mililitro

V - voltz

V/cm - voltz por centímetro

v/v - volume por volume

µg - micrograma

µg/mL - micrograma por mililitro

µL - microlitro

µM - micromolar



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>19</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>22</b>
2.1 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	22
<b>2.1.1 Bacteremias por <i>S. aureus</i></b> .....	<b>26</b>
2.2 VANCOMICINA .....	29
<b>2.2.1 História e mecanismo de ação</b> .....	<b>29</b>
<b>2.2.2 Suscetibilidade reduzida à vancomicina</b> .....	<b>32</b>
<b>2.2.3 Fatores de virulência</b> .....	<b>34</b>
<b>2.2.4 Emergência e importância clínica de hVISA e VISA</b> .....	<b>37</b>
<b>2.2.5 Tolerância e persistência</b> .....	<b>39</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>45</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	45
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	45
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>46</b>
4.1 TIPO DE ESTUDO .....	46
4.2 AMOSTRAS BACTERIANAS .....	46
4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....	46
4.4 CARACTERIZAÇÃO AMOSTRAL .....	47
<b>4.4.1 Determinação da relação clonal das amostras</b> .....	<b>47</b>
4.4.1.1 Eletroforese em campo pulsado (PFGE) .....	47
<b>4.4.2 Determinação da suscetibilidade à meticilina</b> .....	<b>49</b>
4.4.2.1 Difusão do disco .....	49
4.4.2.2 Pesquisa do gene <i>mecA</i> .....	49
4.4.2.2.1 Liberação do DNA bacteriano .....	49
4.4.2.2.2 PCR para detecção do gene <i>mecA</i> .....	50
4.5 PRESSÃO SELETIVA COM VANCOMICINA .....	50
<b>4.5.1 Isolamento e caracterização das amostras derivadas</b> .....	<b>50</b>
<b>4.5.2 Determinação da CMI para vancomicina</b> .....	<b>51</b>
<b>4.5.3 Ensaio de autólise</b> .....	<b>52</b>
<b>4.5.4 Curva de crescimento</b> .....	<b>52</b>
4.6 AVALIAÇÃO DOS ATRIBUTOS DE VIRULÊNCIA E VIABILIDADE METABÓLICA DE AMOSTRAS DERIVADAS .....	53

4.6.1	Produção de biofilme .....	53
4.6.2	Ensaio de adesão ao fibrinogênio .....	54
4.6.3	Produção de $\delta$ -hemolisina .....	54
4.6.4	Análise da atividade de enzimas hidrolíticas .....	55
4.6.5	Avaliação da viabilidade metabólica .....	56
4.6.6	Análise da virulência em modelo invertebrado com <i>Galleria mellonella</i> .....	57
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	57
5	RESULTADOS .....	58
5.1	DETERMINAÇÃO DA RELAÇÃO CLONAL DAS AMOSTRAS .....	58
5.1.1	Eletroforese em campo pulsado (PFGE) .....	58
5.2	SUSCEPTIBILIDADE À METICILINA .....	58
5.3	PRESSÃO SELETIVA COM VANCOMICINA .....	58
5.3.1	Isolamento e caracterização das amostras derivadas .....	58
5.3.2	Determinação da CMI para vancomicina .....	60
5.3.3	Ensaio de autólise .....	61
5.3.4	Curva de crescimento .....	62
5.4	AVALIAÇÃO DOS ATRIBUTOS DE VIRULÊNCIA E VIABILIDADE METABÓLICA DE AMOSTRAS DERIVADAS .....	62
5.4.1	Produção de biofilme .....	62
5.4.2	Ensaio de adesão ao fibrinogênio .....	66
5.4.3	Produção de $\delta$ -hemolisina .....	66
5.4.4	Análise da atividade de enzimas hidrolíticas .....	67
5.4.5	Avaliação da viabilidade metabólica .....	69
5.4.6	Análise da virulência em modelo invertebrado com <i>Galleria mellonella</i> .....	69
6	DISCUSSÃO .....	75
7	CONCLUSÕES .....	87
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	88
	ANEXO A .....	130

## 1 INTRODUÇÃO

*Staphylococcus aureus* é o agente etiológico mais comum de infecções nosocomiais e comunitárias (GELATTI et al. 2009; SHENOY et al. 2014). *S. aureus* causa uma variedade de doenças como infecções de pele e tecidos moles, do trato urinário, endocardite, osteomielite, pneumonia, meningite e bacteremia (FYSARAKI et al. 2013; HOLLAND et al. 2014; DAYAN et al. 2016), sendo esta última a infecção mais importante atualmente (MARZEC et al. 2016) pois, é constantemente associada a altos índices de morbidade e mortalidade em todo o mundo (DAYAN et al. 2016). A incidência anual de bacteremia por *S. aureus* nos Estados Unidos da América (EUA) varia de 4.3 a 38.2 em 100.000 indivíduos/ano (HOLLAND et al. 2014). As taxas de morbidade em bacteremias geradas por *S. aureus* variam de 15 a 25% e as taxas de mortalidade, que vêm aumentando principalmente nas últimas décadas, estão entre 14 e 45% (CHANG et al. 2003; LAHEY et al. 2009; LAUPLAND et al. 2013; RONGPHARPI et al. 2014). Recentes estudos em centros de diálise demonstraram que *S. aureus* foi o patógeno mais frequentemente isolado de infecções da corrente sanguínea em pacientes hemodialíticos com taxas variando de 31 a 38% dos casos (NGUYEN et al. 2017; WORTH et al. 2017; ZHANG et al. 2017).

A emergência de linhagens de *S. aureus* resistentes à metilicina (MRSA do inglês, *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*) a partir da década de 1960 (JEVONS, 1961; LOWY et al. 2003), levou ao uso disseminado de vancomicina na terapia antimicrobiana. Apesar de novas opções terapêuticas contra MRSA como daptomicina, linezolid e cefalosporinas de 5ª geração (CLAEYS et al. 2016; HOLUBAR et al. 2016; KULLAR et al. 2016), a vancomicina continua sendo a primeira opção, devido ao seu relativo baixo custo e favorável farmacocinética / farmacodinâmica, especialmente importante em pacientes com insuficiência renal (LAPLANTE et al. 2004; VANDECASTEELE et al. 2013; HENSON et al. 2015). Pacientes que fazem terapia renal substitutiva por meio de hemodiálise possuem alto risco para infecções por MRSA, de forma que a vancomicina é o antimicrobiano de primeira escolha para a terapia empírica contra bacteremias por cocos Gram-positivos (ALLON et al. 2007; CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2007).

Embora seja utilizada há mais de 50 anos, a resistência à vancomicina ainda é evento raro. Em 1997 surgiram, no Japão, cepas de *S. aureus* com resistência intermediária à vancomicina (VISA do inglês, *Vancomycin-Intermediate S.*

*aureus*) as quais são predominantemente encontradas em amostras MRSA (HIRAMATSU et al. 1997; KOH et al. 2016). Na mesma época surgiu também no Japão a cepa de *S. aureus* heterorresistente à vancomicina (hVISA do inglês, *Heterogeneous Vancomycin-Intermediate S. aureus*) caracterizada por sensibilidade à vancomicina mas com uma subpopulação com resistência intermediária (HITRAMATSU et al. 1997; CLSI, 2017).

Apesar de sua excelente atividade contra *S. aureus*, alguns estudos vêm mostrando falhas terapêuticas e recidivas de infecções da corrente sanguínea causadas por estirpes com concentração mínima inibitória (CMI) de 1.5 µg/mL, embora dentro da categoria de sensibilidade (HOLLAND et al. 2011; DHAND et al. 2012; FALCÓN et al. 2016). No contexto da emergência de *S. aureus* com suscetibilidade reduzida à vancomicina surgiu o termo *MIC creep* que define estirpes de *S. aureus* com CMI de vancomicina entre 1.5 e 2 µg/mL (DHAND et al. 2012; RUIZ et al. 2016). Incrementos da CMI podem estar relacionadas à pressão seletiva imposta por terapias antimicrobianas longas e com concentrações séricas do antimicrobiano abaixo da CMI para o referido patógeno, condição esta frequente em pacientes renais crônicos que fazem hemodiálise (HOWDEN et al. 2004; SAKOULAS et al. 2006; MARENCO et al. 2010; VITÓRIA et al. 2013).

Falhas terapêuticas de infecções causadas por microrganismos categorizados como suscetíveis nos testes de rotina, *in vitro*, podem revelar o fenômeno da tolerância bacteriana. Microrganismos tolerantes apresentam a mesma CMI que microrganismos sensíveis, mas sua taxa de morte é mais lenta, devido à sua lenta taxa de replicação. Assim, se sua fase *lag* é mais longa do que o intervalo entre doses, ela escapará da atividade bactericida do antimicrobiano (BRAUNER et al. 2016; LI et al. 2017). Neste estudo mostramos que isolados clínicos de *S. aureus* cultivados em elevadas concentrações de vancomicina retém a característica de suscetibilidade, sugerindo o fenômeno de tolerância. Se falhas terapêuticas de infecções por *S. aureus* com CMI dentro da suscetibilidade estão relacionadas à virulência diferenciada destas amostras, ainda é questão de debate na comunidade científica. Alguns estudos de infecção em modelo animal demonstraram atenuação da virulência em estirpes hVISA (PELEG et al. 2009; CAMERON et al. 2011). No estudo de van HAL e colaboradores (2011) foi demonstrado que a CMI de vancomicina alta na faixa de suscetibilidade (2 µg/mL), estava relacionada com maior mortalidade dos pacientes com bacteremia por MRSA, porém, inversamente

relacionada com sintomas de choque séptico nestes pacientes. Outros estudos demonstraram que estirpes hVISA estão associadas com bacteremias persistentes, porém, inversamente relacionadas com a mortalidade dos pacientes (SORIANO et al. 2008; HOLMES et al. 2011). Dessa forma, buscamos investigar nestas amostras clínicas cultivadas em elevadas concentrações de vancomicina padrões diferenciados de patogenicidade, utilizando um modelo invertebrado *in vivo*, além da caracterização de alguns atributos de virulência das amostras.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* é uma bactéria Gram-positiva produtora de catalase e pertencente ao gênero *Staphylococcus*, cuja nomenclatura deriva do grego *staphylé*, que em português significa "cachos de uva" e *coccus* "grão" ou "semente", caracterizando essas bactérias por sua apresentação estrutural. A descoberta de *S. aureus* foi feita pelo cirurgião alemão Anton J. Rosenbach (1842-1923) em 1884 (ROSENBACH, 1884). As células de *S. aureus* possuem diâmetro entre 0.5 e 1.5 µm, são imóveis e não esporulam. *S. aureus* cresce em meios comuns, caldo ou ágar simples, à temperatura ótima de 35°C. Essa espécie se desenvolve também na presença de 7.5% de cloreto de sódio e produz coagulase, enzima que caracteriza a espécie (CASSETTARI et al. 2005). Suas colônias apresentam coloração dourada quando visualizadas em meio de cultura sólido, sendo que é dessa característica que deriva o nome *aureus*, que no latim significa "ouro" (TORTORA et al. 2012) e medem, em média, 1 a 2 mm de diâmetro, apresentam formato arredondado, textura cremosa e coloração variável entre cinza a amarelo-ouro (BANNERMAN et al. 2007).

*S. aureus* é um microrganismo comensal do homem e habita, principalmente, as narinas anteriores, sendo este local um reservatório natural dessa bactéria em humanos (WERTHEIM et al. 2005; van BELKUM et al. 2009). A colonização por *S. aureus* vem sendo apontada como um fator de risco no desenvolvimento de infecções nosocomiais e comunitárias (von EIFF et al. 2001; REBOLLO-PEREZ et al. 2011). Cerca de 20% da população mundial é considerado portadora persistente de *S. aureus*, 66% dos humanos carregam essa bactéria de forma intermitente e aproximadamente 20% das pessoas nunca foram colonizadas por esse patógeno (ABAD et al. 2013). Pacientes identificados como portadores nasais de *S. aureus* na admissão hospitalar foram associados a um risco três vezes maior de desenvolverem bacteremia nosocomial por *S. aureus* sensível à meticilina (MSSA do inglês, *Methicillin-Susceptible S. aureus*) (WERTHEIM et al. 2004; ABAD et al. 2013). Em cerca de 80% das bacteremias em portadores nasais de *S. aureus*, a estirpe isolada do sangue é idêntica a isolada das narinas do paciente, confirmando que a fonte da bacteremia foi a colonização por esse patógeno (von EIFF et al. 2001; LAHEY et al. 2009). Entretanto, têm sido observadas uma mortalidade maior em pacientes não colonizados por MSSA do que os colonizados, indicando que a

colonização apesar de ser fonte de infecção, está associada também a fator protetor por estimular no indivíduo a produção de anticorpos séricos contra as toxinas estafilocócicas (van BELKUM et al. 2009). Dados similares para MRSA não são disponíveis (MARZEC et al. 2016).

Outros sítios como pele, axilas, vagina e períneo também podem ser colonizados em menor frequência e a partir desses sítios as células de *S. aureus* podem colonizar outras regiões (SCANVIC et al. 2001). Como trata-se de bactéria potencialmente patogênica e, quando há quebra da barreira cutânea, devido trauma ou diminuição da imunidade do hospedeiro, consegue instalar infecções endógenas, sendo essas, comuns (GELATTI et al. 2009). Entretanto, outras pessoas podem desenvolver infecções através da aquisição de *S. aureus* de indivíduos portadores ou de fontes ambientais, como alimentos e fômites. A transmissão deste patógeno resulta da colonização transitória das mãos e aspiração de aerossóis de secreções nasais (BANNERMAN, 2003).

Desde 1883, *S. aureus* é reconhecido como o patógeno que mais comumente acomete humanos (OGSTON, 1883) gerando infecções com variáveis níveis de gravidade como leves, tais como, furúnculos, carbúnculos, impetigo e celulites, sendo estas as infecções mais frequentes (YEAMAN et al. 2014). Além disso, devido à sua grande capacidade de produzir toxinas, esta bactéria também é capaz de causar doenças como síndrome do choque tóxico, intoxicações alimentares e síndrome da pele escaldada, sendo estas consideradas infecções graves, assim como, as pós cirúrgicas, pneumonia, meningite, endocardite, sepse, bacteremias, entre outras (dos SANTOS et al. 2007; BUKOWSKI et al. 2010).

*S. aureus* são isolados, com frequência, a partir de infecções de feridas cirúrgicas que podem ser foco para desenvolvimento de infecções sistêmicas. Ademais, como é um microrganismo que habita a epiderme, pacientes que utilizam cateteres endovenosos estão propensos à infecções geradas por *S. aureus* através da invasão da bactéria a partir do local de inserção do cateter. Por consequência, este patógeno pode chegar à circulação sanguínea do hospedeiro causando bacteremia e, a partir deste foco, migrar para diversos sítios anatômicos (BANNERMAN, 2003; CAVALCANTI et al. 2005; GOSBELL, 2005). Como os pacientes hemodialíticos necessitam de um acesso do exterior com o interior do corpo para a filtração do sangue (acesso vascular) e esse, conseqüentemente, quebra a barreira cutânea, sendo um fator de risco para infecções (VANHOLDER et

al. 1993). Entre os acessos vasculares utilizados pelos pacientes hemodialíticos, a fístula arteriovenosa nativa (FAV) é a que apresenta menor risco de infecção nesses pacientes, seguida do cateter de duplo lúmen (CDL) e fístula arteriovenosa sintética (VASCULAR ACCESS, 2006). Porém, uma pequena porção dos pacientes da maioria dos centros de diálise possuem FAVs funcionais (HENRICH, 2011). No Brasil, o número de pacientes hemodialíticos que possuem acesso por cateter venoso central tem aumentado nos últimos anos, chegando a uma taxa de 20% em 2016. Já pacientes hemodialíticos com acesso por enxerto vascular (prótese) foi de 2% em 2016 (SESSO et al. 2017).

Em 2005, mais de 14 milhões de pessoas nos EUA foram atendidas em unidades hospitalares por infecções geradas por *S. aureus*. Em uma estimativa de 2014, a incidência de infecções por *S. aureus* nos EUA variou de 600 mil a 1 milhão por ano (YEAMAN et al. 2014). No estudo do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) dos EUA, foram avaliados os principais patógenos causadores de infecções dos hospitais norte americanos entre 2009 e 2010. De modo geral, foram reportados 81.139 patógenos de 69.475 infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS). Destes, 90% eram bactérias e 10% fungos. *S. aureus* foi o agente mais frequente (15.6%), sendo o principal agente de infecções de sítio cirúrgico (30.4%) e de pneumonia associada à ventilação mecânica (24.1%) e o segundo mais frequente em infecções relacionadas a cateter (12.3%), ficando atrás apenas dos *Staphylococcus* coagulase-negativo (SCoN) (SIEVERT et al. 2013). Na Europa, um estudo mais recente realizado pelo Centro Europeu para o Controle de Doenças e Prevenção (ECDC) entre os anos de 2011 e 2012, revelou que *S. aureus* foi o segundo microrganismo mais comumente isolado (12.3%), atrás apenas de *Escherichia coli* (15.9%), e continua a ser a primeira causa de infecções de sítio cirúrgico (17.9%) (ECDC, 2013).

No Brasil, a prevalência de *S. aureus* em infecções nosocomiais varia entre 15.5 a 68.8% (GALES et. al. 2009; BRATRA et al. 2010; de OLIVEIRA; de PAULA, 2012). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em 2016 publicou o "Boletim de Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde", o qual, avaliou indicadores nacionais das infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) e resistência microbiana do ano de 2015 no país. *S. aureus* foi o terceiro microrganismo mais frequentemente isolado de infecções primárias de corrente sanguínea em pacientes hospitalizados em unidades de terapia intensiva (UTI) de



adultos em 2015 (13.2%), atrás de *Klebsiella pneumoniae* (16.9%) e SCoN (16.5%) (Tabela 1) (ANVISA, 2016). A resistência à oxacilina foi observada em 74.9% das estirpes SCoN e em 57.4% dos isolados *S. aureus* (ANVISA, 2016).

Tabela 1 - Distribuição dos microrganismos notificados como agentes etiológicos de infecções primárias de corrente sanguínea em pacientes hospitalizados em unidades de terapia intensiva adulto de 2.036 hospitais de janeiro a dezembro de 2015 no Brasil. Fonte: ANVISA, 2016.

Ordem de frequência	Microrganismos	Número	%
1 <sup>a</sup>	<i>K. pneumoniae</i>	3.805	16,9
2 <sup>a</sup>	SCoN	3.703	16,5
3 <sup>a</sup>	<i>Staphylococcus aureus</i>	2.959	13,2
4 <sup>a</sup>	<i>Acinetobacter spp.</i>	2.734	12,2
5 <sup>a</sup>	<i>P. aeruginosa</i>	2.242	10,0
6 <sup>a</sup>	<i>Candida spp.</i> <sup>1</sup>	1.711	7,6
7 <sup>a</sup>	<i>E. coli</i>	1.631	7,2
8 <sup>a</sup>	<i>Enterococcus spp.</i> <sup>2</sup>	1.226	5,4
9 <sup>a</sup>	<i>Enterobacter spp.</i> <sup>3</sup>	1.089	4,8
10 <sup>a</sup>	Outras enterobactérias	856	3,8
11 <sup>a</sup>	<i>Serratia spp.</i>	543	2,4
	TOTAL	22.499	100,0

a. Identificação bacteriana realizada de acordo com a metodologia disponível em cada serviço de saúde.

<sup>1</sup> *Candida albicans* (951) e *Candida não-albicans* (760).

<sup>2</sup> *E. faecalis* (601), *E. faecium* (251) e *Enterococcus spp.* (374).

<sup>3</sup> Enterobactérias identificadas como pertencentes ao gênero *Citrobacter spp.*, *Proteus spp.* ou *Morganella spp.*

Ao redor do mundo, todos os anos, milhares de pessoas são acometidas por infecções causadas por *S. aureus*, o que gera altas taxas de morbidade e mortalidade. Além disso, há um aumento de permanência hospitalar e elevação dos custos de tratamento devido a estas infecções (CASEY et al. 2007). Na população hemodialítica, durante a hospitalização, o estado nutricional dos pacientes e a mobilidade pioram e o risco de complicações infecciosas aumenta, o que aumenta também a morbidade e mortalidade a curto prazo (WAIKAR et al. 2009; CHAN et al. 2009; THIJSEN et al. 2015; ERICKSON et al. 2017). Os custos com hospitalização em 2011 ultrapassaram 10.6 bilhões de dólares e corresponderam até 33% do custo total dos pacientes hemodialíticos nos EUA (UNITED STATES RENAL DATA SYSTEM, 2013; COLLINS et al. 2014). Pacientes hemodialíticos são hospitalizados, em média, duas vezes por ano e mais de 37% são readmitidos num período de 30

dias após alta hospitalar (UNITED STATES RENAL DATA SYSTEM, 2016; UNITED STATES RENAL DATA SYSTEM, 2017). No Brasil, em 2016 a taxa de hospitalização mensal de pacientes em diálise foi de 5% (SESSO et al. 2017). Os custos de hospitalizações significam oportunidades perdidas de atendimento ambulatorial e contribuem substancialmente para a morbidade e a mortalidade nessa população (UNITED STATES RENAL DATA SYSTEM, 2016).

Atualmente a infecção causada por *S. aureus* mais importante é a bacteremia (MARZEC et al. 2016). Na população hemodialítica, o risco de apresentar esta infecção é 26 vezes maior do que na população geral (DALGAARD et al. 2015; SUZUKI et al. 2016). Além do mais, pacientes em tratamento hemodialítico possuem taxas de bacteremias maiores do que os que fazem diálise peritoneal (DALRYMPLE et al. 2010; DALRYMPLE et al. 2015).

### **2.1.1 Bacteremias por *S. aureus***

A presença de bactérias em circulação na corrente sanguínea de um indivíduo é a condição que determina uma bacteremia (KONEMAN et al. 2008; ARAÚJO, 2012). Geralmente, bacteremias são causadas por uma única espécie bacteriana, entretanto, também podem ocorrer de forma polimicrobiana (ARAÚJO, 2012). Por vezes, sintomas e sinais de bacteremia são apresentados de forma variável, quando a presença do patógeno na circulação sanguínea é desconhecida a bacteremia é considerada silenciosa ou subclínica (KONEMAN et al. 2008). Em compensação, quando há sintomas como mal estar, febre, calafrios, taquicardia, hiperventilação, toxicidade ou prostração, caracteriza-se a sepse, síndrome clínica em resposta a presença do patógeno no organismo do hospedeiro (KONEMAN et al. 2008; ARAÚJO, 2012). A sepse ocorre quando a taxa de remoção das bactérias pelos fagócitos é inferior à taxa de multiplicação bacteriana. São as citocinas das células do sistema imunológico e toxinas microbianas que são liberadas durante o processo inflamatório que geram os sintomas e sinais da sepse (PARRILLO, 1993).

As bactérias Gram-positivas são os agentes infecciosos mais frequentemente isolados em hemoculturas de pacientes em tratamento hemodialítico, especialmente *S. aureus* (ESMANHOTO et al. 2013; FYSARAKI et al. 2013; GAUNA et al. 2013). *S. aureus* é o principal patógeno responsável por ICS em todas as faixas etárias, tanto nosocomiais quanto comunitárias (WISPLINGHOFF et al. 2004; USLAN et al. 2007; HENDERSON et al. 2010). A incidência de bacteremia em pacientes hemodialíticos

é extremamente alta em comparação com a população geral. Na Dinamarca, um estudo coorte realizado entre os anos de 1995 e 2010, demonstrou que a incidência de bacteremia em pacientes hemodialíticos era de 13.7 por 100 pessoas / ano enquanto que na população controle (que não necessitava de hemodiálise) foi de 0.53 por 100 pessoas / ano (DALGAARD et al. 2015). Neste mesmo estudo, *S. aureus* foi o microrganismo que mais acometeu os pacientes hemodialíticos em 43.8% dos casos (DALGAARD et al. 2015). Em outro estudo Dinamarquês a incidência de bacteremia por *S. aureus* em pacientes hemodialíticos foi 46.9 vezes maior que na população geral (NIELSEN et al. 2015). Em um estudo no Japão, *S. aureus* também foi o microrganismo mais frequentemente isolado de pacientes hemodialíticos com bacteremia (40.5%) (IMAIZUMI et al. 2017). Na Inglaterra, a incidência de bacteremias por *S. aureus* em pacientes hemodialíticos variou de 0.16 por 100 diálises / ano para MRSA e 2.53 por 100 diálises / ano para infecções por MSSA (EVANS et al. 2016).

No Brasil, FRAM e colaboradores (2015), demonstraram que os microrganismos mais prevalentes isolados do sangue de pacientes hemodialíticos foram as bactérias Gram-positivas (72.8%) seguidas pelas Gram-negativas (25.9%) e fungos (1.2%). *S. aureus* foi o microrganismo mais frequente entre os Gram-positivos isolado em 32.1% dos casos, em destes, 38.5% eram resistentes à meticilina, seguido de *S. epidermidis* (13.6%) com 100% de resistência à meticilina. Os índices de incidência de bacteremias em pacientes hemodialíticos no país, variaram entre 0.55 e 7.32 por 1000 acessos venosos / dia (de ALBUQUERQUE et al. 2014). Além da incidência elevada, bacteremias por *S. aureus* estão associadas a complicações secundárias, como endocardite infecciosa, abscesso epidural, artrite séptica, osteomielite e infecção em dispositivos intravasculares (MARR et al. 1998; ENGEMANN et al. 2005; INRIG et al. 2006). Ademais, os índices de recorrência em bacteremia por *S. aureus* variaram de 14.5 a 44% (NASSAR et al. 2001).

Os pacientes sob tratamento hemodialítico são singularmente vulneráveis a infecções por MRSA devido à cirurgia para inserção do acesso vascular, punção frequente no local do acesso vascular, à probabilidade de readmissão hospitalar e alta prevalência de colonização por MRSA nessa população (CDC, 2007; PATEL et al. 2010). No Brasil, as taxas de bacteremias por MRSA na população hemodialítica foi de 31% em avaliação nos anos de 2005 a 2008 (GALES et al. 2009). Em outra avaliação, nos anos de 2010 a 2013 esta taxa subiu para 38.5% (FRAM et al. 2015).

Um relato de vigilância sanitária na Inglaterra demonstrou que o risco relativo para bacteremia por MRSA foi aproximadamente 100 vezes maior em pacientes hemodialíticos do que a população geral e oito vezes maior em que fazem uso de cateter em relação aos que possuem fístula arteriovenosa (FLUCK et al. 2009). Nos EUA também foi relatado risco 100 vezes maior em pacientes dialíticos quando comparado com população não dialítica (CDC, 2007).

A meticilina é um antimicrobiano beta-lactâmico semissintético pertencente ao grupo das penicilinas. Foi fabricada em 1959 para substituir o uso da penicilina pois, na época havia grande incidência de cepas resistentes a este fármaco. Entretanto, poucos anos depois de sua introdução na clínica estirpes resistentes à meticilina foram isoladas (JEVONS, 1961). O gene *mecA* é o responsável pela resistência à meticilina. Através deste gene há a expressão da proteína ligante de penicilina PBP 2a (PBP2a do inglês, *Penicillin-Binding Protein 2a*) (CHAMBERS, 1997). A proteína ligante de penicilina (PBP) catalisa reações de transpeptidação, necessárias para as ligações cruzadas das cadeias dos peptidoglicanos que compõem a parede celular bacteriana. Os  $\beta$ -lactâmicos ligam-se à esta proteína, bloqueando sua função vital às bactérias (GHUYSEN, 1994). Estirpes de *S. aureus* que produzem PBP2a ao invés de PBP2, não sofrem a ação dos beta-lactâmicos pois, a conformação tridimensional alterada da PBP2a impede a ligação destes antimicrobianos à parede celular bacteriana (LIM et al. 2002).

LAI e colaboradores (2011) demonstraram que pacientes hemodialíticos que são colonizados por MRSA, apresentam risco de mortalidade relacionada a infecções quase 5 vezes maior do que pacientes não portadores. De acordo com a tipagem molecular, a colonização nasal por estirpes MRSA precede a infecção clínica (LU et al. 2008). Quinze por cento de todas as infecções invasivas por MRSA ocorrem em pacientes sob tratamento dialítico (CDC, 2007). REED e colaboradores (2005) demonstraram que bacteremias por MRSA, apresentam maior mortalidade, aumento do tempo de internação hospitalar e dos custos hospitalares em comparação às bacteremias por MSSA.

Outro fator importante que tem sido associado à eficácia do tratamento de infecções estafilocócicas é a CMI de vancomicina. Estudos vêm demonstrando que pacientes sob tratamento hemodialítico infectados por estirpes MRSA sofrem grande risco de falecimento quando estas, apresentam CMI para vancomicina acima de 1  $\mu\text{g/mL}$  (SAKOULAS et al. 2004; HIDAYAT et al. 2006; MACLAYTON et al. 2006).

MOISE-BRODER e colaboradores (2004) demonstraram associação significativa entre o aumento da CMI de vancomicina e a falha no tratamento com este fármaco em estirpes MRSA, apesar destas serem suscetíveis à vancomicina. Além disso, em um estudo de coorte prospectivo, pacientes infectados com estirpes MRSA que apresentavam CMI para vancomicina de 2 µg/mL foram menos suscetíveis ao tratamento com vancomicina do que os pacientes os quais estirpes MRSA com CMI de 1 µg/mL para vancomicina, apesar dos níveis séricos preconizados de 15-20 µg/mL terem sido atingido nestes pacientes (HIDAYAT et al. 2006).

## 2.2 VANCOMICINA

### 2.2.1 História e mecanismo de ação

Um dos últimos recursos para tratamento de infecções por microrganismos resistentes à meticilina é a vancomicina (HU et al. 2016). Na população hemodialítica, como tanto *S. aureus* quanto SCoN são os responsáveis por infecções invasivas que apresentam taxas de morbidade e mortalidade elevadas, recomenda-se o uso empírico da vancomicina quando há suspeita de infecção por cocos Gram-positivos (ALLON et al. 2007; CDC, 2007).

A Vancomicina ( $C_{66}H_{75}Cl_2N_9O_{24}$ ) é um peptído glicosilado tricíclico ramificado com atividade bactericida contra a maioria das bactérias Gram-positivas e efeito bacteriostático nos enterococos (BOGER, 2001; SPAGNOLO et al. 2014).

Na década de 1950 existiam poucas opções terapêuticas disponíveis para o tratamento de infecções contra *Staphylococcus* resistentes à penicilina (LEVINE, 2006). Em 1952, Eli Lilly and Company (Indiana, EUA) isolou uma amostra de *Streptomyces orientalis* de um material enviado para a empresa e, esse microrganismo produziu uma substância que era ativa contra Gram-positivos, incluindo *Staphylococcus* resistentes à penicilina (ANDERSON et al. 1961). Após purificada e testada em animais, a vancomicina (originada da palavra "Vencer") estava pronta para ser testada em seres humanos (LEVINE, 2006). O tratamento com vancomicina em voluntários acometidos por infecções estafilocócicas graves, resultou em desfechos positivos em oito de nove pacientes testados. A única falha terapêutica ocorreu em paciente com empiema, o qual a dose adequada não pôde ser alcançada (GERACI et al. 1956).

Em 1958, Administração de Alimentos e Medicamentos dos EUA aprovou a utilização da vancomicina no país (ANDERSON et al. 1961). Nesse mesmo ano também foram aprovadas a utilização da meticilina ( $\beta$ -lactâmico pertencente ao grupo das penicilinas) e cefalotina (cefalosporina de primeira geração). As primeiras versões da vancomicina eram bastante impuras, gerando a criação do apelido "*Mississippi Mud*" devido sua coloração amarronzada e causava nos pacientes nefrotoxicidade, síndrome do homem vermelho (reação inicial relacionada à infusão do fármaco) e, raramente, ototoxicidade (BUTLER et al. 2014). Devido à sua toxicidade, a vancomicina, passou a ser reservada a pacientes com alergias graves a  $\beta$ -lactâmicos ou pacientes com infecções geradas por microrganismos resistentes a algum agente recente (LEVINE, 2006). Portanto, somente no início da década de 1980 a vancomicina voltou a ser altamente requerida para o uso clínico (KIRST et al. 1998). Entretanto, o uso disseminado da vancomicina teve impacto na seleção de Enterococos resistentes a vancomicina (VRE do inglês, *Vancomycin-Resistant Enterococci*) (UTTLEY et al. 1988; KIM et al. 2017). A resistência à vancomicina ocorre devido alteração do sítio alvo de ligação pela ação dos genes *vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE* e *vanG* (MURRAY, 2000; MCKESSAR et al. 2000; DEPARDIEU et al. 2003). A primeira estirpe Norte Americana de *S. aureus* resistente à vancomicina (VRSA do inglês, *Vancomycin-Resistant S. aureus*) foi isolada de paciente com histórico de infecção por MRSA (QUIRK, 2002). Postulou-se que o gene *vanA* foi transferido para *S. aureus* por conjugação através do plasmídeo pSK41-*like* a partir de um VRE e, em seguida, movido por transposição do Tn1546 para o plasmídeo pSK41-*like* de *S. aureus* (WEIGEL et al. 2003; ZHU et al. 2008).

O peptidoglicano é composto de cadeias de glicano constituídas por amino alternados *N*-acetilglucosamina (NAG) e ácido *N*-acetilmurâmico (NAM). Os pentapeptídeos da haste (L-Ala-D-iso-Gln-LLys-D-Ala-D-Ala) estão ligados ao grupo carboxila de cada ácido *N*-acetilmurâmico e pontes interpeptídicas (pentaglicinas, formadas de resíduos de glicina) conectam o componente de lisina de uma haste peptídica a penúltima D-alanina de uma haste peptídica vizinha (Figura 1) (TOMASZ, 2006). Portanto, a vancomicina se liga fortemente à subunidade C-terminal L-Lys-D-ala-D-ala do precursor Lípido II da parede celular através de cinco ligações de hidrogênio, inibindo a transglicosilação e / ou transpeptidação (KAHNE et al. 2005; ARHIN et al. 2012), interferindo assim, na biossíntese da parede celular bacteriana (Figura 2). Por consequente à esta ligação também há a ativação de

autolisinas que auxiliam na destruição da parede celular o que contribui com a lise da célula bacteriana.

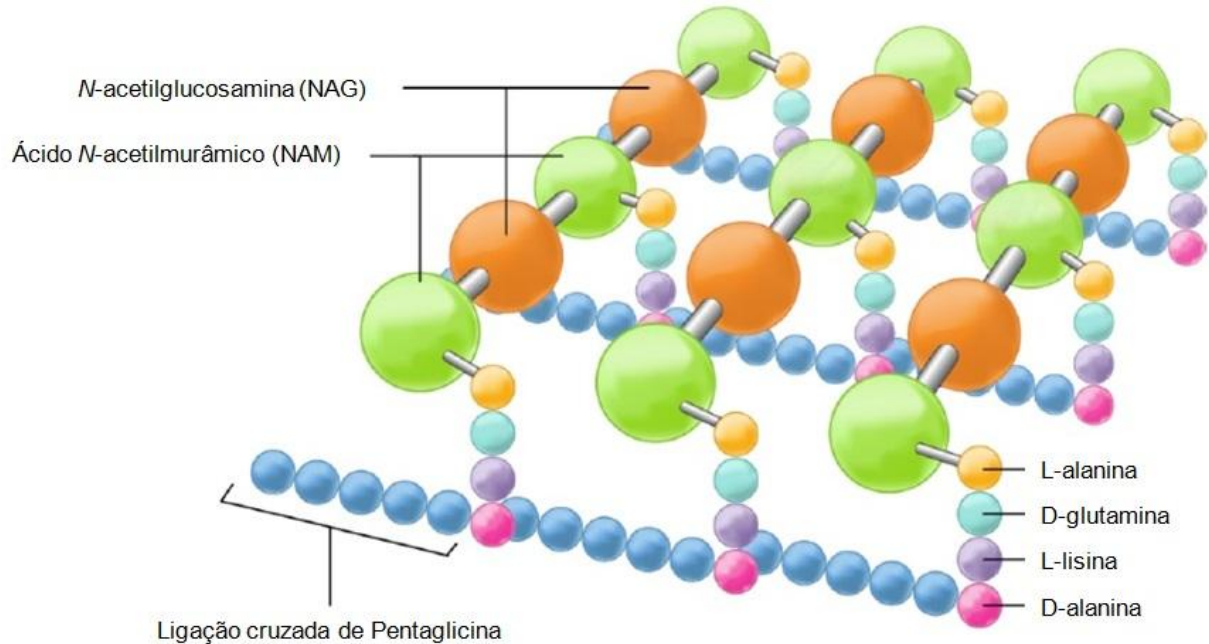


Figura 1 - Esquema da estrutura do peptidoglicano. Os aminos alternados *N*-acetilglucosamina e ácido *N*-acetilmurâmico compõem a cadeia de glicano e estas, são ligadas por pentaglicinas. Em uma extremidade a pentaglicina está conectada a carboxila do pentapeptídeo enquanto a outra extremidade está ligando o próximo pentapeptídeo através da ligação com a penúltima D-alanina deste. Fonte: BRUSLIND, 2017.

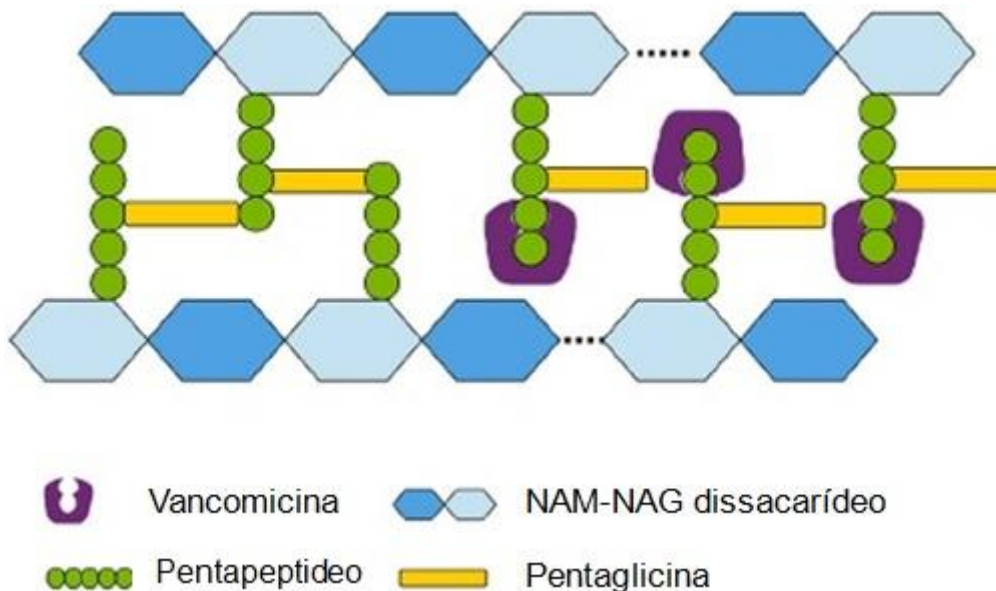


Figura 2 - Esquema representativo da ligação da vancomicina ao pentapeptídeo do peptidoglicano na parede celular bacteriana. Hexâmeros em azul escuro e azul claro representam a cadeia glicana. Retângulo amarelo representa a pentaglicina. Bolas verdes representam os pentapeptídeos e o símbolo da vancomicina está em roxo. Fonte: HU et al. (2016).

O locus *van* codifica os genes necessários para a alteração do peptidoglicano presente na parede celular bacteriana. Há a produção de uma alteração no precursor do dipeptídeo final, D-alanil-D-alanina, o qual é substituído por um D-alanil-D-lactato (*vanA*, *vanB* e *vanD*) ou por D-alanil-D-serina (*vanC*, *vanE* e *vanG*) (QURESHI et al. 2014). A vancomicina liga-se com baixa afinidade aos peptídeos terminais D-alanil-D-lactato / D-alanil-D-serina, tornando assim as bactérias resistentes ao fármaco apresentando CMI altas para a vancomicina (LEVINE, 2006).

Até 2015, apenas 14 estirpes VRSA haviam sido isoladas nos EUA, sendo a resistência à vancomicina em *S. aureus* ainda considerada rara (ALBRECHT et al. 2014; WALTERS et al. 2015). Entretanto, outros fenótipos, VISA e hVISA, vêm tornando-se cada vez mais comum, desde o final dos anos 90 (HIRAMATSU et al. 1997). Devido a técnica que caracteriza as estirpes hVISA ser muito custosa e trabalhosa para ser utilizada na rotina laboratorial e, ter havido variações dos métodos utilizados para relatar o isolamento destas estirpes ao longo dos anos, a prevalência de hVISA ainda é variada (HOWDEN et al. 2010). HIRAMATSU e colaboradores (1997) detectaram a presença de 20% de estirpes hVISA entre isolados MRSA no Japão. KOH e colaboradores (2016) avaliaram na Coreia do Sul, amostras *S. aureus* de bacteremias e 34.5% eram hVISA. Na Austrália em 2005, a prevalência de hVISA foi de 49.6% em isolados MRSA (HORNE et al. 2009). A prevalência de hVISA também está relacionada com a pressão seletiva exercida pelos antimicrobianos, variando de centro para centro (LIU et al. 2003).

### **2.2.2 Suscetibilidade reduzida à vancomicina**

Antes de isolarem o primeiro VRSA no mundo em 2002, as estirpes VISA já circulavam entre os hospitais (HIRAMATSU et al. 1997; SIEVERT et al. 2008). Em 1997 foi publicado o isolamento das primeiras estirpes VISA (estirpe Mu50, ATCC 700699) e hetero-VISA (hVISA, estirpe Mu3, ATCC 700698) (CDC, 1997; HIRAMATSU et al. 1997). A estirpe Mu50 foi isolada de um indivíduo de quatro meses de idade com infecção em ferida cirúrgica, apresentou CMI de 8 µg/mL para vancomicina e o tratamento com vancomicina não foi eficaz (HIRAMATSU et al. 1997). Em 1996, a estirpe Mu3 foi isolada de um paciente de 64 anos com pneumonia por MRSA com falha de terapia com vancomicina, a qual apesar de apresentar CMI de 4 µg/mL para vancomicina, possuía subpopulação de 1 em cada  $10^5$  a  $10^6$  células que apresentaram CMI de 8 µg/mL para vancomicina



(HIRAMATSU et al. 1997). Pesquisas subsequentes demonstraram que a estirpe Mu3 possuía CMI global para vancomicina de 2 µg/mL em teste de microdiluição em caldo e subpopulação com CMI de 4 µg/mL em experimentos de análise populacional em vancomicina sendo então, considerada heteroressistente à vancomicina (CUI et al. 2003; CUI et al. 2005; CLSI, 2017).

Os mecanismos responsáveis pelos fenótipos de VISA e hVISA vêm sendo estudados ao longo dos anos. Hoje, entende-se que as estirpes VISA surgiram através de mutações sequenciais de estirpes VSSA (VSSA do inglês, *Vancomycin-Susceptible S. aureus*) e a estirpe hVISA aparece no contexto de um fenótipo intermediário entre VSSA e VISA (HOWDEN et al. 2010). Alterações na composição e volume da parede celular das contribuem para a suscetibilidade reduzida à vancomicina nas estirpes VISA e hVISA. Estas amostras apresentam de 30 a 40 camadas de peptidoglicano aproximadamente, enquanto que amostras VSSA possuem em média 20 (HIRAMATSU et al. 2001). Com isso, um maior número de moléculas de vancomicina é retida nas camadas superficiais da parede celular e o acúmulo das mesmas acabam por impedir a difusão de outras moléculas para o sítio de formação da camada de peptidoglicano que se encontra próximo à membrana plasmática, no septo de divisão celular (HIRAMATSU et al. 1997; ROTUN et al. 1999; MARCHESE et al. 2000; HOWDEN et al. 2006). Resíduos de D-alanil-D-alalina livres em grandes quantidades e diminuição do número de ligações cruzadas do peptidoglicano são encontrados na parede celular desses fenótipos, o que também auxilia na ligação da vancomicina a sítios falsos de ligação, protegendo a célula bacteriana da lise (Figura 3) (PFELTZ et al. 2000; SIERADZKI et al. 2003; HOWDEN et al. 2014). Além disso, essas amostras apresentam atividade de enzimas autolíticas reduzida, as quais participam da renovação da parede celular, degradando as camadas superiores, contribuindo para o espessamento da parede celular (HIRAMATSU et al. 2001).

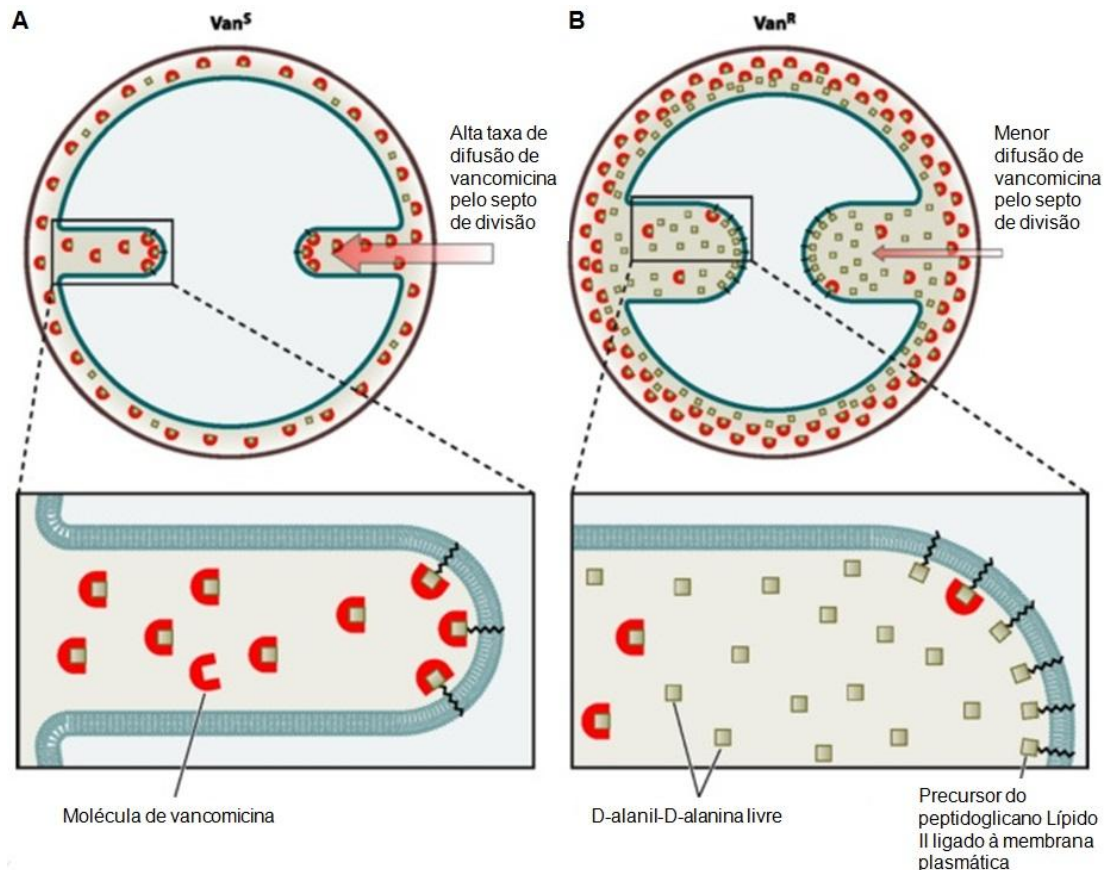


Figura 3 - Ilustração representativa do espessamento de parede celular em amostra VISA. **A)** representa amostra VSSA, com alta difusão da vancomicina na parede celular. **B)** representa amostra VISA, com espessamento de parede celular e resíduos de D-alanil-D-alanina livres, os quais a vancomicina se liga na parede celular longe da membrana plasmática, diminuindo a difusão para o sítio alvo no septo de divisão. Fonte: PEREIRA et al. (2007).

### 2.2.3 Fatores de virulência

O sistema *agr* é um dos reguladores globais de genes que controlam a expressão dos genes de virulência em *S. aureus*. O locus *agr* codifica o RNA II, componente do sistema de transcrição Agr e RNA III regulatório (NOVICK et al. 1993; MORFELDT et al. 1995). DUNMAN e colaboradores (2001) demonstraram que o sistema de *quorum-sensing* produzido por *agr* regula positivamente 104 genes e negativamente 34 genes. Agr controla a ascensão de *S. aureus* de colonizador a invasor, regulando positivamente a expressão e secreção de fatores de virulência e reduzindo a expressão de proteínas de superfície envolvidas na adesão e agregação celular (YARWOOD et al. 2003; NOVICK et al. 2008; BRONNER et al. 2004; BATZILLA et al. 2006; SINGH et al. 2014). A biossíntese de polissacarídeo capsular e toxinas (isto é, lipases, protease, nucleases, hialuronato lipase, fenol solúvel modulinas, hemolisinas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ , leucocidinas, toxinas da síndrome do choque

tóxico e toxinas esfoliantes) são reguladas positivamente por *agr* enquanto que as proteínas de ligação, proteína A e fibronectina são reprimidas (DUNMAN et al. 2001; van WAMEL et al. 2002; YARWOOD et al. 2003). Cerca de 15 a 60% dos isolados nosocomiais de infecções por *S. aureus* albergam o gene *agr* desligado e estão associados a bacteremias persistentes e maus desfechos clínicos (SMYTH et al. 2012; PARK et al. 2013; PAULANDER et al. 2013). Os fatores de virulência induzidos por Agr estão envolvidos principalmente com a invasão ao hospedeiro, gerando para a bactéria uma carga metabólica grande. Como pacientes hospitalizados são, em geral, imunocomprometidos ou sofreram cirurgia invasiva, a expressão de fatores invasivos como toxinas, se faz menos necessária para *S. aureus* estabelecer uma infecção e uma troca entre a carga metabólica e a expressão de fatores de virulência favorece a seleção de estirpes gene *agr* desligado nos hospitais.

O recente estudo de THOMPSON e BROWN (2017) demonstrou forte associação entre a presença do operon *agr* e genes de virulência em cepas clínicas de *S. aureus*. O estudo também demonstrou que as estirpes que possuíam o gene *agr* funcional foram mais patogênicas do que as que este gene estava disfuncional, corroborando com a correlação do gene *agr* e a função de genes de virulência como determinantes da patogenicidade em *S. aureus* (THOMPSON et al. 2017).

Podemos dividir os fatores de virulência de *S. aureus* em três grupos: i) fatores de virulência associados com a invasão e inflamação, que incluem a colonização, síntese de moléculas extracelulares que auxiliam na adesão e capacidade de evadir o sistema imunológico do hospedeiro; ii) fatores de virulência secretados, os quais são responsáveis por causar injúria tecidual no hospedeiro e promover a disseminação bacteriana; e iii) formação de biofilme, essencial em algumas infecções e responsáveis, em parte, pela tolerância antimicrobiana em determinadas infecções (ZHU, Y, 2010; AL-MEBAIRIK et al. 2016). *S. aureus* possui uma gama de fatores associados à célula como os MSCRAMMs (do inglês, *Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules*) que se ligam à fibronectina e coagulam o plasma do hospedeiro como (FnbpA e FnbpB) ou a proteína SpA a qual se liga a imunoglobulina G (IgG) e impede a opsonização e fagocitose da bactéria e, os secretados como as toxinas citológicas como as hemolisinas  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  que induzem a lise celular de monócitos, leucócitos e eritrócitos, além das exoenzimas como lipases, nucleases e proteases que atuam liberando

nutrientes e protegendo as células bacterianas do sistema imune do hospedeiro (FOSTER, 2005; LIN et al. 2010; COSTA et al. 2013).

Biofilmes bacterianos são um microambiente composto por uma ou mais espécies, as quais, as células estão unidas umas as outras ou a superfícies e envoltas por matrix extracelular, esta, constituída por proteínas, carboidratos e/ou DNA extracelular (FLEMMING et al. 2010; AL-MEBAIRIK et al. 2016). As principais vantagens da formação de biofilme são a evasão do sistema imunológico do hospedeiro e a tolerância os antimicrobianos (YARETS et al. 2013). *S. aureus* é um dos patógenos que mais comumente produz biofilmes relacionados à dispositivos médicos (MA et al. 2012). *S. aureus* possui capacidade inerente de formação de biofilme, podendo formar biofilmes tanto em superfícies bióticas quanto abióticas (AL-MEBAIRIK et al. 2016). A estrutura dos biofilmes pode variar, desde uma monocamada de células individuais dispersas até uma multicama de matrix extracelular espessa com canais que geram fluxo de gases e líquidos, além da dispersão de nutrientes e resíduos dos componentes da matrix. A composição química do biofilme é extremamente dinâmica, havendo gradientes de solutos e troca de nutrientes (MIRANI et al. 2013).

Como já foi explorado antes, *S. aureus* coloniza as narinas, pele e mucosa de humanos, sendo este fator importante para a formação de biofilme, principalmente, em cateteres (WERTHEIM et al. 2005; van BELKUM et al. 2009; ABAD et al. 2013; AL-MEBAIRIK et al. 2016). Infecções da corrente sanguínea relacionadas a cateter ocorrem devido a formação de biofilmes no interior ou exterior de cateteres internos. A adesão de células bacterianas ao cateter venoso central é um pré-requisito para a formação do biofilme. A formação de biofilme na parte exterior do cateter venoso central nas duas primeiras semanas após a implantação do cateter é um fator importante para o desenvolvimento de infecção da corrente sanguínea relacionada a cateter (BETJES, 2011). Posteriormente, a contaminação bacteriana no interior do cateter é comum. Após semanas *in situ*, praticamente todos os cateteres venosos centrais têm biofilme intraluminal (RAAD et al. 1993). Entretanto, nem todos os pacientes que possuem biofilmes em seus cateteres desenvolverão infecção da corrente sanguínea relacionada a cateter (BETJES, 2011).

#### 2.2.4 Emergência e importância clínica de hVISA e VISA

No início da década de 1990 nos EUA e Europa surgiram os primeiros isolados clínicos de *S. aureus* com suscetibilidade reduzida à teicoplanina, porém, essas estirpes ainda mantiveram a sensibilidade à vancomicina (KAATZ et al. 1990; MANQUAT et al. 1992; MAINARDI et al. 1995). Somente em 1997 que as primeiras estirpes com suscetibilidade reduzida à vancomicina foram reportadas no mundo (HIRAMATSU et al. 1997). A principal dificuldade em se estabelecer a importância clínica da estirpe hVISA ocorre devido a complexidade na detecção na rotina laboratorial (HOWDEN et al. 2014). O fenótipo hVISA não é detectado em testes convencionais quantitativos, pois a subpopulação com suscetibilidade reduzida à vancomicina presente em hVISA possui densidade de inóculo reduzida (1 em  $10^6$  células), não sendo possível diferenciar VSSA de hVISA (HIRAMATSU et al. 1998) e consequentemente sua prevalência e implicância na clínica ainda não foram completamente determinados (HOWDEN et al. 2010; CHANG et al. 2015). A identificação da heterosuscetibilidade à vancomicina em *S. aureus* possui importância além da previsão da eficácia clínica da terapia, mas também para a detecção de estirpes emergentes, colaborando para o monitoramento epidemiológico das mesmas (GOMES et al. 2015). Dados sugerem que hVISA seja o precursor do VISA. No entanto, dados da ocorrência e prevalência de VISA ainda são raros. Estudos retrospectivos são complicados de serem abordados em hVISA já que este retoma a sua forma sensível à vancomicina quando a pressão seletiva pela vancomicina é cessada (GOMES et al. 2015).

Estirpes VISA foram testadas por métodos moleculares e foi demonstrado que o fenótipo não se trata de um clone específico em emergência (SMITH et al. 1999; FRIDKIN et al. 2003; HOWE et al. 2004). Entretanto, estirpes hVISA e VISA resistentes também à metilina que são classificadas nos Complexos Clonais (CC) 5 ou 8, parecem ser mais bem adaptadas ao ambiente hospitalar (HOWDEN et al. 2014). Majoritariamente as estirpes hVISA e VISA são isoladas de MRSA de infecções nosocomiais, provavelmente porque a pressão seletiva causada pela vancomicina seja maior no ambiente hospitalar (HOWDEN et al. 2014). Porém, estirpes VISA sensíveis a metilina foram relatadas, assim como a partir de cepas MRSA comunitárias (PILLAI et al. 2009; GARDETE et al. 2012).

A maioria dos isolados hVISA, particularmente VISA, parece serem fruto de uma evolução *in vivo* durante tratamento terapêutico de estirpes VSSA. Diversos

estudos demonstraram que a emergência da resistência da vancomicina vem ocorrendo de forma gradual ao longo dos anos (HOWDEN et al. 2006; MWANGI et al. 2007; TENOVER et al. 2009; GAO et al. 2010). A exposição *in vivo* representa o maior fator de risco para a evolução de estirpes VSSA em hVISA e VISA e, outros antimicrobianos que não os glicopeptídeos, como imipenem e rifampicina, também podem induzir este fenótipo em *S. aureus* (KATAYAMA et al. 2009; MATSUO et al. 2011; WATANABE et al. 2011).

*MIC creep* é a expressão utilizada para definir as estirpes de *S. aureus* com CMI entre 1.5 e 2 µg/mL para vancomicina (DHAND et al. 2012; RUIZ et al. 2016). Apesar destas estirpes serem classificadas como sensíveis à vancomicina, entretanto, vários estudos vêm mostrando uma forte correlação com falhas terapêuticas enquanto outros não demonstraram nenhuma relação, sendo então o *MIC creep* um grande questionamento no meio científico. Estudos identificaram falha terapêuticas em infecções da corrente sanguínea e diminuição da eficiência da vancomicina em estirpes MRSA com CMI = 2 µg/mL (HIDAYAT et al. 2006; MOISE et al. 2007; SORIANO et al. 2008; LODISE et al. 2008). Outros autores também sugerem que a identificação de estirpes MRSA com CMI = 2 µg/mL para vancomicina como preditivo de falha no tratamento terapêutico com este fármaco, exigindo antibioticoterapia alternativa nestes casos (RYBAK et al. 2009; YOON et al. 2010; MATSUMOTO et al. 2013).

TAKESUE e colaboradores (2011) analisaram 128 isolados MRSA de bacteremias e compararam com 631 MRSA isolados de outros tipos de infecção. Trinta e dois por cento dos isolados de bacteremias apresentaram CMI = 2 µg/mL para vancomicina enquanto apenas 9% dos isolados de outras infecções apresentaram a mesma CMI para vancomicina. O estudo também demonstrou uma baixa taxa de sucesso terapêutico com vancomicina e falha terapêutica maior nos isolados com CMI alta (2 µg/mL) para este fármaco de bacteremias do que os isolados com a mesma CMI para vancomicina de outras infecções (TAKESUE et al. 2011). Porém, um recente estudo com estirpes MRSA não demonstrou haver *MIC creep* em um hospital Português (DIAZ et al. 2017). Estudos coorte de bacteremias por *S. aureus* evidenciaram que estirpes com CMI alta na faixa de suscetibilidade para vancomicina respondem ineficientes ao tratamento com glicopeptídeos (HOLLAND et al. 2011; FALCÓN et al. 2016). Vêm sendo demonstrado também, que

quanto maior a CMI de vancomicina das estirpes de *S. aureus*, maiores as taxas de identificação de estirpes hVISA (MUSTA et al. 2009).

Estudos sobre *MIC creep* são predominantemente com isolados MRSA (LODISE et al. 2008; TAKESUE et al. 2011; HOLLAND et al. 2011; DIAZ et al. 2017). Além dos fatores relacionados com a vancomicina e aos pacientes como as comorbidades, outros fatores como espécime-específicos também devem ser considerados. A disfunção do gene *agr* também pode impactar o desfecho clínico. Dois estudos com bacteremia por MRSA demonstraram que a única variável preditiva para a disfunção do gene *agr* foi a exposição prévia a antimicrobianos (BUTTERFIELD et al. 2011; HARIGAYA et al. 2011). Um estudo, relacionou o fenótipo hVISA com a disfunção do gene *agr* (HARIGAYA et al. 2011) enquanto que o outro não (BUTTERFIELD et al. 2011). Estratégias fenotípicas como a sobrevivência intracelular através de variantes de colônias pequenas (SCV do inglês, *Small Colony Variant*) também são relacionadas a infecções persistentes em MRSA e muita vezes rotuladas como falha no tratamento terapêutico (THWAITES et al. 2011; GOULD et al. 2012). Outro fator que pode prolongar o tratamento de infecções por *S. aureus* é a capacidade de formação de biofilme que auxilia na evasão da resposta imune por estas amostras (ARCHER et al. 2011). Estirpes MRSA associadas com bacteremia persistentes são resistentes aos derivados de neutrófilos, os peptídeos catiônicos antimicrobianos (HDP do inglês, *Host Defense Peptides*) (THWAITES et al. 2011). Estudos demonstraram que resistência aos HDPs derivados de plaqueta e resistência à vancomicina pode ser induzida pela vancomicina *in vitro* (SAKOULAS et al. 2005; DHAND et al. 2012), o que pode explicar o aumento da mortalidade de pacientes com bacteremia por *S. aureus* que apresenta CMI deste fármaco alta na faixa de suscetibilidade. Portanto, o *MIC creep* de vancomicina ainda é um grande questionamento e mais estudos da CMI associada a fatores relacionados aos pacientes e as estirpes são necessários para maiores esclarecimentos desse fenômeno.

### **2.2.5 Tolerância e persistência**

Falha no tratamento terapêutico tipicamente é atribuída à resistência microbiana. Entretanto, quando o microrganismo é suscetível ao antimicrobiano e há falha no tratamento pode haver outros mecanismos envolvidos (HANDWERGER et al. 1985). Dormência ou crescimento lento são exemplo destes mecanismos que

auxiliam as bactérias a sobreviverem a exposição aos antimicrobianos bactericidas, os quais, exigem células viáveis metabolicamente para matá-las. Essa capacidade é definida como tolerância (LEWIS, 2007).

Resistência é a capacidade hereditária (mutações) dos microrganismos de crescerem em altas concentrações na presença de antimicrobiano, independente da duração do tratamento e é quantificado através da CMI. A CMI é determinada pela exposição bacteriana a concentrações crescentes do antimicrobiano em meio padrão entre 16 e 24 horas (WIEGAND et al. 2008). Estirpes podem ser classificadas fenotipicamente como suscetíveis ou resistentes de acordo com o ponto de corte clínico (CHENG et al. 2016). O termo tolerância é utilizado para caracterizar a habilidade, seja ela, hereditária ou não, dos microrganismos de sobreviverem de forma transitória, à exposição à altas concentrações de um fármaco sem alteração na CMI, geralmente pelo retardo de algum processo bacteriano essencial como o crescimento, por exemplo (BRAUNER et al. 2016). Em contrapartida, a persistência é a tendência de uma subpopulação bacteriana clonal de sobreviver à exposição a altas concentrações de um antimicrobiano (D’COSTA et al. 2006). A persistência pode ser observada quando a maior parte da população bacteriana morre velozmente e uma subpopulação consegue persistir por período de tempo prolongado, apesar da população ser clonal (Figura 4) (BRAUNER et al. 2016).

Estudos recentes têm demonstrado que a tolerância e persistência evoluem de forma rápida sob exposição intermitente a antimicrobiano (FRIDMAN et al. 2014; van den BERGH et al. 2016). Existem dois tipos de tolerância: por crescimento lento e por *lag*. A tolerância por crescimento ocorre na fase estacionária do crescimento bacteriano. Esta tolerância pode ser herdada, quando a estirpe apresenta de forma inerente a habilidade de crescimento lento ou não herdada, quando o crescimento lento ocorre porque as condições do meio não são muito favoráveis (KITANO; TOMASZ, 1979), localização da célula bacteriana no biofilme ou pela exposição a inibidores (BERNIER et al. 2013). Além da fase estacionária do crescimento, na fase *lag* as bactérias também não crescem, sendo uma fase importante para haver proteção anti antimicrobianos. A fase *lag* é definida como o tempo necessário para as células bacterianas "presas" no crescimento (como em condições de falta de nutrientes) para retomar o crescimento de forma exponencial quando há o ajuste a um ambiente favorável para o crescimento (como quando as células são



reinoculadas em meio fresco, rico em nutrientes) (BRAUNER et al. 2016). A tolerância por *lag* é um fenótipo transitório não sendo sustentado quando a cultura tem tempo suficiente para se ajustar completamente as novas condições. Esta tolerância ocorre quando o tempo do tratamento terapêutico é menor do que a duração da fase *lag* da bactéria (BARANYI, 2002; BALABAN et al. 2004).

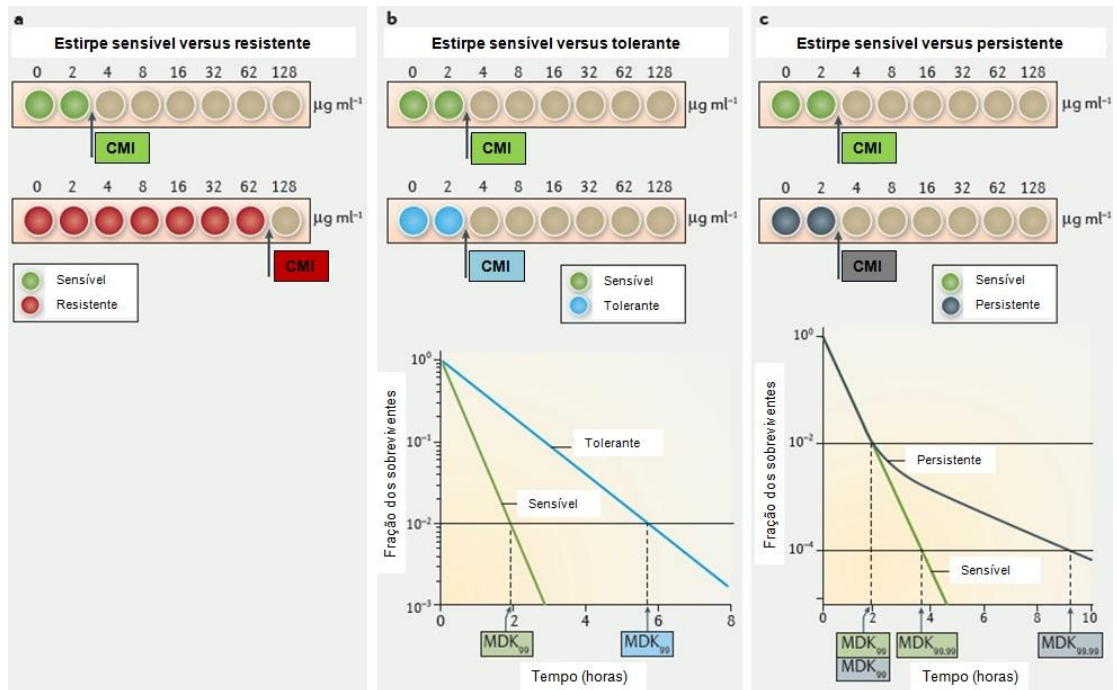


Figura 4 - Esquema representativo da caracterização de estirpes resistentes, tolerantes e persistentes. **a)** A CMI de estirpes resistentes é substancialmente maiores do que de estirpes suscetíveis ao antimicrobiano. Os poços coloridos indicam crescimento bacteriano e os em marrom indicam inibição do crescimento. **b)** A CMI da estirpe suscetível e tolerante é a mesma, porém, o MDK<sub>99</sub> (capaz de matar 99% da população bacteriana) destas duas estirpes são diferentes, sendo o MDK<sub>99</sub> da estirpe tolerante mais longo do que o da estirpe susceptível, ou seja, foi necessário um tempo maior de exposição ao antimicrobiano para se chegar ao MDK<sub>99</sub> na estirpe tolerante. **c)** A CMI da estirpe suscetível e persistente é a mesma, entretanto, o MDK<sub>99</sub> é um pouco mais longo que o da amostra suscetível e o MDK<sub>99,99</sub> (capaz de matar 99.99% da população bacteriana) na amostra persistente é extremamente longo. Fonte: BRAUNER et al. (2016).

O método quantitativo da tolerância ou persistência é o tempo mínimo de duração da morte (MDK do inglês, *Minimum Duration of Killing*) que geralmente é obtido através de curva tempo-morte (BRAUNER et al. 2016; LI et al. 2017). O MDK tem como premissa, determinar se a estirpe é tolerante ou persistente (FRIDMAN et al. 2014). A premissa do MDK é o tempo de tratamento com antimicrobiano necessário para matar uma porção definida da população bacteriana em uma concentração que ultrapasse a CMI da amostra (BRAUNER et al. 2016; LI et al. 2017). Assim como, a CMI é utilizada para avaliar o grau de suscetibilidade de estirpes bacterianas, o MDK pode ser utilizado para comparar o nível de tolerância

aos antimicrobianos entre as amostras. Um método que mede tanto a CMI quanto o MDK permitiria a distinção clara entre resistência (aumento da CMI) e tolerância (aumento do MDK) (FRIDMAN et al. 2014). A mensuração da tolerância bacteriana através do MDK é recente e anteriormente, utilizava-se a mínima concentração bactericida (MBC do inglês, *Minimum Bactericidal Concentration*) sobre a CMI da estirpe e se essa diferença fosse  $\geq 32$ , considerava-se a tolerância (MAY et al. 1998). No estudo de CÁZARES-DOMÍNGUEZ e colaboradores (2015), 100 isolados clínicos de MRSA de infecções nosocomiais foram avaliados e 12% apresentaram tolerância para vancomicina e espessamento da parede celular sendo que destes, 41.66% apresentaram estirpes hVISA como subpopulação. Em outro estudo, ROSE e colaboradores (2012), analisaram 115 isolados MRSA de pacientes tratados com vancomicina que apresentaram infecção da corrente sanguínea no período de cinco anos. A tolerância foi avaliada através da taxa MBC/CMI e 6% dos isolados foram considerados tolerantes à vancomicina. Mais recentemente SINGH e colaboradores (2017) utilizaram o MDK para avaliar a tolerância à vancomicina de uma amostra isolada antes da introdução da vancomicina na clínica, a estirpe *S. aureus* ATCC 6538P (FDA209P) sensível à meticilina passou por pressão seletiva em placa de BHI agar contendo 1.5  $\mu\text{g/mL}$  de vancomicina e deste experimento duas estirpes foram isoladas. As amostras derivadas apresentaram tolerância por crescimento lento sem alteração da CMI e foram caracterizadas com hVISA.

O fenótipo SCV em *S. aureus* é constantemente associado a recidivas ou infecções persistentes (PROCTOR et al. 1995; PROCTOR et al. 2006; SENDI et al. 2009; GAO et al. 2010; TANDE et al. 2014) e foram relatados em diversas situações clínicas como, osteomielite crônica, abscessos cutâneos e cerebrais, endocardite, infecções relacionadas à prótese e bacteremia (PROCTOR et al. 2006; GAO et al. 2010; TUCHSCHERR et al. 2016). As principais características dos SCVs são a taxa de crescimento reduzida, tamanho diminuído das colônias (um décimo menor do que colônia do fenótipo normal), ausência de pigmentação, hemólise reduzida e auxotrofia (dependência estrita de nutriente) para timidina, hemina e menadiona (McNAMARA et al. 2000; PROCTOR et al. 2006). Estudos vêm demonstrando que estas características contribuem para a persistência e falha terapêutica, através da diminuição da suscetibilidade antimicrobiana (BAUMERT et al. 2002), melhora na formação de biofilmes (SINGH et al. 2009; TANDE et al. 2014) e expressão reduzida de toxinas citolíticas (TUCHSCHERR et al. 2010; TUCHSCHERR et al. 2011) geram

internalização das células bacterianas nas do hospedeiro contribuindo com a persistência destas (SENDI et al. 2009; TUCHSCHERR et al. 2010). O maior obstáculo para o sucesso terapêutico de infecções por esse fenótipo é o diagnóstico pois, devido o tamanho das colônias e taxa de crescimento lento, as SCVs são por vezes ignoradas na placa ou estas, são descartadas antes mesmo do diagnóstico (PROCTOR et al. 1995; SENDI et al. 2009; MELTER et al. 2010; GLASER et al. 2014). Outro fator é a má interpretação das SCVs de *S. aureus* que por vezes são confundidos com SCoN devido a ausência de pigmentação, diminuição da produção de coagulase e atividade hemolítica reduzida (SENDI et al. 2009).

Em estudo recente LENHARD e colaboradores (2015) demonstraram que altas concentrações de vancomicina podem selecionar o fenótipo SCV quando houve coexistência entre células normais MRSA e SCVs. Postulou-se que células normais de *S. aureus* e SCVs coexistem em equilíbrio e infecções persistentes causadas por SCVs são atribuídas à vantagem de sobrevivência pré-existente nas células SCVs frente as normais durante exposição à vancomicina (CUI et al. 2012; EDWARDS, 2012). No trabalho LENHARD e colaboradores (2015), não houve equilíbrio, pois, a vancomicina matou mais rapidamente as células de *S. aureus* normais, permitindo assim, o crescimento lento das SCVs e expansão da população resistente. Portanto, o aumento de exposição à vancomicina contra população *S. aureus* que não seja totalmente erradicada pode selecionar a mudança de fenótipo mais adepto a evasão antimicrobiana e persistente intracelularmente no hospedeiro (von EIFF et al. 2006; LOFFLER et al. 2014). Além disso, o fenótipo SCV pode ser revertido para normal, perpetuando assim o ciclo de falhas terapêuticas e recidivas (MASSEY et al. 2001; TUCHSCHERR et al. 2011). O estudo de LIN e colaboradores (2016), foi relatado pela primeira vez o isolamento de estirpes VISA com o fenótipo SCV. Cinco estirpes VISA foram isoladas do sangue de um paciente com artrite séptica, durante tratamento com vancomicina e posteriormente daptomicina. Das cinco estirpes VISA, uma foi considerada SCV e apresentou 13 alterações genéticas, incluindo a deleção do cassete cromossômico estafilocócico *mec* III (SCC*mec* do inglês, *Staphylococcal Cassete Chromosome mec*) e mutação no gene *fabF*, provável responsável para o crescimento lento nesta estirpe.

De modo geral, a vancomicina é utilizada de forma empírica na população hemodialítica, e esta, vêm sendo relacionada a falhas no tratamento de infecções da corrente sanguínea por *S. aureus* com CMIs de 1.5 e 2 µg/mL. Ainda há um debate

no mundo científico sobre a influência da virulência das estirpes que apresentam CMI de 1.5 µg/mL com as falhas no tratamento terapêutico com vancomicina. Portanto, investigamos, em estirpes de *S. aureus* isoladas de variadas concentrações de vancomicina, alterações na patogenicidade destas estirpes através da caracterização de atributos de virulência, bem como, por modelo de infecção *in vivo*.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar amostras de *S. aureus* cultivadas em elevadas concentrações de vancomicina quanto à suscetibilidade e atributos de virulência.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar as amostras de *S. aureus* quanto à suscetibilidade à meticilina e à vancomicina.
- Avaliar se a pressão seletiva com vancomicina altera a concentração mínima inibitória deste antimicrobiano para *S. aureus*.
- Avaliar se a pressão seletiva com vancomicina altera a atividade autolítica; o crescimento microbiano; a produção de biofilme e de cinco enzimas hidrolíticas; a viabilidade metabólica; a adesão ao fibrinogênio; a função do gene *agr* e a virulência de *S. aureus* em modelo de infecção em invertebrado.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 TIPO DE ESTUDO

Trata-se de um estudo observacional descritivo sobre o perfil de suscetibilidade a vancomicina de amostras de *S. aureus* isoladas de pacientes em tratamento hemodialítico de Unidades de Assistência de Alta Complexidade em Nefrologia (UAACN) da Grande Vitória-ES que apresentaram quadro de bacteremia. As amostras foram obtidas durante o desenvolvimento do projeto intitulado "Bacteremia em pacientes submetidos à hemodiálise na grande Vitória, ES: aspectos microbiológicos e terapêuticos" coordenado pela Prof<sup>a</sup> Kênia Valeria dos Santos, aprovado no edital Universal 012/2011 da Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES) e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) em 01 de novembro de 2011, número 219/11. As amostras (n=41) foram coletadas no período de novembro de 2012 a novembro de 2014 e fazem parte de culturas do Laboratório de Biologia de Microrganismos e Antimicrobianos (BioMA-Lab) da UFES.

### 4.2 AMOSTRAS BACTERIANAS

Foram incluídas neste estudo todas as 41 amostras clínicas de *S. aureus* citadas no item anterior mais as seguintes amostras padrão: *S. epidermidis* ATCC 12228, *S. aureus* RN4220 (produtora de  $\beta$ -hemolisina), *S. aureus* ATCC 29213 e 25923 sensíveis à metilina (MSSA), *S. aureus* ATCC 33591 resistente à metilina (MRSA), *S. aureus* ATCC 700699 com resistência intermediária à vancomicina (amostra Mu50) e *S. aureus* ATCC 700698 heterorresistente à vancomicina (amostra Mu3).

### 4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os experimentos foram selecionados de forma a obtenção de resultados referentes à caracterização das amostras sob 3 aspectos: i) Caracterização da amostra quanto a clonalidade e perfil de suscetibilidade aos  $\beta$ -lactâmicos; ii) Caracterização da suscetibilidade à vancomicina e, iii) Análise de atributos de virulência conforme representado na Figura 5.

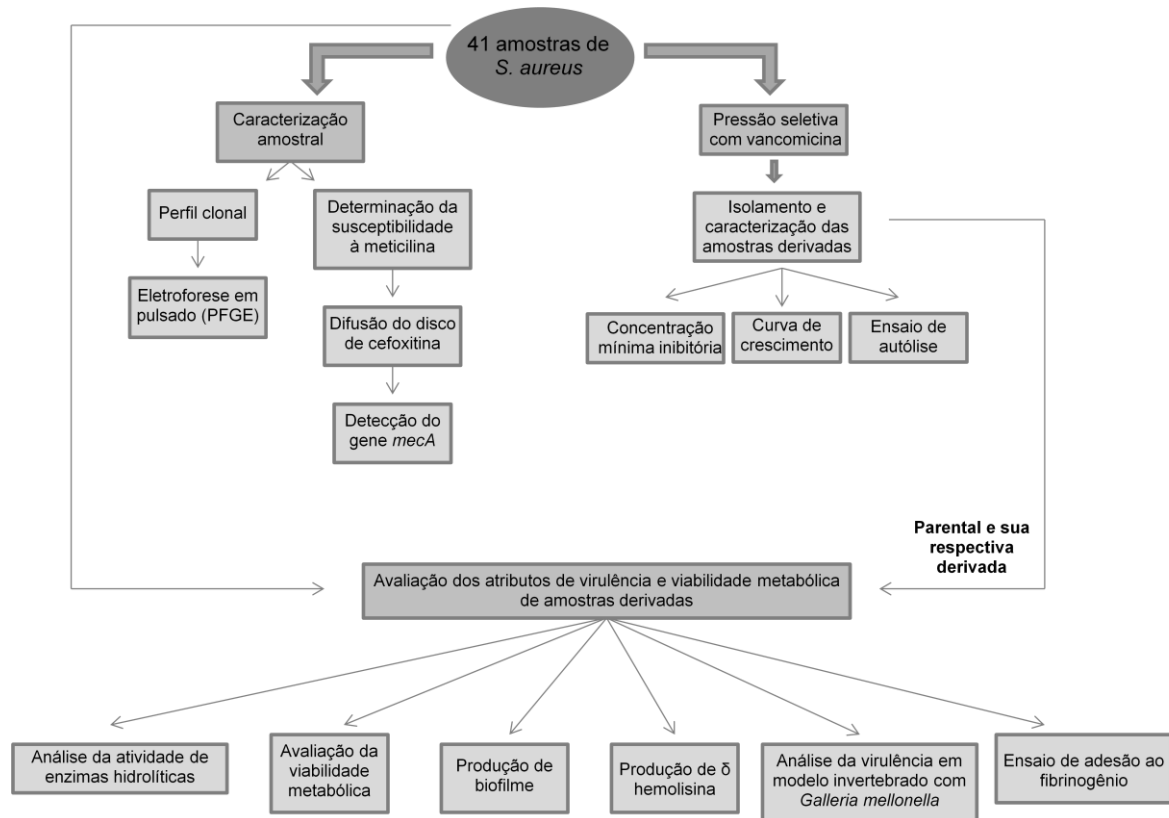


Figura 5 - Fluxograma representativo do delineamento experimental usado na caracterização das amostras quanto a clonalidade, perfil de suscetibilidade a oxacilina e a vancomicina. Fonte: Elaborado pela autora.

## 4.4 CARACTERIZAÇÃO AMOSTRAL

### 4.4.1 Determinação da relação clonal das amostras

#### 4.4.1.1 Eletroforese em campo pulsado (PFGE)

Os isolados foram caracterizados por PFGE (do inglês, *Pulsed Field Gel Electrophoresis*) após a digestão completa do DNA com *Sma*I, de acordo com VIVONI e colaboradores (2005) com modificações. Inicialmente, as amostras de *S. aureus* foram semeadas em ágar nutriente (HIMEDIA) e incubadas a 37°C por 24 horas. Após o crescimento, as colônias de *S. aureus* foram transferidas para tubos contendo salina a 0.9% (p/v) até a obtenção de turbidez equivalente ao padrão 3.0 da escala de McFarland ( $\sim 9 \times 10^8$  UFC/ mL), e em seguida 1.5 mL desta suspensão foi centrifugada em microtubo por 5 minutos a 4.000 g. Desprezado o sobrenadante, as células bacterianas foram suspensas em 250  $\mu$ L de solução PIV (NaCl 1M, Tris-HCl 1 M, pH 8.0). Nesta suspensão adicionou-se o mesmo volume de agarose de baixo ponto de fusão (*low melting point agarose*, PROMEGA) a 2% dissolvida em

solução PIV. Mantida a 58 °C, a solução contendo agarose foi distribuída em moldes retangulares e conservada a 4 °C por 10 minutos para solidificação. Posteriormente, a agarose foi cortada em retângulos nomeados de “plugs”, e estes, por sua vez, foram incubados a 37 °C em solução de lise EC (Tris-HCl 1 M, NaCl 1M, EDTA 0.5 M, 0.5 Brij 58 e 0.5% lauril sarcosinato de sódio, pH 8.0), 80.000 U de lisozima (Sigma-Aldrich) e 50 U de lisostafina (Sigma-Aldrich). Após 18 horas de incubação, a solução anterior foi substituída por 2 mL de solução ESP [EDTA 0.5 M e 1% (p/v) de lauril sarcosinato de sódio, pH 9.0] contendo 0.1 mg/mL de proteinase K (Sigma-Aldrich), incubando-se novamente a 50 °C por 18 horas. Ao final, a solução anterior foi removida e substituída por 2 mL de solução ESP e para estocagem do “plugs” a 4 °C. A digestão do DNA cromossômico iniciou-se após os “plugs” serem lavados com o tampão TE 1X (Tris-HCl 1 M e EDTA 0.5 M, pH 7.5) três vezes seguidas, sendo que a cada hora o tampão foi trocado e os “plugs” incubados a 37 °C, e na última lavagem os “plugs” permaneceram incubados por 18 horas. Após remoção do tampão, 180 µL de uma solução composta por água ultra-pura *Milli-Q®* estéril e 20 µL do tampão da enzima *SmaI* (Thermo Scientific) foram adicionados aos “plugs”. Após incubação 25 °C durante 4 horas, a solução foi removida e adicionou-se um novo tampão da enzima contendo 20 U da enzima de restrição *SmaI*. Finalmente, após período de incubação por 18 horas a 25 °C, o tampão contendo a enzima *SmaI* foi removido e os “plugs” foram aplicados em poços de gel de agarose a 1% (Hygradene) submerso em tampão TBE 0.5X (Tris 0.89 M, ácido bórico 0.89 M, EDTA 2.5 mM, pH 8.2) a 14 °C. A separação dos fragmentos do DNA ocorreu no equipamento de eletroforese de campo pulsado (CHEF DR III, Bio-Rad), utilizando um tempo de pulso crescente de 1 a 35 segundos, durante 21 horas, a 6 V/cm, em angulação de 120°. Após a corrida, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (0.5 µg/mL) (Hexapur) por 40 minutos e descorado em água destilada, posteriormente, sua imagem foi capturada em foto documentador ultravioleta (MiniBIS Pro). Como marcador de tamanho molecular foi utilizado o marcador 50-1.000 kb *Lambda Ladder PFGE Marker* (New England Biolabs).

O padrão de fragmentação das amostras parentais foi analisado visualmente e as amostras foram classificadas de acordo com van BELKUM e colaboradores (2007). Através do *software* Gel J versão 2.0 foi possível a geração de um dendograma utilizando  $\geq 80\%$  de similaridade entre as amostras para a determinação dos pulsotipos (HERAS et al. 2015).



#### 4.4.2 Determinação da suscetibilidade à metilina

##### 4.4.2.1 Difusão do disco

Para determinar a suscetibilidade à metilina foi realizado o teste de difusão do disco de cefoxitina (30 µg) de acordo com os critérios estabelecidos pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (2017). Inicialmente, as amostras de *S. aureus* foram semeadas em ágar nutriente (HIMEDIA) e incubadas a 37 °C por 24 horas. Após o crescimento, as colônias *S. aureus* foram transferidas para tubos contendo salina a 0.9% (p/v) até a obtenção de uma turbidez equivalente ao padrão 0.5 da escala McFarland ( $1.5 \times 10^8$  UFC/mL). Com o auxílio de um "swab" a amostra foi semeada em ágar Müeller-Hinton (HIMEDIA) em três sentidos diferentes, e em seguida, o disco foi adicionado ao centro do agar. Após o período de incubação, 24 horas a 37 °C mediu-se o halo de inibição em mm. De acordo com o CLSI (2017) foram classificadas como sensíveis as amostras que apresentaram halo  $\geq 22$  mm e como resistentes as amostras que apresentaram halo  $\leq 21$  mm. As amostras controle do teste foram as *S. aureus* ATCC 25923 e 33591, sensível e resistente a cefoxitina, respectivamente.

##### 4.4.2.2 Pesquisa do gene *mecA*

O gene *mecA* foi investigado nas amostras que foram classificadas como resistente a metilina pelo método de difusão do disco para cefoxitina segundo o item 4.4.2.1

###### 4.4.2.2.1 Liberação do DNA bacteriano

A liberação do DNA bacteriano foi realizada de acordo com NUNES e colaboradores (1999). Três a cinco colônias de cada amostra cultivada em ágar sangue ("Blood Agar Base", HIMEDIA, com 5% de sangue de carneiro desfibrinado) foram transferidas para 100 µL de água estéril deionizada. Esta suspensão foi mantida à temperatura de ebulição, em torno de 100 °C, por 10 minutos e, em seguida centrifugada por 1 minuto, a 2.500 g. Os sobrenadantes com DNA liberado foram coletados e usados para a reação em cadeia da polimerase (PCR).

#### 4.4.2.2.2 PCR para detecção do gene *mecA*

A detecção do gene *mecA* foi realizada segundo OLIVEIRA e de LENCASTRE (2002). A amplificação dos fragmentos foi realizada em um termociclador (Veriti – Applied Biosystems, Life Technologies), utilizando um volume total de 25 µL constituídos por: 3 µL de DNA, tampão da enzima (10mM de Tris-HCl e 25 mM de KCl), 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200µM de cada deoxinucleotídeo trifosfatado (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) (INVITROGEN, Life Technologies), 1.0 U de *Taq* DNA polimerase (BIOTOOLS), 20 pmoles de cada oligonucleotídeo *mecA* P4 (5' - TCCAGATTACAACCTTCACCAGG - 3') e *mecA* P7 (5'- CCACTTCATATCTTGTAACG - 3') (INVITROGEN). As etapas do ciclo foram: desnaturação inicial a 94 °C por 4 minutos, seguida de 30 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 53 °C e 1 minuto a 72 °C, finalizada com um ciclo de extensão a 72 °C, por 4 minutos. O produto da reação foi submetido a eletroforese em gel de agarose a 1%, em TBE 0,5X (Tris 0.89, ácido bórico 0.89 M, EDTA 2.5 mM, pH 8.2).

Após corrida de 1 hora e 30 minutos a 90 V, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (0.5 µg/mL) (HEXAPUR) e a imagem foi capturada sob luz ultravioleta em um foto documentador (MiniBIS Pro). Como padrão de DNA, foi utilizado o marcador 100 pb DNA *ladder* (INVITROGEN).

## 4.5 PRESSÃO SELETIVA COM VANCOMICINA

### 4.5.1 Isolamento e caracterização das amostras derivadas

O isolamento de amostras de *S. aureus* com suscetibilidade reduzida para vancomicina foi realizado de acordo com DAUM e colaboradores (1992) com modificações. Após crescimento bacteriano de 24 horas a amostra foi diluída em salina a 0.9% (p/v) até a turbidez equivalente a escala 0.5 de McFarland e 1 mL dessa solução foi adicionada a um tubo de centrifugação de 15 mL contendo 3 mL de caldo "Brain Hearth Infusion" (BHI) (HIMEDIA). O experimento durou nove dias. No primeiro dia a amostra foi adicionada ao tubo que continha 0.5 µg/mL de vancomicina e após incubação a 37 °C por 24 horas sob agitação a 110 rpm, 1 mL da cultura foi transferida para um novo tubo contendo 1 µg/mL de vancomicina, sendo incubado por mais 24 horas. Este processo foi repetido durante os dias subsequentes nas concentrações de 2, 3, 4, 6, 8, 12 e 16 µg/mL de vancomicina.

As amostras crescidas na maior concentração de vancomicina foram semeadas em agar nutriente (HIMEDIA) sem a presença de vancomicina e após incubação por 24 horas a 37 °C, foram estocadas em caldo BHI (HIMEDIA) com 20% de glicerol e armazenadas a -20 °C. Estas amostras foram denominadas derivadas enquanto suas respectivas amostras clínicas foram intituladas parentais.

Em todos os testes, com exceção para a determinação da CMI para vancomicina, as amostras derivadas foram cultivadas em caldo BHI contendo metade da concentração de vancomicina a qual a amostra derivada foi isolada (pré-tratamento) e as parentais nas mesmas condições em caldo BHI sem vancomicina. Por exemplo, se a amostra derivada foi isolada na concentração de 16 µg/mL de vancomicina a amostra cresceu em caldo BHI contendo 8 µg/mL de vancomicina antes de todos os testes. No caso da CMI, a amostra foi semeada em uma placa de Petri contendo agar nutriente. Desta semeadura, a qual, a amostra derivada foi originalmente isolada através do ensaio de pressão seletiva, também foi utilizada para determinar a CMI para vancomicina.

#### **4.5.2 Determinação da CMI para vancomicina**

Para determinar a CMI de vancomicina das amostras foi realizado o teste de microdiluição em microplacas estéreis de poliestireno com 96 poços de fundo redondo. Foi utilizado caldo Mueller Hinton II ajustado com cátions (CAMHB) (Becton, Dickinson and Company) (CLSI, 2017). As concentrações finais de vancomicina de 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3 e 4 µg/mL a partir da solução estoque de vancomicina (100 µg/mL) foram adicionadas aos poços da microplaca preenchidos com CAMHB. Na sequência, logo após o ensaio de isolamento das amostras derivadas (item 4.5.1), os inóculos bacterianos foram ajustados a 0.5 da escala McFarland, diluídos em salina a 0.9% (p/v) atingindo a concentração final de, aproximadamente,  $10^4$  UFC/mL por poço e inoculados a 37 °C por 24 horas. O teste foi realizado sempre com a amostra parental e derivada sob as mesmas condições, com poços para controle de crescimento bacteriano (sem antimicrobiano) e controle de esterilidade (sem microrganismo).

Como controle de qualidade do teste foi utilizada a amostra padrão *S. aureus* ATCC 29213.

#### 4.5.3 Ensaio de autólise

A mensuração da produção de autolisinas das amostras parentais e derivadas foi realizada de acordo com PENG e colaboradores (2016). Após crescimento em caldo BHI (HIMEDIA) sem vancomicina (amostras parentais) e com vancomicina (amostras derivadas) por 24 horas a 37 °C sob agitação a 110 rpm, as amostras foram centrifugadas e concentradas até a obtenção de uma densidade óptica (DO) de 630 nm = 1. As células foram centrifugadas a 10.000 g e lavadas duas vezes com solução Tris-HCl (pH 7.5) a 0.05 M e em seguida, foram incubadas a 37 °C sob agitação a 110 rpm em solução Tris-HCl contendo 0.05% de Triton® X-100 (pH 7.5). A DO<sub>630</sub> foi medida após 5 horas de incubação em espectrofotômetro 552 UV-VIS (PerkinElmer).

As atividades autolíticas de cada amostra (parental e derivada) foram expressas em percentual no intervalo de 5 horas. Foram calculadas a diferença entre os percentuais de autólise da amostra derivada em relação a sua amostra parental: resultados positivos foram relacionados a uma maior atividade autolítica, enquanto resultados negativos foram relacionados com menor atividade autolítica da amostra derivada em relação a sua parental.

#### 4.5.4 Curva de crescimento

O teste foi realizado nas amostras derivadas isoladas a partir do crescimento em 16 µg/mL de vancomicina (V16) (n=9) e suas respectivas parentais de acordo com MARQUES e colaboradores (2016) com modificações. Inicialmente, após crescimento em caldo BHI (HIMEDIA), por 24 horas a 37 °C sob agitação a 110 rpm, sem vancomicina (amostras parentais) e com vancomicina (8 µg/mL) (amostras derivadas), cada amostra foi adicionada a placa de poliestireno de 96 poços para ajuste do valor de absorbância. Utilizou-se DO<sub>630</sub> entre 0.08-0.1 (~10<sup>6</sup> UFC/mL) para iniciar a curva de crescimento. Foi adicionada a placa de poliestireno alíquotas das amostras V16 com adição de vancomicina (8 µg/mL), alíquotas das amostras V16 e parentais sem adição de vancomicina e a placa foi incubada a 37 °C. O crescimento bacteriano foi avaliado através da mensuração da DO<sub>630</sub> nos intervalos de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14 horas.

Como a amostra *S. aureus* ATCC 29213 é a referência para testes de diluição em caldo, utilizou-se apenas essa amostra como controle de qualidade do teste.

## 4.6 AVALIAÇÃO DOS ATRIBUTOS DE VIRULÊNCIA E VIABILIDADE METABÓLICA DE AMOSTRAS DERIVADAS

Todos os testes foram realizados simultaneamente com a amostra parental e sua respectiva amostra derivada, essa última, após passar por pré-tratamento com vancomicina (item 4.5.1), para comparação entre os fenótipos.

### 4.6.1 Produção de biofilme

A mensuração da formação de biofilme foi determinada em placas de poliestireno de 96 poços de acordo com método de STEPANOVIC e colaboradores (2007). Primeiramente, as amostras foram inoculadas em caldo BHI (HIMEDIA) sem vancomicina (amostras parentais) e com vancomicina (amostras derivadas) e incubadas por 24 horas a 37 °C sob agitação a 110 rpm. Após o período de incubação as amostras foram semeadas em agar nutriente (HIMEDIA) sem adição de vancomicina e incubadas a 37 °C por 24 horas. Após crescimento *overnight* as amostras foram diluídas em salina a 0.9% (p/v) até obtenção de turbidez equivalente a escala 0.5 de McFarland e 20 µL dessa solução foi adicionada ao poço contendo 180 µL de TSB suplementado com 1% de glicose. As cepas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Após incubação, as placas foram lavadas três vezes com água destilada, para remoção das bactérias não aderidas, e secas durante 1 hora a 60 °C. Em seguida, as placas foram coradas com uma solução de safranina 0.1% por 45 minutos. Em seguida, as placas foram lavadas novamente com água destilada e foram secas invertidas em estufa a 37 °C por 30 minutos. Posteriormente adicionou-se as placas solução álcool-éter a (3%), deixou-se agir por 15 minutos e mediu-se a  $DO_{492}$ .

O teste foi realizado em triplicata e a amostra foi classificada como não produtora, fracamente produtora, moderadamente produtora ou fortemente produtora. A amostra foi classificada como não produtora se apresentou média aritmética (MA) menor do que a média aritmética da amostra controle *S. epidermidis* ATCC 12228 (não produtor de biofilme) acrescida três vezes o desvio padrão dessa amostra (DPc). Caso a amostra apresentasse MA maior que DPc e  $\leq 2$  vezes MA foi considerada produtora fraca de biofilme, caso a amostra apresentasse MA duas vezes maior que o DPc mas menor que quatro vezes o DPc foi considerada produtora moderada de biofilme e se a amostra apresentasse MA quatro vezes maior o DPc esta foi considerada produtora forte de biofilme.

Para o controle positivo do teste foi utilizada a amostra padrão *S. aureus* ATCC 25923 (produtor de biofilme).

#### 4.6.2 Ensaio de adesão ao fibrinogênio

O ensaio de adesão ao fibrinogênio foi realizado em placas de poliestireno de 96 poços de acordo com método de BI e colaboradores (2016) com modificações. Devido a problemas técnicos, só foi possível analisar a adesão ao fibrinogênio em 30 amostras parentais e suas respectivas derivadas. Das 30 amostras analisadas, 16 amostras (53%) possuem derivadas em V4, sete amostras derivadas (23%) em V6, seis amostras (20%) derivadas em V12, uma amostra derivada (4%) em V16 e a amostra padrão Mu3 com sua derivada em V16.

Após crescimento em caldo BHI (HIMEDIA) sem vancomicina (amostras parentais) e com vancomicina (amostras derivadas) a 37 °C, sob agitação a 110 rpm por 24 horas, a amostra foi centrifugada e concentrada até obtenção de  $DO_{630} = 1$ , ressuspendida em solução PBS (do inglês, *Phosphate Buffered Saline*). Em seguida, 200 µL dessa suspensão foi adicionada à placa de poliestireno em triplicata, a qual já continha o fibrinogênio bovino (Sigma-Aldrich) (20 µg/mL preparado no dia anterior e mantido *overnight* a 4 °C) e incubada a 37 °C por 2 horas. Após o período de incubação, removeu-se a suspensão por inversão, lavou-se a placa com PSB e adicionou-se formaldeído a 25% (v/v) à placa para fixação das células bacterianas. A placa foi corada com cristal violeta a 0.03% (v/v) por 10 minutos e lavada novamente com PSB.

A adesão ao fibrinogênio foi mensurada a 590 nm. Como controle interno do teste foram utilizados três poços da placa de poliestireno os quais não houve adição de amostra.

#### 4.6.3 Produção de δ-hemolisina

A produção δ-hemolisina é um indicador indireto para a funcionalidade do gene *agr*. A amostra *S. aureus* RN4220 produz β-hemolisina que pode melhorar a hemólise pela δ-hemolisina, mas inibe a atividade da α-hemolisina. A δ-hemolisina produzida por um isolado teste provoca sinergia de hemólise na área da zona de hemólise da amostra *S. aureus* RN4220 em sobreposição à amostra teste (CAFISO et al., 2012). O teste foi realizado de acordo com CHANG e colaboradores (2015).

Após crescimento *overnight* em agar nutriente (HIMEDIA) a amostra *S. aureus* RN4220 foi diluída em salina a 0.9% (p/v) até obtenção de turbidez equivalente a escala 0.5 de McFarland. Em uma placa de agar Columbia com sangue (5% de hemácia de carneiro - MERCKOPLATE®) foi adicionada a amostra *S. aureus* RN4220 ao centro da placa através de um risco com auxílio de alça bacteriológica. As amostras foram inoculadas em caldo BHI (HIMEDIA) sem vancomicina (amostras parentais) e com vancomicina (amostras derivadas) e incubadas por 24 horas a 37 °C sob agitação a 110 rpm. Após o período de incubação as amostras foram semeadas em agar nutriente (HIMEDIA) sem adição de vancomicina e incubadas a 37 °C por 24 horas. Após crescimento *overnight* as amostras foram diluídas em salina a 0.9% (p/v) até obtenção de turbidez equivalente a escala 0.5 de McFarland e com um intervalo de 1 mm ou 4 mm do risco da amostra RN4220 foram semeadas através de um risco com auxílio de alça bacteriológica. As placas foram incubadas à 37 °C por 24 horas e a leitura da zona de hemólise foi realizada à olho nu após o período de incubação.

As amostras que apresentaram intensificação da hemólise na zona de hemólise da amostra *S. aureus* RN4220 foram consideradas positivas para a produção de  $\delta$ -hemolisina.

#### **4.6.4 Análise da atividade de enzimas hidrolíticas**

A atividade de fitase, fosfolipase, esterase, hemolisina e DNase foi comparada entre amostras parentais e derivadas. As amostras foram inoculadas em caldo BHI (HIMEDIA) sem vancomicina (amostras parentais) e com vancomicina (amostras derivadas) e incubadas por 24 horas a 37 °C sob agitação a 110 rpm. Após, realizou-se a inoculação puntiforme no centro da placa de Petri com meios que continham, em sua formulação, o substrato necessário para avaliação da atividade enzimática na concentração final referente à: (i) fitase, em que foi utilizado meio sólido contendo glicose 10 g/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.5 g/L, KCl 0.2 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 g/L, fitato de cálcio 2 g/L, extrato de levedura 0.5 g/L,  $\text{MnSO}_4$  0.005 g/L,  $\text{FeSO}_4$  0.005 g/L e agar bacteriológico 15 g/L, (ii) fosfolipase, em meio sólido contendo glicose 20 g/L, extrato de levedura 5 g/L, peptona 10 g/L, NaCl 40 g/L,  $\text{CaCl}_2$  0.74 g/L, agar bacteriológico 15 g/L e 20% de gema de ovo (v/v), (iii) esterase, em meio sólido contendo peptona 10 g/L, NaCl 5 g/L,  $\text{CaCl}_2$  0.1 g/L e agar bacteriológico 15 g/L, (iv) hemolisina, em que utilizou-se agar Columbia com sangue (5% de hemácia

de carneiro - MERCKOPLATE®) e (v) DNase em meio sólido contendo triptose 20 g/L, ácido desoxirribonucleico 2 g/L, NaCl 5 g/L e ágar bacteriológico 12 g/L. Em seguida, as placas foram incubadas por 48 horas e a atividade enzimática foi evidenciada através da formação de halo de degradação ao redor da colônia. Para tal, foi calculado o índice Pz, que se refere ao diâmetro da colônia dividido pelo diâmetro do halo, ou seja, quanto menor for o Pz maior a atividade enzimática e vice-versa (QUIBLIER et al. 2011).

#### **4.6.5 Avaliação da viabilidade metabólica**

A redução do sal hidróxido de 2,3-bis(2-metóxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[fenilamina)carbonil]-2H-tetrazólio (XTT) em formazano é um indicador indireto da viabilidade metabólica nas bactérias. O XTT é reduzido pelas desidrogenases do sistema de transporte de elétrons. A atividade dessas enzimas no sistema de elétrons pode ser medido pelo uso de aceptores de elétrons artificiais como o XTT (CHAIEB et al., 2011). Foi avaliado se as amostras parentais e derivadas estavam metabolicamente viáveis na  $DO_{630} = 1$  através da redução do XTT de acordo com CHAIEB e colaboradores (2011) com modificações. Devido a falha técnica, só foi possível analisar a atividade metabólica de 30 amostras parentais e suas respectivas derivadas. Das 30 amostras analisadas neste teste, 16 amostras (53%) possuem derivadas em V4, sete amostras derivadas (23%) em V6, seis amostras (20%) derivadas em V12, uma amostra derivada (4%) em V16 e a amostra padrão Mu3 com sua derivada em V16.

Após crescimento em caldo BHI (HIMEDIA) sem vancomicina (amostras parentais) e com vancomicina (amostras derivadas) a 37 °C, sob agitação a 110 rpm por 24 horas, a amostra foi centrifugada e concentrada até a  $DO_{630} = 1$  e ressuspendida em solução PBS, então 200 µL dessa solução foi adicionada à placa de poliestireno em triplicata, centrifugou-se a placa a 2.500 rpm e os sobrenadantes foram retirados. Em seguida, adicionou-se 158 µL de PBS, 40 µL de XTT (1 mg/mL) e 2 µL de menadiona (4 mM). A placa foi incubada por 3 horas a 37 °C ao abrigo da luz. Ao final da incubação, a redução do XTT foi mensurada a 492 nm para a avaliação das células metabolicamente ativas.

Como controle interno do teste foram utilizados três poços da placa de poliestireno os quais não houve adição de amostra.



#### 4.6.6 Análise da virulência em modelo invertebrado com *Galleria mellonella*

Os ensaios da análise da virulência foram realizados em quatro amostras parentais: (23 e 99 MSSA) e (28 e 127 MRSA) clonalmente distintas, de acordo com o PFGE, e suas respectivas derivadas em V16, seguindo a metodologia de PELEG e colaboradores (2009). Larvas de *G. mellonella* em instar definitivo, pesando de 250-350 mg foram utilizadas para inoculação de 10 µL da amostra de *S. aureus* na hemocele do invertebrado. Após crescimento em caldo BHI (HIMEDIA) sem vancomicina (amostras parentais) e com vancomicina (amostras derivadas) a 37 °C, sob agitação a 110 rpm por 24 horas, as amostras foram centrifugadas e concentradas até obtenção de  $DO_{630} = 1$ , ressuspensa em solução PBS. Em seguida, as amostras foram diluídas serialmente em PBS até se chegar nas concentrações do inóculo, as quais foram utilizadas,  $10^6$  e  $10^5$  UFC/mL. Foram realizadas contagem das colônias bacterianas em todos os testes para verificação do inóculo bacteriano. Para cada concentração de inóculo foram utilizadas 20 larvas. A inoculação das células bacterianas nas larvas foi intra hemocele, do lado esquerdo da larva, com auxílio de seringa. Após a inoculação as larvas foram incubadas em placas de Petri a 37 °C em estufa bacteriológica. As larvas foram consideradas mortas quando não exibiram nenhum movimento em resposta ao toque à esquerda e foram contadas diariamente por quatro dias seguidos (96 horas).

O controle foi um grupo de 20 larvas inoculadas com PBS para monitoramento da morte por trauma físico. O experimento que apresentou >2 larvas mortas no grupo controle foi repetido.

#### 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A estatística descritiva foi realizada nos testes aplicáveis. Para os ensaios de determinação da CMI de vancomicina, autólise, produção de biofilme, adesão ao fibrinogênio, análise da atividade de enzimas hidrolíticas e avaliação da viabilidade metabólica foi utilizado o teste T pareado considerando  $p < 0.05$  e para a análise da virulência em modelo invertebrado com *G. mellonella* foi utilizado o método Kaplan-Meier comparado através do teste Log rank, considerando  $p < 0.001$ . Os softwares estatísticos utilizados foram o Graph Pad Prism versão 5.03, SigmaPlot versão 14.0 e o BioEstat versão 5.0.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 DETERMINAÇÃO DA RELAÇÃO CLONAL DAS AMOSTRAS

#### 5.1.1 Eletroforese em campo pulsado (PFGE)

Das 41 amostras de *S. aureus* parentais deste estudo foi possível identificar a presença de 24 pulsotipos distintos classificados de A a H. Um pulsotipo alberga sete amostras, subdividas em dois subtipos, quatro pulsotipos possuem três amostras classificadas em até três subtipos e três pulsotipos apresentam duas amostras categorizadas em até dois subtipos (Figura 6).

### 5.2 SUSCEPTIBILIDADE À METICILINA

Das 41 amostras de *S. aureus* analisadas, nove (22%) apresentaram resistência à cefoxitina através do método de difusão do disco, e foram positivas para a presença do gene *mecA* na reação de PCR.

### 5.3 PRESSÃO SELETIVA COM VANCOMICINA

#### 5.3.1 Isolamento e caracterização das amostras derivadas

Todas as 41 amostras de *S. aureus* foram capazes de crescer em caldo BHI contendo concentrações de vancomicina variando de 4 a 16 µg/mL. Nove amostras (22%) conseguiram crescer até a concentração de 16 µg/mL de vancomicina. Das nove amostras parentais MRSA foram obtidas duas (22%) derivadas isoladas na concentração de 4 µg/mL de vancomicina, uma amostra (12%) na concentração de 6 µg/mL, três (33%) amostras na concentração de 12 µg/mL e três (33%) amostras na concentração de 16 µg/mL de vancomicina (Tabela 2).

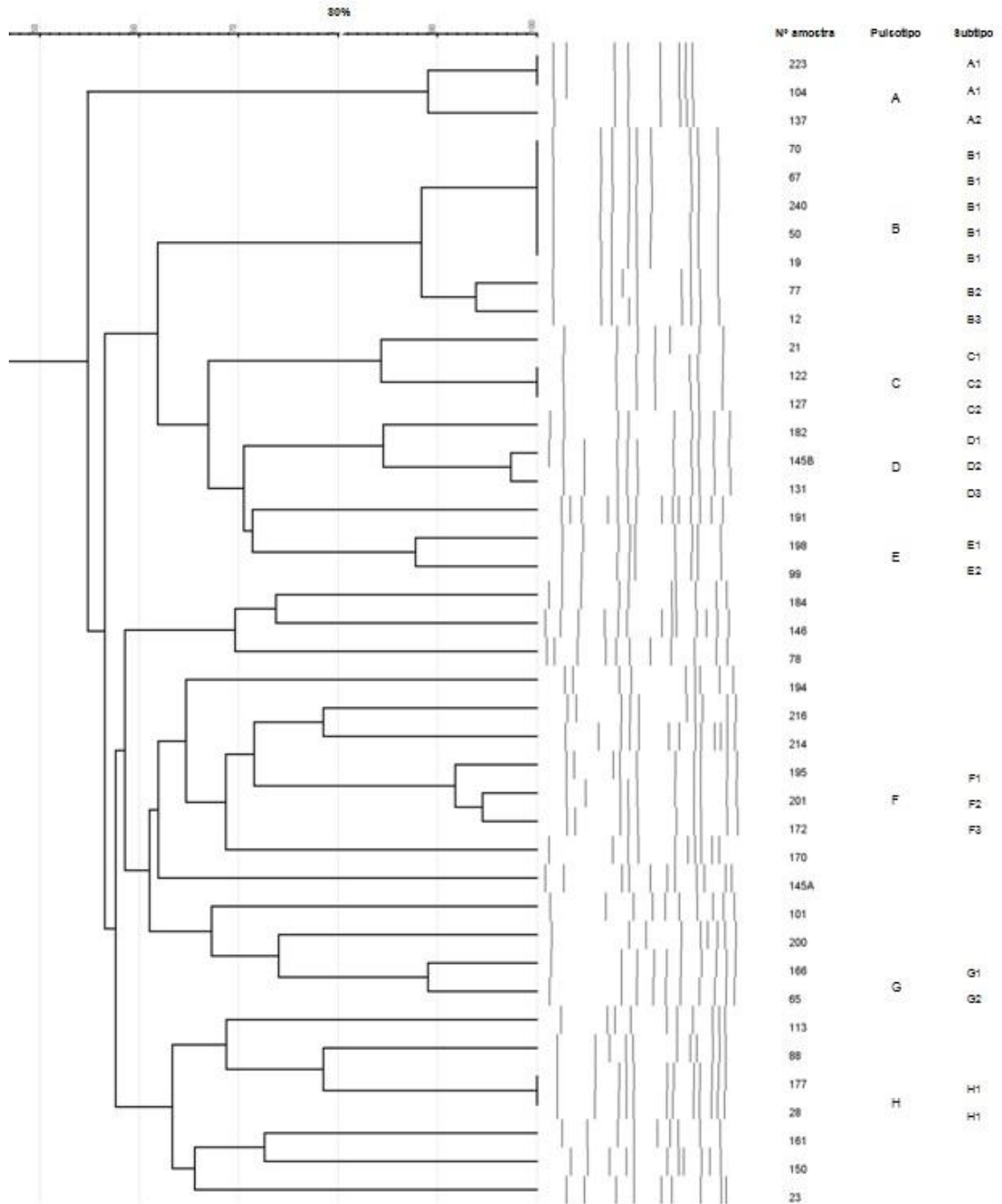


Figura 6 - Dendograma representativo do grau de similaridade entre as 41 amostras parentais de *S. aureus* isoladas de bacteremia de pacientes em tratamento hemodialítico após a fragmentação do DNA cromossômico pela enzima de restrição *Sma*I e perfil de fragmentação por PFGE.

Tabela 2 - Distribuição das 41 amostras clínicas de *S. aureus* conforme crescimento em diferentes concentrações de vancomicina.

Vancomicina ( $\mu\text{g/mL}$ )	Amostras derivadas n (%)		
	MSSA (n=32)	MRSA (n=9)	Total (n=41)
4	13 (32)	2 (5)	15 (37)
6	7 (17)	1 (2)	8 (19)
12	6 (15)	3 (7)	9 (22)
16	6 (15)	3 (7)	9 (22)

### 5.3.2 Determinação da CMI para vancomicina

Todas as amostras parentais e derivadas apresentaram CMI na faixa de suscetibilidade (até 2  $\mu\text{g/mL}$ ) para vancomicina. Os valores da CMI<sub>50</sub> e CMI<sub>90</sub> das amostras estão representados na Tabela 2. A CMI das amostras parentais variou entre 0.5 a 1.5  $\mu\text{g/mL}$  de vancomicina, enquanto para as derivadas a variação da CMI foi de 1.0 a 2.0  $\mu\text{g/mL}$  de vancomicina.

Foi observado um aumento, de até três diluições, na CMI de vancomicina em 23 amostras derivadas (56%) em relação as suas respectivas amostras parentais, em 17 amostras derivadas (42%) não houve alteração na CMI em relação as parentais e apenas uma amostra (2%) apresentou diminuição de uma diluição na CMI em comparação com sua respectiva amostra parental.

Das nove amostras parentais classificadas como MRSA, sete amostras (78%) apresentaram CMI de 1.0  $\mu\text{g/mL}$  para vancomicina e duas (22%) apresentaram CMI de 1.5  $\mu\text{g/mL}$  para vancomicina. Quanto as suas respectivas amostras derivadas, duas amostras (22%) apresentaram CMI de 1.0  $\mu\text{g/mL}$  para vancomicina, em quatro amostras (44%) a CMI foi de 1.5  $\mu\text{g/mL}$  e três amostras (33%) a CMI foi igual a 2.0  $\mu\text{g/mL}$  de vancomicina (Tabela 3).

A diferença entre as CMIs das amostras parentais e derivadas foram estatisticamente significativas ( $p < 0.001$ ), embora em termos biológicos, tal variação esteja dentro dos limites aceitáveis do teste de microdiluição em caldo, conforme CLSI.

Tabela 3 - CMI para vancomicina das 41 amostras de *S. aureus* parentais e suas respectivas derivadas.

CMI Vancomicina µg/mL				
Amostras		Intervalo	CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>
Controles	Parentais MSSA (n=32)	0.5 - 1.5	1.0	1.5
	Parentais MRSA (n=9)	1.0 - 1.5	1.0	1.5
	ATCC 29213	1.0		
	* Mu50	4.0		
	Mu3	1.0		
Controles	Derivadas MSSA (n=32)	1.0 - 2.0	1.5	2.0
	Derivadas MRSA (n=9)	1.0 - 2.0	1.5	2.0
	ATCC 29213 V16	1.5		
	* Mu50 V16	1.0		
	Mu3 V16	1.0		

\* CMI

### 5.3.3 Ensaio de autólise

Todas as 41 amostras parentais e suas respectivas derivadas foram analisadas. Vinte e sete amostras derivadas (66%) apresentaram percentual da atividade autolítica menor que suas respectivas parentais e 14 amostras (34%) apresentaram percentual de atividade autolítica maior que suas parentais. Apesar das amostras derivadas apresentarem, em sua maioria, uma menor atividade autolítica, a diferença da autólise entre as amostras parentais e derivadas não foi estatisticamente significativa ( $p=0.0670$ ) (Figura 7).

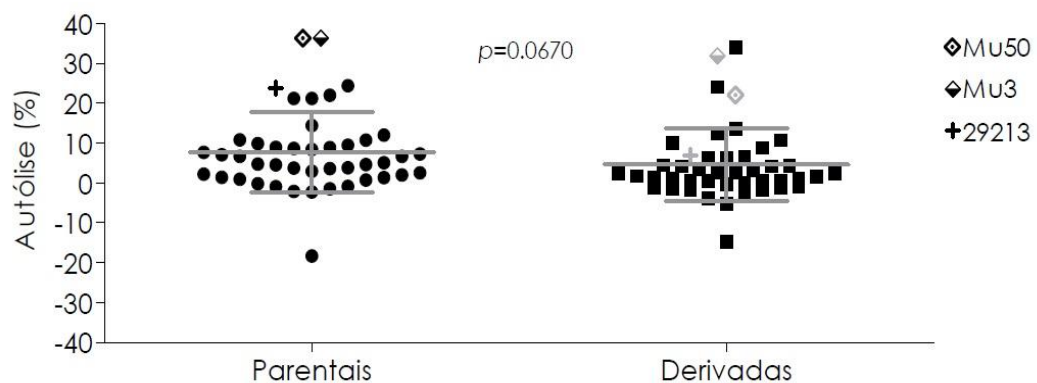


Figura 7 - Atividade autolítica das 41 amostras de *S. aureus* parentais, amostras padrão ATCC 29213, Mu50, Mu3 e suas respectivas amostras derivadas. Teste T pareado ( $p < 0.05$ ). Barras representam média e desvio padrão.

Quando comparamos cada grupo de isolamento amostral separadamente, observamos que só houve diferença significativa na taxa autolítica entre as amostras parentais e derivadas dos grupos V4 e V12 ( $p=0.0202$  e  $p=0.0229$ , respectivamente) (Figura 8).

#### **5.3.4 Curva de crescimento**

Foram obtidas curva de crescimento das 9 amostras parentais com suas respectivas derivadas V16. As amostras crescidas na presença de 8  $\mu\text{g/mL}$  de vancomicina apresentaram um crescimento mais lento do que em relação as suas respectivas amostras parentais; enquanto que não foram observadas diferenças na curva de crescimento entre as amostras V16 e suas respectivas amostras parentais crescidas na ausência de vancomicina (Figura 9).

### **5.4 AVALIAÇÃO DOS ATRIBUTOS DE VIRULÊNCIA E VIABILIDADE METABÓLICA DE AMOSTRAS DERIVADAS**

#### **5.4.1 Produção de biofilme**

A produção de biofilme foi avaliada em 41 amostras parentais e suas respectivas derivadas. Foi observado que as amostras derivadas produziram menos biofilme do que as parentais ( $p=0.0079$ ) (Figura 10), de forma que não foi identificada nenhuma amostra fortemente produtora de biofilme entre as derivadas ( $p=0.0045$ ) (Figura 11). Além da análise pareada entre as amostras parentais e derivadas, investigou-se também todas as combinações entre os grupos das derivadas e das amostras parentais, entre si, de forma não pareada. Foi observado que a produção de biofilme foi maior nos grupos V6 e V12 em comparação com o grupo V4, tanto nas amostras parentais quanto derivadas, indicando que quanto maior a pressão seletiva exercida pela vancomicina maior a produção de biofilme nessas amostras ( $p < 0.05$ ) (Figura 12).

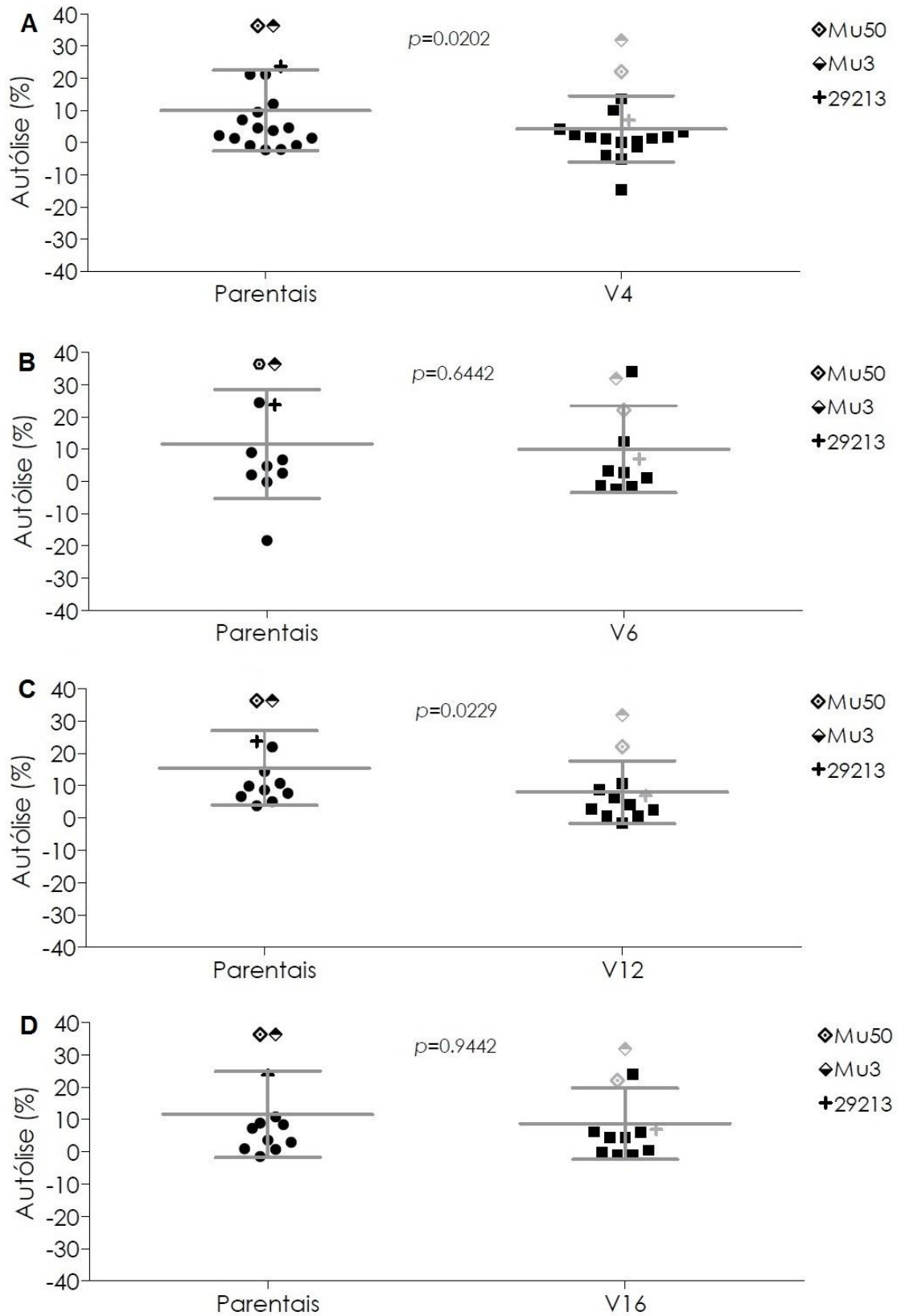


Figura 8 - Atividade autolítica das amostras parentais e derivadas, conforme grupo de isolamento V4 n=15 (A), V6 n=8 (B), V12 n=9 (C) e V16 n=9 (D). Foi realizado o teste T pareado para cada um dos grupos e considerou-se significativo  $p < 0.05$ . Controles: ATCC 29213, Mu50, Mu3.

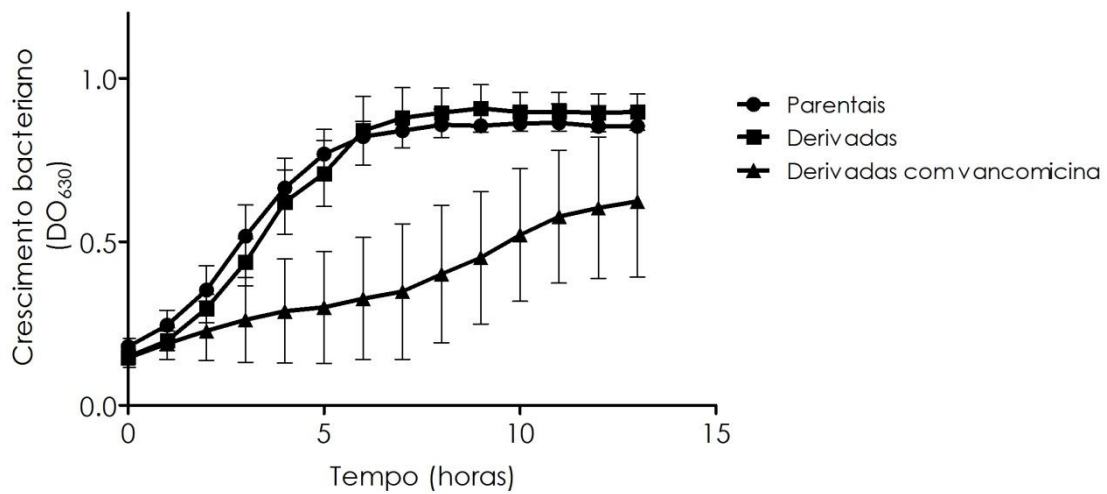


Figura 9 - Curvas de crescimento de nove amostras parentais de *S. aureus* e suas respectivas derivadas (V16). As amostras derivadas foram pré-tratadas com vancomicina (8 µg/mL) por 24 horas e a curva de crescimento realizada na presença e ausência do antimicrobiano (8 µg/mL). Dados representam média aritmética e desvio padrão das nove amostras.

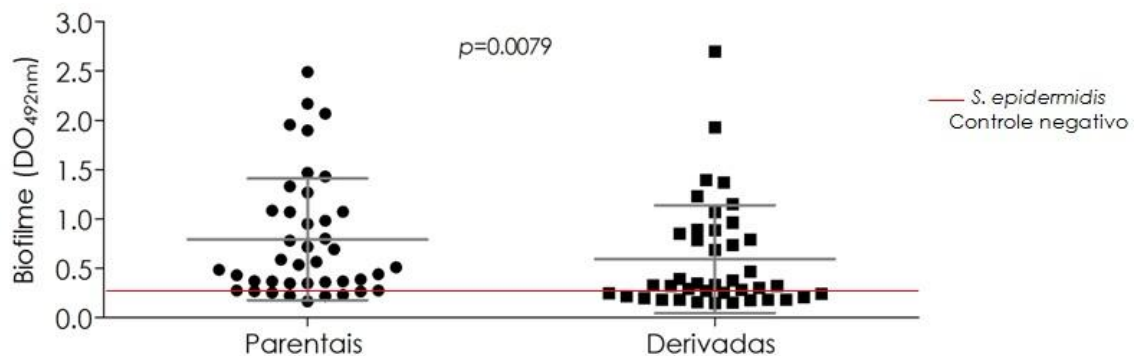


Figura 10 - Produção de biofilme das amostras de *S. aureus* parentais e derivadas n=41. Teste T pareado ( $p < 0.05$ ). Barras representam a média aritmética e desvio padrão das 41 amostras. A linha vermelha representa o ponto de corte da produção de biofilme, conforme o controle negativo *S. epidermidis* ATCC 12228.



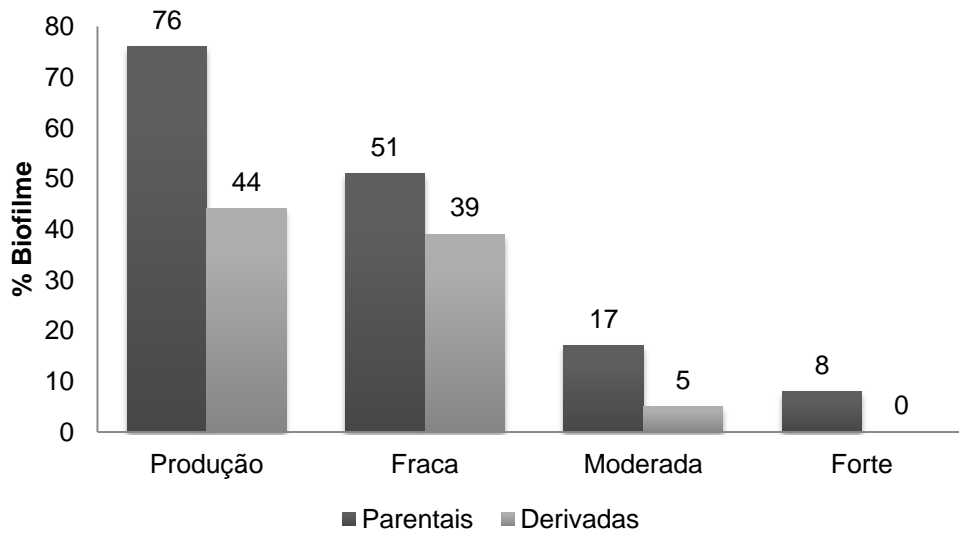


Figura 11 - Distribuição das 41 amostras parentais de *S. aureus* e suas respectivas amostras derivadas quanto a intensidade de formação de biofilme. A classificação da produção do biofilme foi feita através do desvio padrão da amostra *S. epidermidis* ATCC 12228. Teste G ( $p < 0.05$ ).

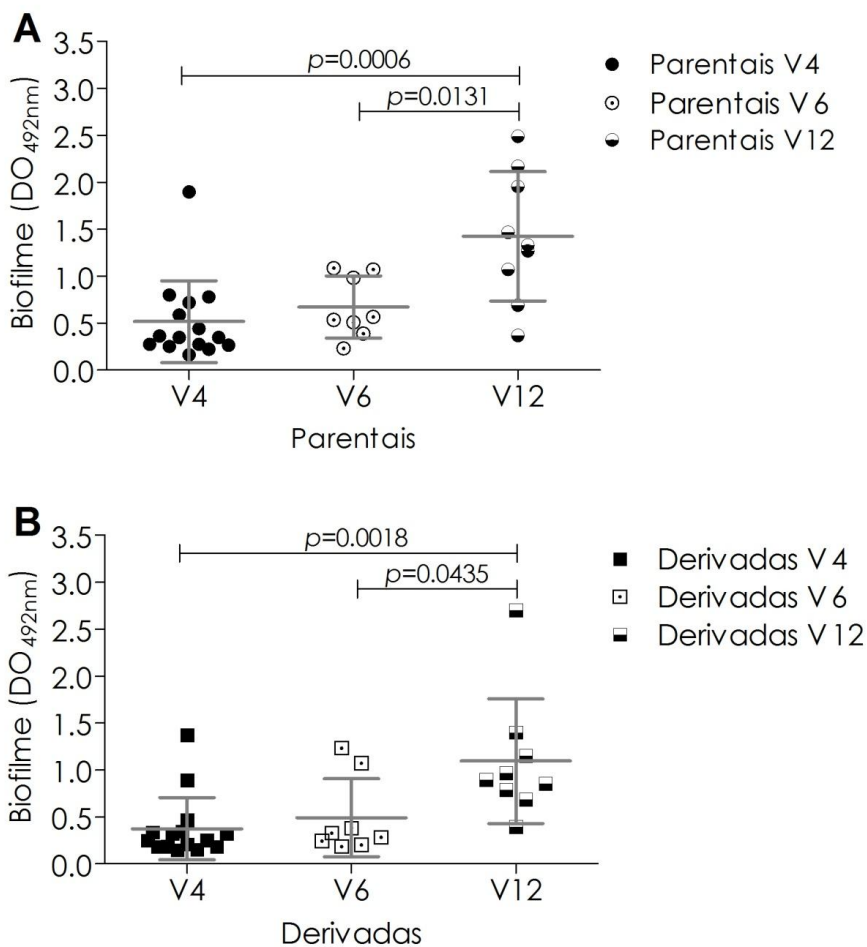


Figura 12 - Produção de biofilme das amostras de *S. aureus* parentais (A) e derivadas (B) dos grupos V4 n=15, V6 n=8 e V12 n=9. Teste T não pareado ( $p < 0.05$ ). Barras representam a média aritmética e desvio padrão dos grupos amostrais.

### 5.4.2 Ensaio de adesão ao fibrinogênio

Não houve diferença estatisticamente significativa quanto à ligação ao fibrinogênio entre as amostras parentais e suas respectivas derivadas de acordo com o teste T pareado ( $p=0.6286$ ) (Figura 13).

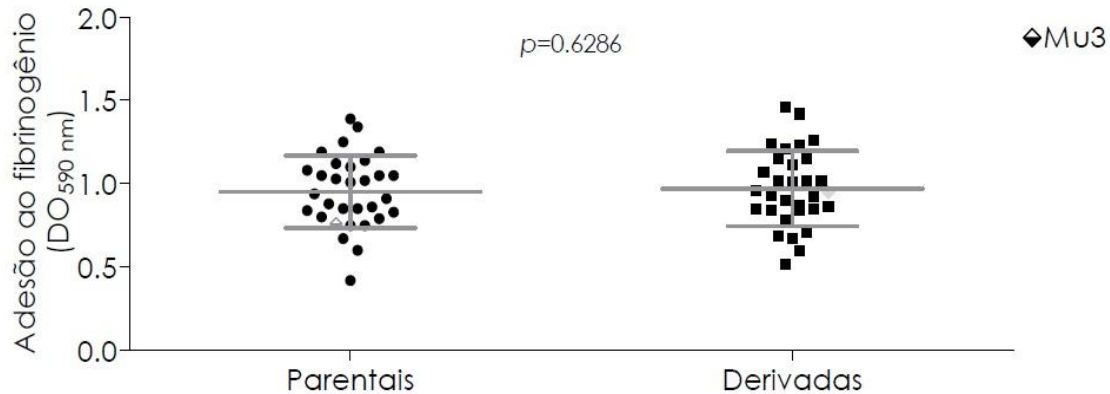


Figura 13 - Ensaio de adesão ao fibrinogênio em 30 amostras de *S. aureus* parentais e suas respectivas amostras derivadas. Barras representam a média aritmética e desvio padrão das 30 amostras. Controle: Mu3.

### 5.4.3 Produção de $\delta$ -hemolisina

Através do teste com a amostra padrão *S. aureus* RN4220 foi possível identificar que das 41 amostras parentais, 26 amostras (63%) foram classificadas como produtoras de  $\delta$ -hemolisina e 15 amostras (37%) foram classificadas como não produtoras. Das 26 amostras parentais produtoras de  $\delta$ -hemolisina, 15 amostras derivadas (58%) mantiveram a produção desta hemolisina, enquanto 11 amostras derivadas (42%) deixaram de produzir. Das 15 amostras parentais não produtoras de  $\delta$ -hemolisina, 12 amostras derivadas (80%) continuaram a não produzir essa hemolisina, enquanto três amostras derivadas (20%) passaram a produzir a  $\delta$ -hemolisina.

Embora observamos uma tendência na diminuição da produção da  $\delta$ -hemolisina nas amostras derivadas, de acordo com o teste Qui-Quadrado não houve diferença estatística na produção dessa hemolisina entre as amostras parentais e derivadas ( $p=0.1211$ ) (Figura 14). Na Figura 15 podemos observar amostra parental (28) produtora da  $\delta$ -hemolisina enquanto a sua respectiva amostra derivada (28V16) não produz essa hemolisina.

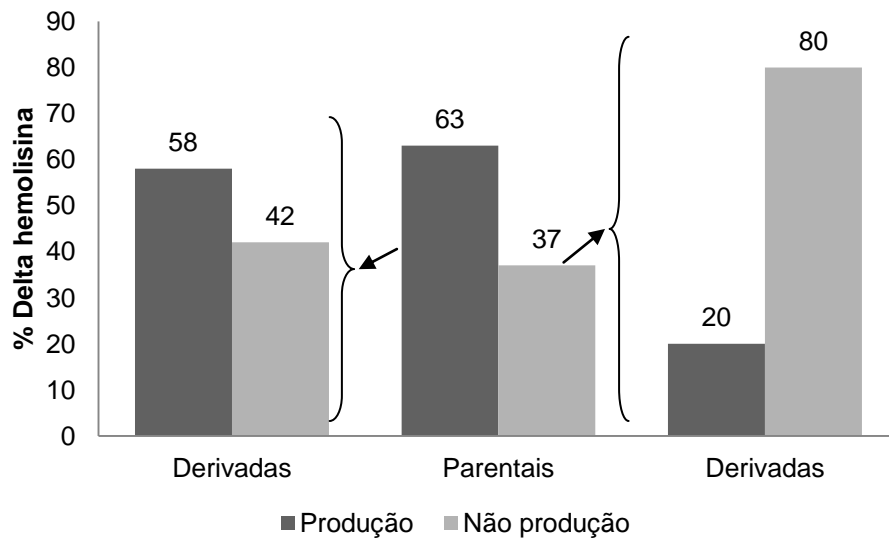


Figura 14 - Distribuição das 41 amostras parentais de *S. aureus* e suas respectivas amostras derivadas quanto a produção de  $\delta$ -hemolisina. A classificação da produção de  $\delta$ -hemolisina foi feita através da análise a olho nú da presença de hemólise mais intensa próxima a zona de hemólise da amostra padrão *S. aureus* RN4220. Teste Qui-Quadrado ( $p < 0.05$ ).

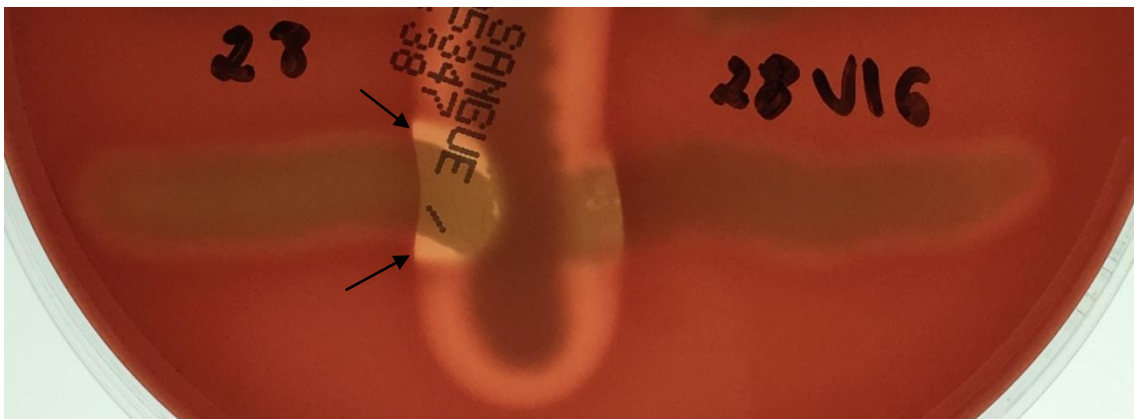


Figura 15 - Foto ilustrativa da produção de  $\delta$ -hemolisina em amostra parental (28) e não produção na respectiva amostra derivada (28V16). As setas indicam intensificação da zona de hemólise da amostra 28 induzida pela amostra padrão *S. aureus* RN4220. A amostra derivada 28V16 foi classificada como não produtora de  $\delta$ -hemolisina. Fonte: Arquivo pessoal.

#### 5.4.4 Análise da atividade de enzimas hidrolíticas

Foram testadas atividade das enzimas hidrolíticas fitase, esterase fosfolipase, hemolisina e DNase em 41 amostras clínicas de *S. aureus* parentais e suas respectivas derivadas e das amostras *S. aureus* ATCC 29213, Mu50 e Mu3. Quando comparamos os Pz (razão entre o diâmetro da colônia e diâmetro do halo) das amostras parentais e derivadas encontramos maior produção de todas as enzimas nas amostras parentais com diferença estatisticamente significativa através do teste T pareado em relação a produção dessas enzimas nas amostras derivadas ( $p < 0.05$ ) (Figura 16).

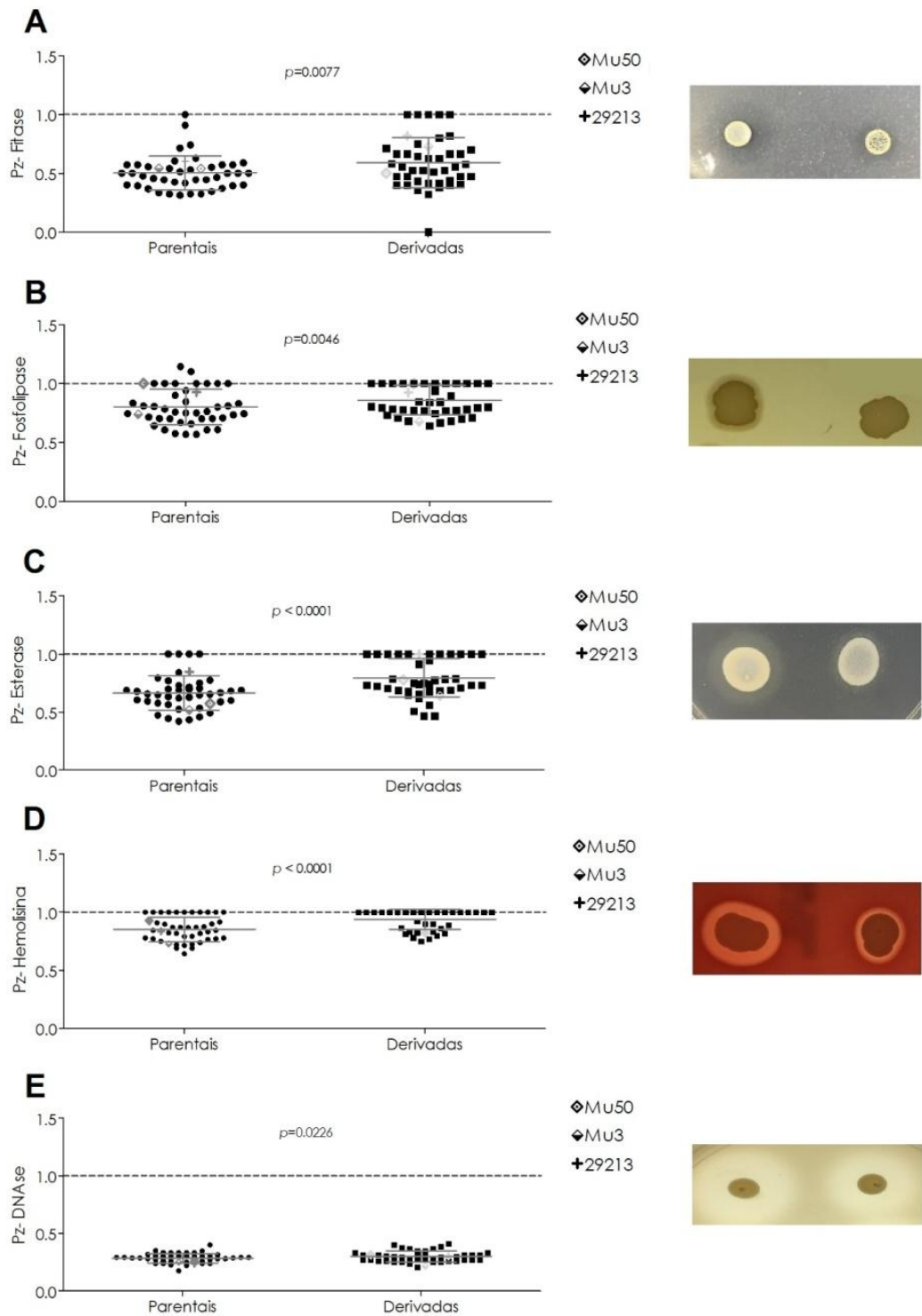


Figura 16 - Produção de cinco enzimas hidrolíticas nas amostras de *S. aureus* parentais (n=41), amostras padrão ATCC 29213, Mu50, Mu3 e suas respectivas derivadas. Inicialmente, as amostras de *S. aureus* parentais foram cultivadas na ausência de vancomicina e suas derivadas na presença de vancomicina (metade da concentração a qual a amostra foi isolada) e incubadas por 24 horas a 37 °C sob agitação. Após o período de incubação, realizou-se a inoculação puntiforme no centro da placa de Petri com meio sólido contendo substrato necessário para a avaliação da atividade de fitase (A), fosfolipase (B), esterase (C), hemolisina (D) e DNase (E). Em seguida, as placas foram incubadas por 48 horas e a atividade enzimática foi evidenciada através da formação de halo de degradação ao redor da colônia. Os resultados foram expressos por Pz: razão entre o diâmetro da colônia e diâmetro do halo. Quanto menor for o Pz maior a atividade enzimática. Teste T pareado ( $p < 0.05$ ).

#### 5.4.5 Avaliação da viabilidade metabólica

As amostras parentais e derivadas estavam metabolicamente viáveis na  $DO_{630} = 1$ , não havendo diferença estatística entre as mesmas ( $p=0.0580$ ) (Figura 17).

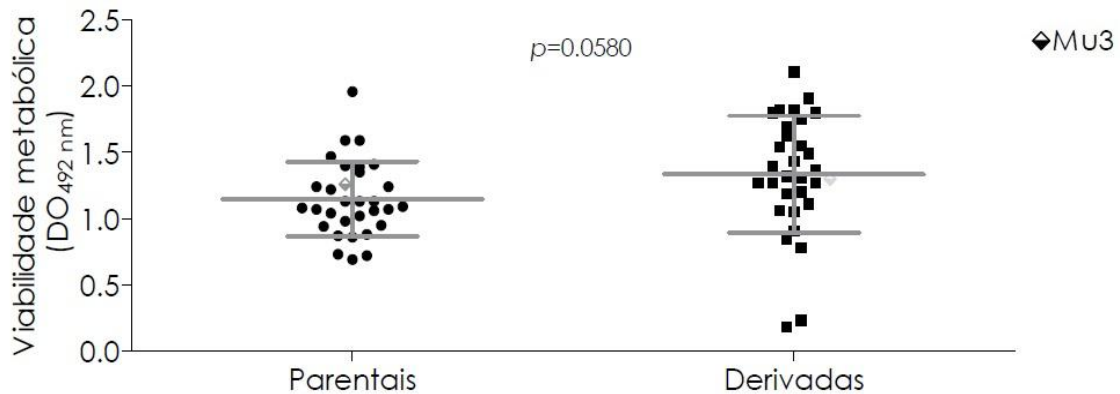


Figura 17 - Efeito do pré-tratamento com vancomicina sobre a viabilidade das células bacterianas de 30 amostras parentais e suas derivadas. A viabilidade foi medida pela redução do XTT. O teste estatístico utilizado foi o teste T pareado utilizando  $p < 0.05$ . Controle: Mu3.

#### 5.4.6 Análise do grau de virulência em modelo invertebrado com *Galleria mellonella*

No teste de sobrevivência entre as amostras 23 (MSSA) e 23V16, a amostra derivada apresentou maior taxa de sobrevivência e estatisticamente significativa do que a amostra parental na concentração de  $10^6$  UCF/mL ( $p < 0.001$ ). Na concentração de  $10^5$  UFC/mL apesar da amostra derivada ter apresentado maior taxa de sobrevivência das larvas de *G. mellonella* do que a amostra parental, não foi observada diferença na taxa de sobrevivência entre a amostra parental e derivada ( $p=0.278$ ) (Figura 18).

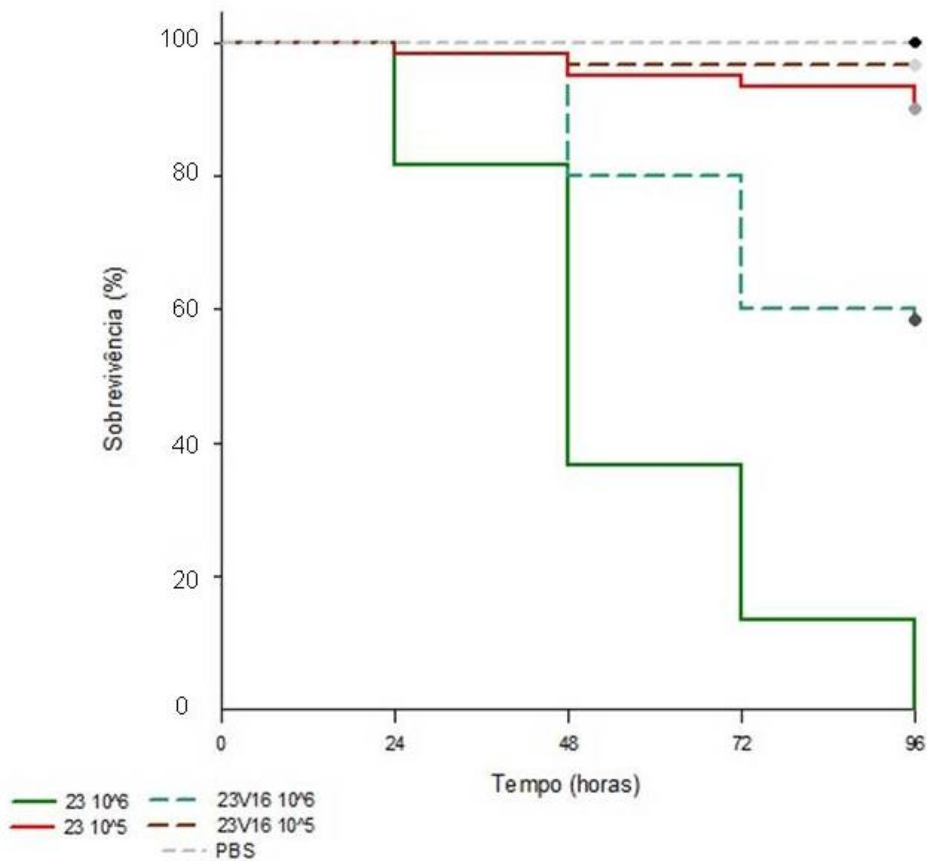


Figura 18 - Curva de sobrevivência de larvas de *G. mellonella* infectadas com as amostras 23 e 23V16 nas concentrações de  $10^6$  e  $10^5$  UFC/mL durante 96 horas. Foram realizadas três repetições biológicas utilizando 20 larvas em cada repetição. O gráfico foi gerado com os dados de 60 larvas por amostra em cada uma das concentrações bacterianas testadas. Utilizou-se o método estatístico Kaplan-Meier comparado através do teste Log rank, considerando  $p < 0.001$ .

A taxa de sobrevivência das larvas de *G. mellonella* foi maior no desafio com a amostra parental 28 (MRSA) com inóculo de  $10^5$  UFC/mL ( $p=0.0167$ ). Com inóculo de  $10^6$  UFC/mL não houve diferença na taxa de sobrevivência entre as amostras parentais e derivadas ( $p=0.0708$ ) (Figura 19).

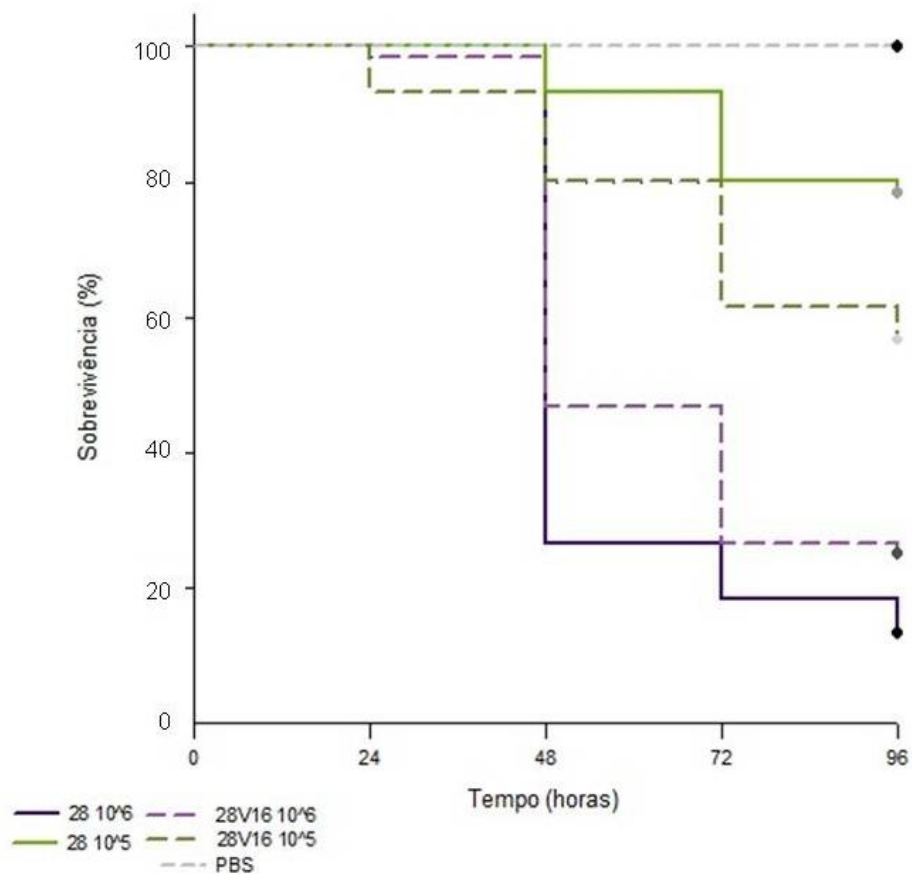


Figura 19 - Curva de sobrevivência de larvas de *G. mellonella* infectadas com as amostras 28 e 28V16 nas concentrações de  $10^6$  e  $10^5$  UFC/mL durante 96 horas. Foram realizadas três repetições biológicas utilizando 20 larvas em cada repetição. O gráfico foi gerado com os dados de 60 larvas por amostra em cada uma das concentrações bacterianas testadas. O método estatístico utilizado foi o Kaplan-Meier comparado através do teste Log rank, considerando  $p < 0.001$ .

A taxa de sobrevivência das larvas de *G. mellonella* infectadas com a amostra 99 (MSSA) foi menor e estatisticamente significativa do que as larvas infectadas com a amostra derivada 99V16 nas duas concentrações bacterianas testadas ( $10^6$  e  $10^5$  UFC/mL,  $p=0.000484$  e  $p=0.00674$ , respectivamente) (Figura 20).

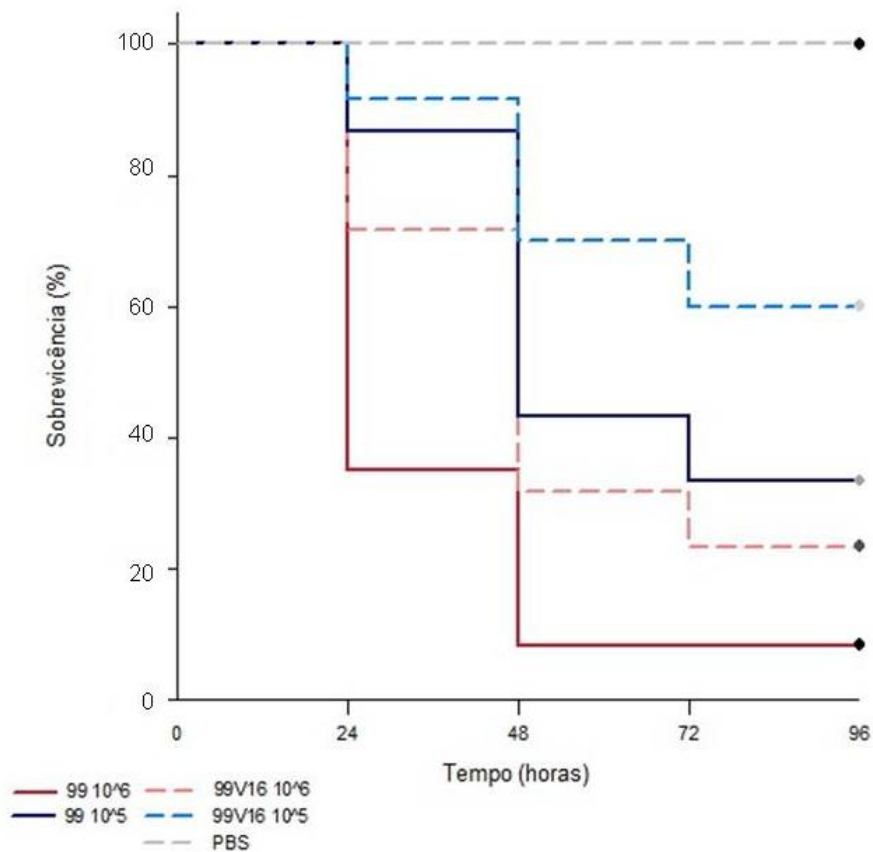


Figura 20 - Curva de sobrevivência de larvas de *G. mellonella* infectadas com as amostras 99 e 99V16 nas concentrações de  $10^6$  e  $10^5$  UFC/mL durante 96 horas. Foram realizadas três repetições biológicas utilizando 20 larvas em cada repetição. O gráfico foi gerado com os dados de 60 larvas por amostra em cada uma das concentrações bacterianas testadas. O método estatístico utilizado foi o Kaplan-Meier comparado através do teste Log rank, considerando  $p < 0.001$ .

Entre as amostras 127 (MRSA) e 127V16 a taxa de sobrevivência das larvas de *G. mellonella* foi maior na amostra parental com  $p$  não significativo nas duas concentrações testadas  $10^6$  e  $10^5$  UCF/mL ( $p=0,212$  e  $p=0,948$ , respectivamente) (Figura 21).



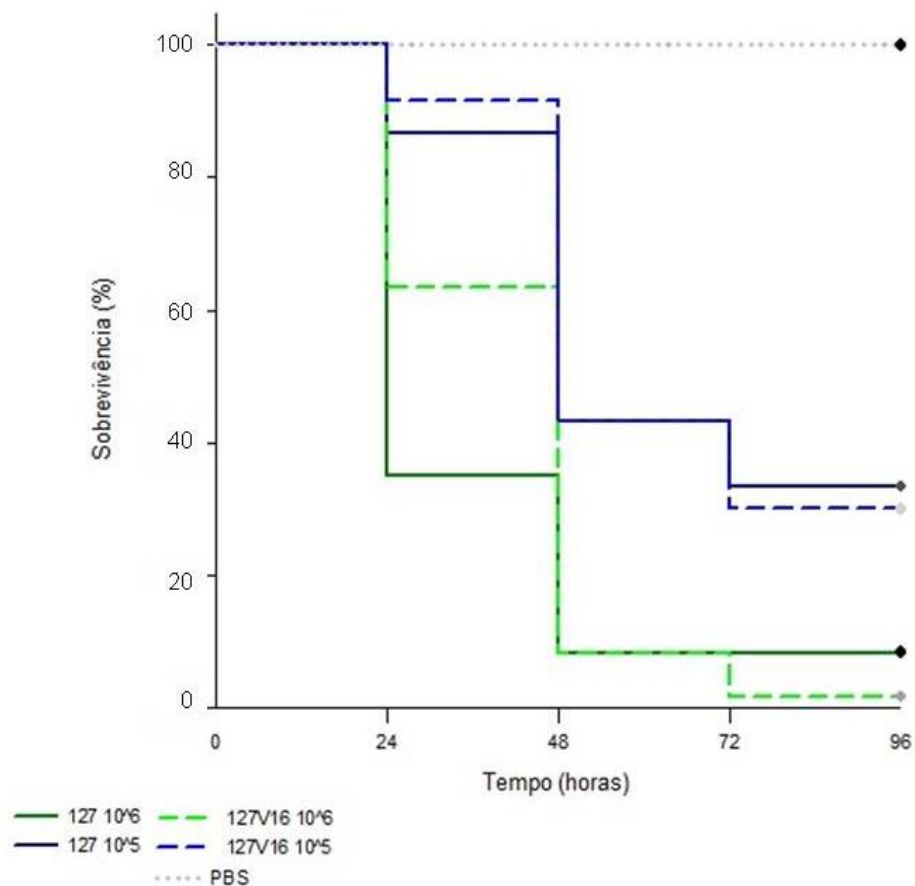


Figura 21 - Curva de sobrevivência de larvas de *G. mellonella* infectadas com as amostras 127 e 127V16 nas concentrações de  $10^6$  e  $10^5$  UFC/mL durante 96 horas. Foram realizadas três repetições biológicas utilizando 20 larvas em cada repetição. O gráfico foi gerado com os dados de 60 larvas por amostra em cada uma das concentrações bacterianas testadas. Teste estatístico Kaplan-Meier comparado através do teste Log rank, considerando  $p < 0.001$ .

Quando analisamos a virulência das quatro amostras derivadas incluídas nesse teste, de forma geral, podemos observar que as amostras 23 e 99 apresentaram diminuição da virulência, entretanto a amostra 28 apesar de ter diminuído a produção de alguns fatores de virulência no teste *in vivo* esta amostra apresentou aumento da virulência, indicando que a patogenicidade das amostras derivadas parece ser estirpe dependente (Tabela 4). Todos os resultados das 41 amostras parentais e suas respectivas derivadas podem ser observados no anexo A.

Tabela 4 - Perfil geral das quatro amostras derivadas V16 incluídas no teste *in vivo*.

Derivadas	CMI	Autólise	Biofilme	$\Delta$ hemolisina	Fitase	Fosfolipase	Esterase	Hemolisina	Dnase	<i>G.</i> <i>mellonella</i>
23	=	↑	↓	=	↓	=	↓	=	=	↓
28	↑	↓	=	↓	↓	↓	↓	↓	=	↑
99	↑	↓	↓	↓	=	=	↓	↓	=	↓
127	↑	↓	=	↓	=	↑	↑	↓	=	↑*

\* sem significância estatística.

## 6 DISCUSSÃO

*S. aureus* é um dos patógenos mais recorrentes em infecções da corrente sanguínea em pacientes sob tratamento hemodialítico e bacteremia é a infecção mais comum e letal (ECDC, 2012). A vancomicina é o antimicrobiano padrão para tratamento empírico e definitivo contra infecções, principalmente bacteremia, por cocos Gram positivos como *S. aureus* em pacientes hemodialíticos (ALLON et al. 2007; RYBAK et al. 2009; TAYLOR et al. 2010). Com a emergência de isolados com suscetibilidade reduzida à vancomicina em todo o mundo e, a relação entre a diminuição da suscetibilidade à vancomicina e maus desfechos se faz necessária uma melhor compreensão dos mecanismos que regem este fenômeno em *S. aureus* (PARK et al. 2013; BRITT et al. 2016). Neste contexto, os testes de suscetibilidade são essenciais para prever a suscetibilidade do microrganismo.

Em nosso estudo, observamos que das 41 amostras apenas 22% albergava o gene *mecA*. Em um estudo de vigilância em centros de diálise da Austrália, foi demonstrado que *S. aureus* foi o patógeno mais frequentemente isolado de infecções da corrente sanguínea em pacientes hemodialíticos, em 33% dos casos, seguido por SCoN (28%) e *Escherichia coli* (8%) (WORTH et al. 2017). A prevalência de isolados MRSA nesse estudo foi de 14% (WORTH et al. 2017). Em estudo de vigilância de centros de diálise realizado pelo CDC no ano de 2014, *S. aureus* também foi o microrganismo que mais causou infecções da corrente sanguínea (31%) e infecções da corrente sanguínea associadas ao acesso (32%) em paciente hemodialíticos, seguido de *S. epidermidis* acometendo 15% e 16%, respectivamente, além de outros SCoN, *E. faecalis*, Gram-negativos e outros patógenos (NGUYEN et al. 2017). Entretanto, neste estudo o número de isolados MRSA foi de 40% (NGUYEN et al. 2017). Outra análise em centros de diálise da China demonstrou que entre os microrganismos isolados do sangue dos pacientes, *S. aureus* foi o mais frequente (38%), seguido de SCoN (14%) e das estirpes de *S. aureus*, somente 18% eram MRSA (ZHANG et al. 2017). Esses estudos demonstram que *S. aureus* é o patógeno mais constante relacionado a infecções da corrente sanguínea em pacientes hemodialíticos e a prevalência de estirpes MSSA ainda é maior do que a de MRSA nesse grupo.

A vancomicina é a primeira escolha para terapia de infecções em pacientes hemodialíticos na maioria dos centros de diálise, inclusive nas UAACN onde as amostras do presente estudo foram isoladas, contra cocos Gram-positivos, entre

eles, os resistentes à meticilina (Food and Drug Administration, 2018). A farmacocinética da vancomicina é complexa e a distribuição tecidual e ligação de proteínas ao fármaco tendem a alterar a sua atividade clínica (MATZKE et al. 1986; KIEM et al. 2008; STEIN et al. 2010). A vancomicina embora seja distribuída na maioria dos sítios corporais humanos, possui penetração baixa em diversos tecidos e dependente do nível de inflamação tecidual. Esse fármaco se liga a proteínas, em especial, à imunoglobulina A e albumina (SUN et al. 1993; STEIN et al. 2010). O grau de ligação a proteínas pela vancomicina tem sido relatado como variado, entre 50 a 55% dos relatos (ACKERMAN et al. 1988; ALBRECHT et al. 1991; RYBAK et al. 2009). LAPLANTE e RYBAK (2004) demonstraram em ensaio *in vitro* aumento da CMI de vancomicina de 1 para 4, na presença de albumina, em amostra MSSA. Recentes pesquisas demonstraram que a prevalência de estirpes SCoN isoladas de infecções da corrente sanguínea com resistência à meticilina varia de 70 até 90% (WU et al. 2015; HENTZIEN et al. 2017). Vancomicina é o antimicrobiano de primeira linha contra SCoN resistentes à meticilina em infecções da corrente sanguínea relacionadas a cateter (MERMEL et al. 2009). Portanto, apesar de algumas limitações como efeito bactericida relativamente lento, baixa penetração tecidual e potencial para toxicidade, a vancomicina continua sendo considerada o padrão ouro no tratamento de infecções por *Staphylococcus* spp., em especial os resistentes à meticilina, devido a seu baixo custo e resposta clínica estabelecida (MERMEL et al. 2009; RYBAK et al. 2009; van HAL et al. 2013).

Entre as 41 amostras do presente estudo, foram encontrados 24 pulsotipos diferentes. Ao longo dos anos têm sido demonstrados haver uma prevalência de estirpes MSSA com grande variedade clonal em infecções da corrente sanguínea, enquanto que isolados MRSA apresentam menor diversidade clonal, indicando que infecções geradas por estirpes MRSA são resultado de uma expansão clone-específica. Numa análise de RASMUSSEN e colaboradores (2014), estirpes de *S. aureus* de bacteremia das décadas de 1980 até 2010 foram coletadas e nenhuma estirpe MRSA foi isolada na Suécia no período de 30 anos. Foi encontrada grande variedade clonal entre as estirpes MSSA nesse estudo (RASMUSSEN et al. 2014). Outros trabalhos também demonstraram uma maior variedade clonal entre as estirpes MSSA do que MRSA (MIKO et al. 2013; TAVARES et al. 2014). No estudo de AAMOT e colaboradores (2012), 353 estirpes de *S. aureus* isoladas de infecção da corrente sanguínea no período de cinco anos foram investigadas e, além da

prevalência de estirpes MRSA ter sido baixa (0.8%), as MSSA apresentaram alta variedade clonal, o que parece indicar que quase qualquer estirpe de *S. aureus* pode ser responsável por infecções invasivas. Outro indício de que bacteremias por *S. aureus* não são essencialmente clone-específico é de que em aproximadamente 80% das estirpes isoladas do sangue e das narinas do paciente são idênticas, demonstrando que a fonte da bacteremia foi endógena (von EIFF et al. 2001; LAHEY et al. 2009). Além das narinas, *S. aureus* também coloniza a pele dos humanos e devido sua gama de fatores de virulência consegue invadir tecidos estéreis e causar infecção no hospedeiro (MORAN et al. 2013; KOZIEL et al. 2013). O acesso vascular nos pacientes hemodialíticos é um importante fator de risco para infecções nessa população (VANHOLDER et al. 1993) pois, quebra a barreira cutânea e os microrganismos conseguem invadir a corrente sanguínea do paciente, seja pelo contato direto entre a microbiota cutânea do paciente e a superfície do cateter ou através da transmissão de microrganismos através do contato de mãos contaminadas no cateter, gerando contaminação da superfície interna destes (WEIJMER et al. 2004; HENRICH et al. 2011). O risco de infecção aumenta com a permanência do cateter (WEIJMER et al. 2004).

Todas as estirpes derivadas cresceram em altas concentrações de vancomicina, demonstrando que a capacidade de sobrevivência sob pressão seletiva pela vancomicina não está relacionada à apenas um clone específico sendo variada entre estirpes MSSA e MRSA (da COSTA et al. 2016; SINGH et al. 2017). No trabalho de SINGH e colaboradores (2017) a estirpe sensível à metilicina *S. aureus* ATCC 6538P (FDA209P), a qual foi isolada em 1948 (considera-se que a amostra nunca tenha sido exposta a nenhum antimicrobiano antes do seu isolamento), passou por pressão seletiva com a mesma concentração de vancomicina que a CMI da amostra para esse fármaco e três amostras derivadas foram isoladas desse experimento. Além disso, as derivadas apresentaram mecanismo de tolerância (crescimento lento) à vancomicina sem aumento da CMI nessas amostras. No estudo de NUNES e colaboradores (2006) estirpes de *S. haemolyticus*, *S. epidermidis* e *S. warneri* passaram por pressão seletiva em BHIA contendo 4 ou 6 µg/mL de vancomicina e mantiveram a CMI na faixa de sensibilidade para esse fármaco. Porém, apresentaram heterogeneidade amostral, subpopulações capazes de crescerem em até 12 µg/mL de vancomicina foram isoladas das amostras que passaram pela pressão seletiva e essas subpopulações

apresentaram aumento na CMI para vancomicina. YAMAKAWA e colaboradores (2012) analisaram 750 amostras MRSA isoladas na década de 1990 no Japão, antes da introdução do uso clínico dos glicopeptídeos no país. Cinco por cento dessas amostras eram hVISA, indicando que esse fenótipo foi resultado a exposição aos  $\beta$ -lactâmicos, entretanto, nenhuma amostra VISA foi isolada nesse estudo, o que sugere que os  $\beta$ -lactâmicos geram estirpes hVISA, porém, estirpes VISA só são selecionadas através da exposição direta à vancomicina (CUI et al. 2009). Glicopeptídeos como a vancomicina são utilizados principalmente contra *Staphylococcus* resistentes à metilina e a característica de suscetibilidade reduzida à vancomicina já foi demonstrada em diversas espécies do gênero *Staphylococcus* o que sugere que a suscetibilidade reduzida à vancomicina por estas estirpes é uma capacidade adaptativa do gênero como um todo e não apenas de algumas espécies (LAPLANTE et al. 2004; NAKIPOGLU et al. 2005; NUNES et al. 2006; NUNES et al. 2007; MA et al. 2011; TEVELL et al. 2013; HU et al. 2013). Além disso, já foi demonstrado que no caso de *S. aureus* essa habilidade é independente da resistência à metilina, apesar de ser induzida também pelos  $\beta$ -lactâmicos (DHAND et al. 2012; YAMAKAWA et al. 2012; FALCÓN et al. 2016).

Em nosso estudo, 41 isolados de *S. aureus* provenientes de bacteremia sofreram pressão seletiva pela vancomicina e todos os isolados foram capazes de crescerem em concentrações a partir de 4  $\mu\text{g/mL}$  até a concentração máxima de 16  $\mu\text{g/mL}$  de vancomicina. Resultados similares de isolamento de amostras obtidas a partir de ensaios de pressão seletiva foram obtidos em outras pesquisas (DAUM et al. 1992; SIERADZKI et al. 2003; SIERADZKI et al. 2006; LENHARD et al. 2015; WANG et al. 2016; SINGH et al. 2017).

Apesar de crescerem em concentrações até 32 vezes maiores que a CMI de vancomicina e apresentarem um aumento, de até três diluições, na CMI de vancomicina em 56% das amostras derivadas, nenhuma mudou de classificação de VSSA para VISA. Dados parecidos com os nosso foram encontrados também em outros estudos (LENHARD et al. 2015; SINGH et al. 2017; WANG et al. 2017). Este comportamento é característico de cepas tolerantes. A tolerância é a capacidade de uma bactéria permanecer viva em uma exposição a um antimicrobiano (bactericida), mesmo em concentrações elevadas do fármaco (KESTER et al. 2014; BRAUNER et al. 2016; LI et al. 2017). Estirpes com a mesma CMI podem ser tolerantes ou não a um antimicrobiano. Para atingir o mesmo nível de morte celular que uma bactéria

suscetível, se faz necessária maior tempo de exposição ao antimicrobiano em uma estirpe tolerante (BRAUNER et al. 2016; LI et al. 2017). Os mecanismos da tolerância ainda não são totalmente elucidados, porém, são de extrema importância, pois a tolerância bacteriana pode causar falha no tratamento antimicrobiano e evolução para resistência (COLLIGNON, 2002; LEE et al. 2010; LEWIS, 2010; TOPRAK et al. 2012). O MDK geralmente é obtido através de curva tempo-morte e é a medida quantitativa sugerida para mensurar tolerância de alguma estirpe (BRAUNER et al. 2016; LI et al. 2017). O MDK tem como definição o tempo de tratamento com antimicrobiano indispensável para matar uma porção definida da população bacteriana em uma concentração que ultrapasse a CMI da amostra (BRAUNER et al. 2016; LI et al. 2017). Assim como a CMI é utilizada para mensurar o nível de suscetibilidade, o MDK pode ser utilizado para mensurar o nível de tolerância (FRIDMAN et al. 2014).

Existem dois tipos de tolerância: por *lag*, na qual o microrganismo apresenta uma longa fase *lag* e por crescimento lento, característica de microrganismos com longo tempo de geração. Esta última já foi observada em diversos microrganismos, frente à diferentes antimicrobianos, inclusive os que inibem a síntese da parede celular, como a vancomicina (HANDWERGER et al. 1985; ABRANCHES et al. 2009; DORR et al. 2015). Em nosso trabalho, foi demonstrado um crescimento mais lento das amostras V16 em relação as suas respectivas parentais na presença de 8 µg/mL de vancomicina, enquanto que na ausência da vancomicina as amostras V16 apresentaram curva de crescimento muito próxima da curva das suas respectivas amostras parentais. Posteriormente, analisamos a viabilidade metabólica dessas células na presença de 8 µg/mL de vancomicina e não houve alteração no metabolismo celular das mesmas, indicando que as estirpes sobreviveram sob a pressão pela vancomicina.

Estirpes tolerantes correspondem à uma subpopulação, geralmente menor que 1% da população total, o que dificulta sua detecção nos testes de CMI, que são realizados com um inóculo padrão baixo ( $10^5$  UFC/mL) (CLSI, 2017). Em nosso estudo, as amostras derivadas sofreram pressão seletiva com inóculo inicial de  $10^8$  UFC/mL, sendo, a cada 24 horas, transferidas para novo meio de cultura contendo o dobro da concentração de vancomicina, favorecendo a seleção desta subpopulação tolerante. Entretanto, para caracterizar, de fato, a tolerância destas amostras

derivadas é necessária a determinação do MDK, por meio da curva de morte, sendo esta uma das perspectivas futuras para este trabalho.

Apesar das amostras derivadas terem apresentado aumento na CMI de vancomicina em relação às parentais, nenhuma amostra apresentou alteração na suscetibilidade à vancomicina, sendo todas classificadas como VSSA. O aumento das CMIs apresentadas pelas derivadas está dentro dos parâmetros aceitos pelo CLSI (2017).

Admite-se que os resultados de testes de suscetibilidade variam em até uma diluição (SWENSON et al. 2009; RYBAK et al. 2013). Entretanto, uma diluição diferente na CMI pode alterar substancialmente a área sob a curva de concentração / concentração mínima inibitória (AUC/MIC do inglês, *Area Under the Curve / Minimum Inhibitory Concentration*) e, conseqüentemente, a habilidade de otimizar o tratamento e gerar cura terapêutica (SORIANO et al. 2008). Portanto, se a variação na CMI em apenas uma diluição é relevante para prever o desfecho clínico em infecções por *S. aureus*, a escolha do método de determinação da CMI é crucial (PRAKASH et al. 2008). As metodologias de diluição, seja em meio sólido (diluição em ágar) ou em caldo (macro ou microdiluição) são as mais recomendadas para determinação dos valores da CMI, pois possibilitam estimar a concentração do antimicrobiano testado, além de proporcionar uma medição quantitativa da atividade antimicrobiana *in vitro* contra os mais diversos microrganismos (BALOUIRI et al. 2016). Como a CMI pode variar de acordo com o método utilizado (ZHU et al. 2012) e infecções causadas por isolados de *S. aureus* que apresentam CMI para vancomicina  $\geq 1.5 \mu\text{g/mL}$  (*MIC creep*) são constantemente associados a recorrência, aumento da mortalidade, de tempo de hospitalização, falha terapêutica, além de possível presença de isolados hVISA, a precisão destes métodos possui importância clínica (TENOVER et al. 2007; van HAL et al. 2012). É importante ressaltar que a maioria desses estudos utilizaram Etest para determinar a CMI das estirpes (NAVARINI et al. 2015). Os métodos para detecção da CMI de vancomicina não automatizados recomendados pelo CDC são a microdiluição em caldo, diluição em ágar e gradiente de concentração em fita, como o Etest (CDC, 2017). Devido o tamanho do inóculo utilizado, os testes de microdiluição em caldo do CLSI e alguns ensaios automatizados como Phoenix e Vitek tendem a subestimar a CMI (inóculo de  $10^5$  UFC/mL), enquanto, Etest e MicroScan superestimam (inóculo de  $10^8$  UFC/mL) (RYBAK et al. 2013). Apesar de ser controversa a real extensão do *MIC*



*creep* (SADER et al. 2009) e as implicações clínicas desses variados níveis de CMI (HOLMES et al. 2011; van HAL et al. 2012; ROJAS et al. 2012; HOLMES et al. 2013), especialistas têm considerado utilizar a CMI de vancomicina, além dos parâmetros clínicos, também como um parâmetro adicional para orientar a terapia antimicrobiana (HUMPHRIES et al. 2012). Entretanto, a CMI não foi capaz de prever a capacidade de sobrevivência e adaptabilidade das amostras derivadas a variadas concentrações de vancomicina. As derivadas foram capazes de sobreviverem, pelo mesmo período de tempo que o teste de microdiluição (24 horas), em concentrações muito acima da CMI das amostras parentais, porém a CMI não foi significativamente alterada, demonstrando falha na técnica.

A detecção laboratorial de estirpes de *S. aureus* com suscetibilidade reduzida à vancomicina tem sido recomendada para auxiliar os clínicos na escolha precisa da terapia com antimicrobianos (NAVARINI et al. 2015). As metodologias de referência para testes de suscetibilidade, como microdiluição de caldo, diluição em ágar e Etest, não são capazes de detectar estirpes hVISA, em parte devido ao pequeno inóculo ( $10^5$  UFC/mL), em parte porque em Mueller Hinton o crescimento é menor, por ser um meio pobre de glicose e fosfato, ou uma combinação de ambos (HOEPRICH et al. 1971; WALSH et al. 2001; SATOLA et al. 2011). O tamanho do inóculo é fundamental para a detecção de subpopulação com suscetibilidade reduzida já que essas estirpes se apresentam 1 em  $10^6$  células (HIRAMATSU, 1998; RYBAK et al. 2001; SATOLA et al. 2011). Diversas técnicas podem ser utilizadas com esse objetivo, porém, a análise do perfil populacional (PAP do inglês, *Population Analysis Profile*) sob a área sobre a curva (PAP / AUC) é o padrão ouro na detecção de estirpes hVISA, no entanto, essa técnica é demorada e trabalhosa, além de se fazer necessária a utilização de muitos materiais (meio de cultura e antimicrobiano) para ser realizada e ter pessoal treinado para reproduzi-la, sendo então, complexa para ser implementada na rotina laboratorial (SATOLA et al. 2011). Metodologias alternativas ao PAP / AUC vêm sendo elaboradas e testadas ao longo dos anos como o teste recomendado pelo CDC em BHI agar contendo 6 µg/mL de vancomicina (inóculo  $10^6$  UFC/mL) (CDC, 2017), o macroEtest em BHI agar (inóculo de 2 da escala de McFarland,  $\sim 6 \times 10^8$  UFC/mL) (SATOLA et al. 2011), BHI agar suplementado com caseína contendo 4 µg/mL de vancomicina (inóculos de 0.5 da escala de McFarland,  $\sim 1.5 \times 10^8$  UFC/mL e 2) (SATOLA et al. 2011) e BHI agar com

3 e 4 µg/mL de vancomicina (inóculo de 0.5 da escala de McFarland) (KHATIB et al. 2015).

A composição principal do BHI são as peptonas, infusões de coração e cérebro e glicose. As peptonas e as infusões são fontes de nitrogênio orgânico, carbono, enxofre, vitaminas e substâncias pequenas. A glicose é a fonte de hidratos de carbono que os microrganismos utilizam na fermentação. Enquanto que o meio Mueller Hinton é composto por extrato de carne, ácido hidrolisado de caseína e amido, basicamente. O ácido hidrolisado de caseína e extrato de carne fornecem aminoácidos, nitrogênio, minerais, vitaminas, carbono e outros nutrientes que suportam o crescimento de microrganismos. O amido atua como substância protetora contra moléculas tóxicas que podem estar presentes no meio. A hidrólise do amido durante a autoclavagem fornece uma pequena quantidade de glicose. A concentração de glicose no meio BHI é muito maior que no Mueller Hinton (HOEPRICH et al. 1971) o que possibilita maior crescimento bacteriano no BHI, já que as bactérias utilizam a glicose como fonte de energia (MURRAY et al. 2009). A tolerância por crescimento longo pode ser induzida pela adição de antimicrobianos na fase estacionária do crescimento bacteriano, fase a qual a taxa de crescimento populacional é quase zero, porém as condições são promissórias para haver equilíbrio entre o crescimento e morte de células (DORR et al. 2010; JOHNSON et al. 2013; GEFEN et al. 2014). O que provavelmente ocorreu nas amostras derivadas, já que elas foram adicionadas a novo meio depois de 24 horas de crescimento. Como o meio padrão para o teste de suscetibilidade é o Mueller Hinton e as derivadas foram isoladas em BHI, esse último, favorecendo o surgimento de células tolerantes, a CMI no caldo Mueller Hinton não representou a capacidade da amostra de tolerar altas concentrações de vancomicina talvez porque o meio não favorece tanto o crescimento bacteriano quanto o BHI.

O entendimento da farmacodinâmica da vancomicina é de extrema importância, pois o regime de dosagem é intimamente ligado ao desenvolvimento de estirpes com suscetibilidade reduzida (RYBAK, 2006). A concentração de vancomicina deve ser mantida sempre acima de 10 µg/mL no plasma do paciente para evitar o surgimento de estirpes resistentes. No caso de infecções complicadas como bacteremia, meningite, endocardite, pneumonia nosocomial e osteomielite, e para estirpes de *S. aureus* que apresentam CMI para vancomicina > 1 µg/mL a recomendação é que a concentração sérica mínima (CSM) esteja entre 15 e 20

$\mu\text{g/mL}$  de vancomicina (RYBAK et al. 2009; MATSUMOTO et al. 2013). O alcance da  $\text{AUC/MIC} \geq 400$  é atualmente recomendado para obter cura clínica contra *S. aureus* (RYBAK, 2006; RYBAK et al. 2009; ÁLVAREZ et al. 2016).

Em nosso estudo cerca de 22% das estirpes parentais apresentaram CMI de 1.5 e 2  $\mu\text{g/mL}$  para vancomicina, enquanto que nas amostras derivadas esse valor subiu para 73% dos isolados. O protocolo de administração de vancomicina utilizado nas UAACN da Grande Vitória-ES, local o qual as estirpes de bacteremia de *S. aureus* do nosso estudo foram isoladas, é o mesmo adotado em diversas clínicas de hemodiálise e hospitais do Brasil, sendo recomendada uma dose terapêutica de 1 g de vancomicina a cada 4 ou 5 dias (MARENGO et al. 2009). Segundo PAI e colaboradores (2014) a probabilidade de se atingir  $\text{AUC/CMI} > 400$  em estirpe com  $\text{CMI} = 1 \mu\text{g/mL}$  de vancomicina administrando 1 g de vancomicina a cada 24 horas é de quase 100%. Este valor cai para menos de 10% quando a CMI do isolado é igual a 2  $\mu\text{g/mL}$  de vancomicina. No estudo de VITÓRIA (2015), o qual, o autor isolou as amostras utilizadas também em nosso estudo, foram pesquisadas as concentrações séricas de vancomicina nos pacientes antes da próxima dose do fármaco e 90% apresentaram concentrações séricas inferiores a 10  $\mu\text{g/mL}$ . Entretanto, apenas 17% dos pacientes deste estudo evidenciaram falha terapêutica por vancomicina. Apesar de recomendada a CSM de 15 a 20  $\mu\text{g/mL}$  de vancomicina, existem autores que discordam da correlação destes valores com a resposta clínica (LODISE et al. 2008; CLEMENS et al. 2011; NEELY et al. 2014; CHOO et al. 2016).

Os fatores de virulência de *S. aureus* são essenciais para o estabelecimento de infecção em seu hospedeiro. *S. aureus* possui uma gama de toxinas, adesinas, enzimas, além de cápsula e proteínas de superfície as quais, permitem que este patógeno sobreviva em condições extremas, além de possibilitá-lo de se espalhar através dos tecidos (FRIERI et al. 2017). Diversos sistemas reguladores são responsáveis por coordenar a expressão e secreção deste conjunto de fatores de virulência, porém, o principal regulador em *S. aureus* é o gene *agr* (ABDELNOUR et al. 1993; PELEG et al. 2009). O gene *agr* está relacionado com o desenvolvimento de hVISA e VISA sob terapia com vancomicina, regulação positiva da expressão de toxinas e negativa da síntese de proteínas de superfície e adesinas, bem como sua disfunção é comumente observada tanto em isolados clínicos quanto os que sofreram pressão seletiva com vancomicina *in vitro* (ABDELNOUR et al. 1993; NOVICK et al. 1993; FUJIMOTO et al. 1998; SAKOULAS et al. 2002; SAKOULAS et

al. 2003; HOWDEN et al. 2006). Independentemente do valor do gene *agr* nas infecções, amostras de *S. aureus* provenientes de bacteremia com a disfunção do gene *agr* foram isoladas em 3 a 82% dos casos (FOWLER et al. 2004; TRABER et al. 2008; VIEDMA et al. 2014). A  $\delta$ -hemolisina é utilizada como marcador fenotípico da atividade de *agr*. Estudos demonstram que amostras GISA (do inglês, *Glycopeptide Intermediate-level resistant S. aureus*), Mu50 e tratadas com tigeciclina (glicopeptídeo), não produzem  $\delta$ -hemolisina enquanto que amostras VSSA e Mu3 a produzem forte e fracamente, respectivamente (SAKOULAS et al. 2002; CAFISO et al. 2012; HERRERA et al. 2016), indicando que o tratamento com glicopeptídeos em geral, diminui a produção de  $\delta$ -hemolisina em *S. aureus*. Em nosso estudo, embora observamos uma tendência na diminuição da produção da  $\delta$ -hemolisina nas amostras derivadas, não houve diferença estatística na produção dessa hemolisina entre as amostras parentais e derivadas ( $p=0.1211$ ). Ou seja, exposição à vancomicina não alterou a atividade de *agr* nas amostras derivadas.

Em nosso estudo, foi observada uma diminuição da produção de biofilme pelas amostras derivadas ( $p=0.0079$ ). Estudos demonstraram haver diminuição da produção de biofilme em amostras hVISA e VISA e que a capacidade de produção é variável nessas estirpes (HOWDEN et al. 2006; MIRZAEI et al. 2015). Enquanto CHANG e colaboradores (2015) observaram o oposto, maior produção de biofilme em isolados tratados com vancomicina. De modo geral nossos resultados corroboram com a literatura, pois as estirpes derivadas apresentaram capacidade de produção de biofilme variada, porém diminuída em comparação com as parentais, demonstrando que a exposição à vancomicina em amostras de *S. aureus* isoladas de bacteremia diminui a produção de biofilme, apesar de não ter sido observada alteração na função do gene *agr* nessas amostras.

As enzimas hidrolíticas são fatores de virulência que favorecem a conversão de componentes dos tecidos do hospedeiro em nutrientes, auxiliando na invasão, crescimento e dispersão das bactérias para outros sítios (DINGUES et al. 2000; MEGHRNI et al. 2014). As fitases, por exemplo, concedem aos microrganismos a aquisição de fosfato e inositol do hospedeiro (MITCHELL et al. 1997; ASKELSON et al. 2014). As hemolisinas provocam a lise dos eritrócitos, liberando hemoglobina que é utilizado como fonte nutritiva para as células bacterianas se desenvolverem (HUSEBY et al. 2007). A  $\beta$ -hemolisina também atua na evasão do sistema imune do hospedeiro como inibidora da quimiotaxia dos neutrófilos para o local da lise dos

eritrócitos (FOSTER, 2005; HUSEBY et al. 2007; TAJIMA et al., 2009). Em nosso estudo, todas as enzimas hidrolíticas testadas apresentaram menor produção nas amostras derivadas ( $p < 0.05$ ), indicando diminuição da virulência destas amostras.

As larvas de *G. mellonella* são um ótimo modelo para se estudar fatores de virulência e patogênese dos microrganismos, pois possuem o sistema imunológico com alto grau de homologia funcional ao sistema imunológico inato dos vertebrados, além de sobreviverem em 37 °C (COOK et al. 2013). Estudos vêm demonstrando, em modelo *in vivo* com larvas de *G. mellonella*, que estirpes de *S. aureus* com disfunção do gene *agr* são menos virulentas que as amostras com o gene *agr* funcional, além disso, as amostras isoladas de bacteremias persistentes apresentam menor virulência do que estirpes de infecção resolvida, demonstrando que isolados persistentes possuem o gene *agr* desligado, o que gera uma menor virulência e consequentemente uma maior persistência ao tratamento com vancomicina (PELEG et al. 2009; RICHARDS et al. 2015; PÉREZ-MONTARELO et al. 2017). No estudo de PELEG e colaboradores (2009), foi demonstrado a existência de relação direta do aumento da CMI de vancomicina com a diminuição da virulência de *S. aureus* em modelo *in vivo* com *G. mellonella*. Quanto maior a CMI de vancomicina da estirpe derivada, menor morte das larvas de *G. mellonella* por esta estirpe e maior a diferença de morte larval entre a estirpe parental (VSSA) e derivada (VISA). PÉREZ-MONTARELO e colaboradores (2017) pesquisaram a sobrevivência das larvas de *G. mellonella* em amostras de *S. aureus* suscetíveis e resistentes à metilicina e observaram que as amostras MSSA mataram menos larvas do que as MRSA. Em nosso estudo, as amostras derivadas apresentaram incremento na CMI de vancomicina dentro da faixa de suscetibilidade, tendo os resultados do desafio com *G. mellonella* variado entre as amostras MSSA e MRSA, diminuindo e aumentando a virulência, respectivamente. Novos testes com maior número amostral seria interessante para testar se a suscetibilidade à metilicina está relacionada com a virulência das amostras derivadas ou se a virulência é independente da suscetibilidade sendo estirpe-específico, como acreditamos.

De modo geral, mostramos com este estudo que estirpes de *S. aureus*, obtidas a partir da exposição à elevadas concentrações de vancomicina, apresentam características de tolerância, mantendo a CMI dentro dos parâmetros de sensibilidade, mas apresentando lento crescimento na presença de elevadas concentrações do antimicrobiano. Além da seleção de estirpes tolerantes,

mostramos diminuição da produção de biofilme e de enzimas hidrolíticas. Entretanto, a virulência no modelo invertebrado variou conforme a estirpe testada, diminuindo ou aumentando. O fator de virulência adesão ao fibrinogênio e o marcador da atividade de *agr*,  $\delta$ -hemolisina, não foram alterados nestas amostras tolerantes. De forma que a definição das características de virulência destas amostras derivadas requer mais investigações.

## 7 CONCLUSÕES

- Todas as estirpes de *S. aureus* isoladas de bacteremia apresentaram suscetibilidade à vancomicina, sendo a maioria, também suscetível à meticilina e com alta variedade clonal.
- As estirpes de *S. aureus* derivadas apresentaram aumento da CMI, porém sem alteração da categoria interpretativa e apresentaram característica de tolerância à vancomicina, exibindo crescimento lento em concentração de vancomicina superior à CMI.
- A produção de biofilme e de enzimas hidrolíticas foi diminuída nas estirpes derivadas, sendo estes os únicos atributos de virulência afetados pela pressão seletiva com vancomicina. A virulência das estirpes derivadas no modelo de infecção em invertebrados pareceu ser estirpe-dependente, ocorrendo diminuição ou aumento da mortalidade de larvas de *G. mellonella* conforme estirpe.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAMOT, H. A; BLOMFELDT, A; ESKESENC, A. N. Genotyping of 353 *Staphylococcus aureus* bloodstream isolates collected between 2004 and 2009 at a Norwegian university hospital and potential associations with clinical parameters. **J. Clin. Microbiol.**, v. 50, p. 3111-3114, 2012.

ABAD, C. L; PULIA, M. S; SAFDAR, N. Does the nose know? An update on MRSA decolonization strategies. **Curr Infect Dis Rep.**, v. 15, p. 455-464, 2013.

ABRANCHES, J; MARTINEZ, A. R; KAJFASZ, J. K. et al. The molecular alarmone (p)ppGpp mediates stress responses, vancomycin tolerance, and virulence in *Enterococcus faecalis*. **J Bacteriol**, v. 191, p. 2248-2256, 2009.

ACKERMAN, B. H; TAYLOR, E. H; OLSEN, K. M. et al. Vancomycin serum protein binding determination by ultrafiltration. **Drug Intell Clin Pharm.**, v. 22, p. 300-3, 1988.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Boletim de segurança do paciente e qualidade em serviços de saúde nº 14**. Brasil, 2016, 83p.

ALBRECHT, L. M; RYBAK, M. J; WARBASSE, L. H. et al. Vancomycin protein binding in patients with infections caused by *Staphylococcus aureus*. **DICP.**, v. 25, p. 713-5, 1991.

ALBRECHT, M. V. S; ZERVOS, M. J; KAYE, K. S. et al. Prevalence of and risk factors for vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* precursor organisms in southeastern. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 35, p. 1531-1534, 2014.

de ALBUQUERQUE, S. E; CAVALCANTE, R. D; PONCE, D. et al. Epidemiology of healthcare-associated infections among patients from a hemodialysis unit in southeastern Brazil. **Braz J Infect Dis.**, v. 18, p. 327-30, 2014.



ALLON, M. Current management of vascular access. **Clin J Am Soc Nephrol.**, v. 2, p. 786-800, 2007.

AL-MEBAIRIKA, N. F; EL-KERSHA, T. A; AL-SHEIKHB, Y A. et al. A review of virulence factors, pathogenesis, and antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. **Reviews in Medical Microbiology**, v. 27, p. 50-56, 2016.

ÁLVAREZ, R; CORTÉS, L. E. L; MOLINA, J. et al. Optimizing the clinical use of vancomycin. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 60, p. 2601-2609, 2016.

ANDERSON, R. C. G. R; HIGGINS, H. M. JR; PETTINGA, C. D. Symposium: how a drug is born. **Cincinnati J Med**, v. 42, p. 49-60, 1961.

ARAÚJO, M. R. E. Hemocultura: recomendações de coleta, processamento e interpretação dos resultados. **J Infect Control.** v. 1, p. 08-19, 2012.

ARCHER, N. K; MAZAITIS, M. J; COSTERTON, J. W. et al. *Staphylococcus aureus* biofilms: properties, regulation, and roles in human disease. **Virulence**, v. 2, p. 445-459, 2011.

ARHIN, F. F; SARMIENTO, I; PARR, T. R. JR. et al. Activity of oritavancin and comparators in vitro against standard and high inocula of *Staphylococcus aureus*. **Int J Antimicrob Agents.**, v. 39, p. 159-62, 2012.

ASKELSON, T. E; CAMPASINO, A; LEE, J. T. et al. Evaluation of phytate-degrading *Lactobacillus* Culture administration to broiler chickens. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, p. 943-950, 2014.

BALABAN, N. Q; MERRIN, J; CHAIT, R. et al. Bacterial persistence as a phenotypic switch. **Science**, v. 305, p. 1622-1625, 2004.

BALOUIRI, M; SADIKI, M; IBNSOUDA, S. K. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 6, p. 71-79, 2016.

BANNERMAN, T. L. *Staphylococcus, Micrococcus* and other catalase-positive cocci that grow aerobically. In: Murray P. R.; Baron, E. J.; Jorgesen, J. H.; Pfaller, M.A.; Tenover, R. H. Manual of clinical microbiology, 8<sup>a</sup> ed. Washington (DC): ASM Press, v. 1, p. 384-404, 2003.

BANNERMAN, T. L. A; PEACOCK, S. J. *Staphylococcus, Micrococcus* and other catalase-positive cocci. In: Manual of Clinical Microbiology, Murray, P. R.; Baron, E. J.; Jorgensen, J. H., Landry, M. L. & Pfaller, M. A., 9<sup>a</sup> ed., ASM Press, Washington, D.C., v. 2, p. 390-411, 2007.

BARANYI, J. Stochastic modelling of bacterial lag phase. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 73, p. 203-206, 2002.

BATZILLA, C. F; RACHID, S; ENGELMANN, S. et al. Impact of the accessory gene regulatory system (Agr) on extracellular proteins, codY expression and amino acid metabolism in *Staphylococcus epidermidis*. **Proteomics**, v. 6, p. 3602-3613, 2006.

BATRA, R; COOPER, B. S; WHITELEY, C. et al. Efficacy and Limitation of a Chlorhexidine-Based Decolonization Strategy in Preventing Transmission of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in an Intensive Care Unit. **Clinical Infectious Diseases.**, v. 50, p. 210–7, 2010.

BAUMERT, N;C. von EIFF, F; SCHAAFF, G. et al. Physiology and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* small colony variants. **Microbial. Drug Resist.**, v. 8, p. 253-260, 2002.

BETJES, M. G. H. Prevention of catheter-related bloodstream infection in patients on hemodialysis. **Nat. Rev. Nephrol.**, v. 7, p. 257-265, 2011.

BI, C; DONG, X; ZHONG, X. et al. Acacetin protects mice from *Staphylococcus aureus* bloodstream infection by inhibiting the activity of sortase A. **Molecules**, v. 21, p. 1285-96, 2016.

van BELKUM, A; TASSIOS, P. T; DIJKSHOORN, L. et al. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 3, p. 01-46, 2007.

van BELKUM, A; MELLES, D. C; NOUWEN, J. et al. Co-evolutionary aspects of human colonization and infection by *Staphylococcus aureus*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, p. 32-47, 2009

van den BERGH, J; MICHIELS, E; WENSELEERS, T. et al. Frequency of antibiotic application drives rapid evolutionary adaptation of *Escherichia coli* persistence. **Nat. Microbiol.**, v. 1, p. 16020, 2016.

BERNIER, S. P; LEBEAUX, D; DEFRANCESCO, A. S. et al. Starvation, together with the SOS response, mediates high biofilm-specific tolerance to the fluoroquinolone ofloxacin. **PloS Genet.**, v. 9, p. e1003144, 2013.

BOGER, D. L. Vancomycin, teicoplanin, and ramoplanin: synthetic and mechanistic studies. **Med Res Rev**, v. 21, p. 356-81, 2001.

BRAUNER, A; FRIDMAN, O; GEFEN, O. et al. Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. **Nat Rev Microbiol.**, v. 14, p. 320-30, 2016.

BRITT, N. S; PATEL, N; SHIREMAN, T. I. et al. Relationship between vancomycin tolerance and clinical outcomes in *Staphylococcus aureus* bacteraemia. **J Antimicrob Chemother**, v. 72, p. 535-542, 2016.

BRONNER, S; MONTEIL, H; PREVOST, G. Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*: complexity and applications. **FEMS Microbiol Rev**, v. 28, p. 183-200, 2004.

BRUSLIND, L. **Microbiology**. 1ª edição. Open Oregon State, 2017.

BUKOWSKI, M; WLADYKA, B; DUBIN, G. Exfoliative toxins of *Staphylococcus aureus*. **Toxins (Basel)**, v. 2, p. 1148-1165, 2010.

BUTLER, M. S; HANSFORD, K. A; BLASKOVICH, M. A. T. et al. Glycopeptide antibiotics: Back to the future. **The Journal of Antibiotics**, v. 1, p. 1-14, 2014.

BUTTERFIELD, J. M; TSUJI, B. T; BROWN, J. et al. Predictors of *agr* dysfunction in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates among patients with MRSA bloodstream infections. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 55, p. 5433-5437, 2011.

CAFISO, V; BERTUCCIO, T; SPINA, D. et al. A novel delta- hemolysis screening method for detecting heteroresistant vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* and vancomycin-intermediate *S. aureus*. **J Clin Microbiol**, v. 50, p.1742-1744, 2012.

CAMERON, D. R; HOWDEN, B. P; PELEG, A. Y. The interface between antibiotic resistance and virulence in *Staphylococcus aureus* and its impact upon clinical outcomes. **Clin Infect Dis.**, v. 53, p. 576-82, 2011.

CASEY, A. L; WORTHINGTON, T; LAMBERT, P. A. et al. *Staphylococci*. **Int. J. Antimicrob. Agents.**, v. 29, p. 23-32, 2007.

CASSETTARI, V. C; STRABELLI, T; MEDEIROS, E. A. S. *Staphylococcus aureus* bacteremia: what is the impact of oxacillin resistance on mortality? **Braz J Infect Dis**, v. 9, p. 70-6, 2005.

CAVALCANTI, S; de FRANÇA, E. R; CABRAL, C. et al. Prevalence of *Staphylococcus aureus* introduced into intensive care units of a university hospital. **Braz J Infect Dis**, v. 9, p. 56- 63, 2005.

CHAN, K. E; LAZARUS, J. M; WINGARD, R. L. et al. Association between repeat hospitalization and early intervention in dialysis patients following hospital discharge. **Kidney Int.**, v. 76, p. 331-341, 2009.

CÁZARES-DOMÍNGUEZ, V; CRUZ-CÓRDOVA, A; OCHOA, S. A. et al. Vancomycin tolerant, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* reveals the effects of vancomycin on cell wall thickening. **PLoS ONE**, v. 10, p. e0118791, 2015.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Pyrogenic reactions and gram-negative bacteremia in patients in a hemodialysis center. Atlanta: US Department of Health and Human Services, CDC, Epidemic Investigation Report no. EPI, p 91-37. 1991. Bennett & Brachman's Hospital Infections. Philadelphia-USA. ed. Lippincott. 5ªed. 2007.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Laboratory Detection of Vancomycin-Intermediate / Resistant *Staphylococcus aureus* (VISA/VRSA). Disponível em: <[http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/ar\\_visavrsa\\_labFAQ.html#1](http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/ar_visavrsa_labFAQ.html#1)>. Acesso em: 14 fev. 2018.

CHAIEB, K; ZMANTAR, T; SOUIDEN, Y. et al. XTT assay for evaluating the effect of alcohols, hydrogen peroxide and benzalkonium chloride on biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. **Microb Pathog**, v. 50, p. 1-5, 2011.

CHAMBERS, H. F. Methicillin resistance in *Staphylococci*: molecular and biochemical basis and clinical implications. **Clin. Microbial. Rev.**, v. 10, p. 781-191, 1997.

CHANG, F. Y; MACDONALD, B. B; PEACOCK, J. E. JR. et al. A prospective multicenter study of *Staphylococcus aureus* bacteremia: incidence of endocarditis, risk factors for mortality, and clinical impact of methicillin resistance. **Medicine**, v. 82, p. 322-32, 2003.

CHANG, S. C; LIU, T. P; CHEN, C. J. et al. Detection of heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* isolates using a combination of  $\beta$ -hemolysis assay and Etest. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 81, p. 246-250, 2015.

CHENG, G; DAI, M; AHMED, S. et al. Antimicrobial drugs in fighting against antimicrobial resistance. **Front. Microbiol.**, v. 7, p. 470, 2016.

CHOO, E. J; CHAMBERS, H. F. Treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. **Infect Chemother**, v. 48, p. 267-273, 2016.

CLAEYS, K. C; ZASOWSKI, E. J; CASAPAO, A. M. et al. Daptomycin improves outcomes regardless of vancomycin MIC in a propensity-matched analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bloodstream infections. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 60, p. 5841-48, 2016.

CLEMENS, E. C; CHAN, J. D; LYNCH, J. B. et al. Relationships between vancomycin minimum inhibitory concentration, dosing strategies, and outcomes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.**, v. 71, p. 408-414, 2011.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: M100-S25**. CLSI Wayne, Pennsylvania, USA; 2017.

COOK, S. M; MCARTHUR, J. D. Developing *Galleria mellonella* as a model host for human pathogens. **Virulence**, v. 4, n. 5, p. 350-353, 2013.

COLLINS, A. J; FOLEY, R. N; CHAVERS, B. et al. US Renal Data System 2013 Annual Data Report. **Am J Kidney Dis.**, v. 63 (1 Suppl):A7, 2014.

COLLIGNON, P. J. Antibiotic resistance. **Med J Aust.**, v. 177, p. 325-9, 2002.

da COSTA, T. M; MORGADO, P. G. M; CAVALCANTE, F. S. et al. Clinical and microbiological characteristics of heteroresistant and vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* from bloodstream infections in a Brazilian teaching hospital. **PLoS ONE**, v. 11, p. e0160506, 2016.

CUI, L; MURAKAMI, H; KUWAHARA-ARAI, K. et al. Contribution of a thickened cell wall and its glutamine nonamidated component to the vancomycin resistance expressed by *Staphylococcus aureus* Mu50. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 44, p. 2276-2285, 2000.

CUI, L.; MA, X; SATO, K. et al. Cell wall thickening is a common feature of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 5-14, 2003.

CUI, L; LIAN, J. Q; NEOH, H. M. et al. DNA microarray-based identification of genes associated with glycopeptide resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 49, p. 3404-3413, 2005.

CUI, L; NEOH, H. M; SHOJI, M. et al. Contribution of *vraSR* and *graSR* point mutations to vancomycin resistance in vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 53, p. 1231-4, 2009.

CUI, L; NEOH, H. M; IWAMOTO, A. et al. Coordinated phenotype switching with large-scale chromosome flip-flop inversion observed in bacteria. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 109, p. E1647-E1656, 2012.

DALGAARD, S. L; NØRGAARD, M; JESPERSEN, B. et al. Risk and prognosis of bloodstream infections among patients on chronic hemodialysis: a population-based cohort study. **PLoS One**, v. 10, p. e0124547, 2015.

DALRYMPLE, L. S; JOHANSEN, K. L; CHERTOW, G. M. et al. Infection-related hospitalizations in older patients with ESRD. **Am J Kidney Dis.**, v. 56, p. 522-530, 2010.

DALRYMPLE, L. S; MU, Y; ROMANO, P. S. et al. Outcomes of infection-related hospitalization in Medicare beneficiaries receiving in-center hemodialysis. **Am J Kidney Dis.**, v. 65, p. 754-762, 2015.

DAUM, R. S; GUPTA, S; SABBAGH, R. et al. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates with decreased susceptibility to vancomycin and teicoplanin : isolation and purification of a constitutively produced protein associated with decreased susceptibility. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 166, p. 1066-1072, 1992.

DAYAN, G; NAGLAA, M; SCULLY, I. et al. *Staphylococcus aureus*: The current state of disease, pathophysiology and strategies for prevention. **Expert Review of Vaccines**, v. 15, p. 1373-1392, 2016.

D'COSTA, V. M; MCGRANN, K. M; HUGHES, D. et al. Sampling the antibiotic resistome. **Science**, v. 311, p. 374-377, 2006.

DEPARDIEU, F; BONORA, M. G; REYNOLDS, P. E. et al. The *vanG* glycopeptide resistance operon from *Enterococcus faecalis* revisited. **Mol Microbiol**, v. 50, p. 931-48, 2003.

DHAND, A.; SAKOULAS, G. Reduced vancomycin susceptibility among clinical *Staphylococcus aureus* isolates ('the MIC Creep'): implications for therapy. **F1000 medicine reports**, v. 4, p. 4, 2012.

DIAZ, R; RAMALHEIRA, E; AFREIXO, V. et al. Evaluation of vancomycin MIC creep in *Staphylococcus aureus*. **J Glob Antimicrob Resist.**, v. 10, p. 281-284, 2017.

DINGUES, M. M; ORWIN, P. M; SCHLIEVERT, M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. **Clin Microb Rev**, v. 13, p. 16-34, 2000.

DMITRIEV, B. A; TOUKACH, F. V; HOLST, O. et al. Tertiary structure of *Staphylococcus aureus* cell wall murein. **J. Bacteriol.**, v. 186, p. 7141-7148, 2004.

DÖRR, T; DAVIS, B. M; WALDOR, M. K. Endopeptidase-mediated beta lactam tolerance. **PLoS Pathog**, v. 11, p. 1-16, 2015.



DUNMAN, P. M; MURPHY, E; HANEY, S. et al. Transcription profiling-based identification of *Staphylococcus aureus* genes regulated by the agr and/or sarA loci. **J Bacteriol**, v. 183, p. 7341-7353, 2001.

EDWARDS, A. M. Phenotype switching is a natural consequence of *Staphylococcus aureus* replication. **J Bacteriol**, v. 194, p. 5404-5412, 2012.

von EIFF, C; BECKER, K; MACHKA, K. et al. Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. **Study Group. N Engl J Med**, v. 344, p. 11-6, 2001.

von EIFF, C; PETERS, G; BECKER, K. The small colony variant (SCV) concept-the role of staphylococcal SCVs in persistent infections. **Injury**, v. 37, p. S26-S33, 2006.

ENGEMANN, J. J; FRIEDMAN, J. Y; REED, S. D. et al. Clinical outcomes and costs due to *Staphylococcus aureus* bacteremia among patients receiving long-term hemodialysis. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, v. 26, p. 534-539, 2005.

ERICKSON, K. F; WINKELMAYER, W. C; CHERTOW, G. M. et al. Hemodialysis hospitalizations and readmissions: the effects of payment reform. **Am J Kidney Dis.**, v. 69, p. 237-246, 2017.

ESMANHOTO, C. G; TAMINATO, M; FRAM, D. S. et al. Microorganisms isolated from patients on hemodialysis by central venous catheter and related clinical evolution. **Acta Paul Enferm.**, v. 5, p. 413-20, 2013.

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL (ECDC). Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2012. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (Ears-Net). Disponível em: <<http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2012.pdf>>. Acesso em: 18 jan. 2018.

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL (ECDC). Annual Epidemiological Report 2013. Reporting on 2011 surveillance data and 2012 epidemic intelligence data. Stockholm: ECDC; 2013.

EVANS, R; CASKEY, F; FLUCK, R. et al. UK renal registry 18th annual report: chapter 12 epidemiology of reported infections amongst patients receiving dialysis for established renal failure in England 2013 to 2014: a joint report from public health England and the UK renal registry. **Nephron.**, v. 132, p. 279-88, 2016.

FALCÓN, R; MARTÍNEZ, A; ALBERT, E. 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, p. 1-8, 2016.

FLEMMING, H. C; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nat Rev Microbiol**, v. 8, p. 623-633, 2010.

FLUCK, R; WILSON, J; DAVIES, J. et al. UK renal registry 11th annual report (december 2008): chapter 12 epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia amongst patients receiving renal replacement therapy in England in 2007. **Nephron Clin Pract**, v. 111, p. c247-c256, 2009.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FAD). Disponível em: <[https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2015/050671s022lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2015/050671s022lbl.pdf)>. Acesso em: 09 fev. 2018.

FOSTER, T. J. Immune evasion by staphylococci. **Nat.Rev.Microbiol.**, v. 3, p. 948-958, 2005.

FOURNIER, B; HOOPER, D. C. A new two-component regulatory system involved in adhesion, autolysis, and extracellular proteolytic activity of *Staphylococcus aureus*. **J Bacteriol**, v. 182, p. 3955-3964, 2000.

FOWLER, V. G; SAKOULAS, G; MCINTYRE, L. M. 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. **J. Infect. Dis.**, v. 190, p. 1140-1149, 2004.

FRAM, D; OKUNO, M. F; TAMINATO, M. et al. Risk factors for blood stream infection in patients at a Brazilian hemodialysis center: a case-control study. **BMC Infect Dis**, v. 15, p. 1-9, 2015.

FRAM, D; TAMINATO, M; PONZIO, V. et al. Risk factors for morbidity and mortality of bloodstream infection in patients undergoing hemodialysis: a nested case-control study. **BMC Res Notes.**, v. 7(Supp1), p. 88-2, 2014.

FRIDKIN, S. K; HAGEMAN, J; MCDUGAL, L. K. et al. Epidemiological and microbiological characterization of infections caused by *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin, United States, 1997–2001. **Clin. Infect. Dis.**, v. 36, p. 429-439, 2003.

FRIDMAN, O; GOLDBERG, A; RONIN, I. et al. Optimization of lag time underlies antibiotic tolerance in evolved bacterial populations. **Nature**, v. 513, p. 418-421, 2014.

FRIERI, M; KUMAR, K; BOUTIN, A. Antibiotic resistance. **J Infect Public Health**, v. 10, p. 369-378, 2017.

FUJIMOTO, D. F; BAYLES, K. W. Opposing roles of the *Staphylococcus aureus* virulence regulators, Agr and Sar, in Triton X-100- and penicillin induced autolysis. **J Bacteriol**, v. 180, p. 3724-6, 1998.

FYSARAKI, M; SAMONIS, G; VALACHIS, A. et al. Incidence, clinical, microbiological features and outcome of bloodstream infections in patients undergoing hemodialysis. **Int J Med Sci.**, v. 12, p. 1632-8, 2013.

GALES, A. C; SADER, H. S; RIBEIRO, J. et al. Antimicrobial susceptibility of Gram-positive bacteria isolates in Brazilian hospitals participating in the SENTRY program (2005-2008). **Clin. Infect. Dis.**, v. 13, p. 90-98, 2009.

GAO, W; CHUA, K; DAVIES, J.K. et al. Two novel point mutations in clinical *Staphylococcus aureus* reduce linezolid susceptibility and switch on the stringent response to promote persistent infection. **PLoS Pathog**, v. 6, p. e1000944, 2010.

GARDETE, S; WU, S. W; GILL, S. et al. Role of VraSR in antibiotic resistance and antibiotic-induced stress response in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, p. 3424-3434, 2006.

GARDETE, S; KIM, C; HARTMANN, B. M. et al. Genetic pathway in acquisition and loss of vancomycin resistance in a methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strain of clonal type USA300. **PLoS Pathog.**, v. 8, p. e1002505, 2012.

GAUNA, T. T; OSHIRO, E; LUZIO, Y. C. et al. Bloodstream infection in patients with end-stage renal disease in a teaching hospital in central-western Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop.**, v. 46 p. 426-32, 2013.

GEFEN, O; FRIDMAN, O; RONIN, I. et al. Direct observation of single stationary-phase bacteria reveals a surprisingly long period of constant protein production activity. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, v. 111, p. 556-561, 2014.

GELATTI, L. C; BONAMIGO, R. R; BECKER, A. P. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: emerging community dissemination. **An. Bras. Dermatol.**, v. 84, p. 501-6, 2009.

GERACI, J. E; HEILMAN, F. R; NICHOLS, D.R. et al. Some laboratory and clinical experiences with a new antibiotic, vancomycin. **Mayo Clin Proc**, v. 31, p. 564-82, 1956.

GHUYSEN, J. M. Molecular structures of penicillin-binding proteins and beta-lactamases. **Trends. Microbiol.**, v. 2, p. 372-380, 1994.

GIRAUDO, A. T; CALZOLARI, A; CATALDI, A. A. et al. The *sae* locus of *Staphylococcus aureus* encodes a two-component regulatory system. **FEMS Microbiol Lett**, v. 177, p. 15-22, 1999.

GLASER, R; BECKER, K; von EIFF, C. et al. Decreased susceptibility of *Staphylococcus aureus* small-colony variants toward human antimicrobial peptides. **J. Invest. Dermatol.**, v. 134, p. 2347-2350, 2014.

GOULD, I. M; DAVID, M. Z; ESPOSITO, S. et al. New insights into methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) pathogenesis, treatment and resistance. **Int J Antimicrob Agents**, v. 39, p. 96-104, 2012.

GOMES, D. M; WARD, K. E; LAPLANTE, K. L. Clinical implications of vancomycin heteroresistant and intermediately susceptible *Staphylococcus aureus*. **Pharmacotherapy.**, v. 35, p. 424-32, 2015.

GOSBELL, I. B. Diagnosis and management of catheter-related bloodstream infections due to *Staphylococcus aureus*. **Intern Med J**, v. 35, p. 45-62, 2005.

HAAG, A. F; BAGNOLI, F. The role of two-component signal transduction systems in *Staphylococcus aureus* virulence regulation. **Curr Top Microbiol Immunol.**, v.409, p. 145-198, 2017.

van HAL, S. J; JONES, M; GOSBELL, I. B. ET al. Vancomycin heteroresistance is associated with reduced mortality in ST239 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* blood stream infections. **PLoS One.**, v. 6, p. e21217, 2011.

van HAL, S. J; LODISE, T. P; PATERSON, D. L. The clinical significance of vancomycin minimum inhibitory concentration in *Staphylococcus aureus* infections: a systematic review and meta-analysis. **Clin. Infect. Dis.**, v. 54, p. 755-771, 2012.

van HAL, S; FOWLER, V. G. JR. Is it time to replace vancomycin in the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections? **Clinical Practice**, v. 56, p. 1779-1788, 2013.

HANDWERGER, S; TOMASZ, A. Antibiotic tolerance among clinical isolates of bacteria. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 25, p. 349-380, 1985.

HARIGAYA, Y; NGO, D; LESSE, A. J. et al. Characterization of heterogeneous vancomycin intermediate resistance, MIC and accessory gene regulator (*agr*) dysfunction among clinical bloodstream isolates of *Staphylococcus aureus*. **BMC Infect Dis**, v. 11, p. 287, 2011.

HENDERSON, K. L; JOHNSON, A. P; MULLER-PEBODY, B. et al. The changing aetiology of paediatric bacteraemia in England and Wales, 1998-2007. **J Med Microbiol.**, v. 59, p. 213-219, 2010.

HENRICH, W. H. **Princípios e Prática de diálise**. 4ª ed. Editora: Dilivros. RJ. 2011.

HENSON, K. E. R; LEVINE, M. T; WONG, E. A. H. et al. Glycopeptide antibiotics: evolving resistance, pharmacology and adverse event profile. **Expert Rev. Anti Infect. Ther.**, v. 13, 1265-78, 2015.

HENTZIEN, M; STRADY, C; VERNET-GARNIER, V. et al. Prognostic factors associated with 30-day in-hospital mortality in coagulase-negative *Staphylococcus* bacteraemia: no impact of vancomycin minimum inhibitory concentration. **Infectious Diseases.**, v. 0, p. 1-10, 2017.

HERAS, J; DOMÍNGUEZ, C; MATA, E. et al. GelJ - a tool for analyzing DNA fingerprint gel images. **BMC Bioinformatics.**, v. 16, p. 270, 2015.

HERRERA, M; di GREGORIO, S; FERNANDEZ, S. et al. *In vitro* selection of *Staphylococcus aureus* mutants resistant to tigecycline with intermediate susceptibility to vancomycin. **Ann Clin Microbiol Antimicrob**, v. 15, p. 1-5, 2016.

HIDAYAT, L. K; HSU, D. I; QUIST, R. et al. High dose vancomycin therapy for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: efficacy and toxicity. **Arch Intern Med**, v. 166, p. 2138-44, 2006.

HIRAMATSU, K; ARITAKA, N; HANAOKI, H. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. **J Antimicrob Chemother**, v. 40, p. 135-36, 1997.

HIRAMATSU, K; ARITAKA, N; HANAOKI, H. et al. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. **Lancet**, v. 350, p. 1670-1673, 1997.

HIRAMATSU, K. Vancomycin resistance in Staphylococci. **Drug Resistance Updates**, v. 1, p.135-50, 1998.

HIRAMATSU, K. The emergence of *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin in Japan. **Am. J. Med.**, v. 104, p. 7S-10S, 1998.

HIRAMATSU, K. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance. **Lancet Infectious Diseases**, v. 1, p. 147–155, 2001.

HIRON, A; FALORD, M; VALLE, J. et al. Bacitracin and nisin resistance in *Staphylococcus aureus*: a novel pathway involving the BraS/BraR two-component system (SA2417/SA2418) and both the BraD/BraE and VraD/VraE ABC transporters. **Mol Microbiol**, v. 81, p. 602-622, 2011.

HOEPRICH, P. D; FINN, P. D. Influence of culture media on the antistaphylococcal activity of fosfomicin. **Appl Microbiol.**, v. 22, p. 781-783, 1971.

HOLLAND, T. L; FOWLER, V. G. Vancomycin minimum inhibitory concentration and outcome in patients with *Staphylococcus aureus* bacteremia: pearl or pellet? **J Infect Dis**, v. 204, p. 329-31, 2011.

HOLLAND, T. L; ARNOLD, C; FOWLER, V. G. JR. Clinical management of *Staphylococcus aureus* bacteremia: a review. **JAMA**, v. 312, p. 1330-41, 2014.

HOLMES, N. E; TURNIDGE, J. D; MUNCKHOF, W. J. et al. Antibiotic choice may not explain poorer outcomes in patients with *Staphylococcus aureus* bacteremia and

high vancomycin minimum inhibitory concentrations. **J Infect Dis.**, v. 204, p. 340-7, 2011.

HOLMES, N. E; TURNIDGE, J. D; MUNCKHOF, W. J. et al. Vancomycin minimum inhibitory concentration, host comorbidities and mortality in *Staphylococcus aureus* bacteraemia. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 19, p. 1163-1168, 2013.

HOLUBAR, M; MENG, L; DERESINSKI, S. Bacteremia due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* new therapeutic approaches. **Infect Dis Clin N Am**, v. 30, p. 491-507, 2016.

HORNE, K. C; HOWDEN, B. P; GRABSCH, E. A. et al. Prospective comparison of the clinical impacts of heterogeneous vancomycin-intermediate methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and vancomycin-susceptible MRSA. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 53, p. 3447-3452, 2009.

HOWDEN, B. P; WARD, P. B; CHARLES, P. G. et al. Treatment outcomes for serious infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with reduced vancomycin susceptibility. **Clin Infect Dis.**, v. 38, p 521-528, 2004.

HOWDEN, B. P; JOHNSON, P. D. R; WARD, B. et al. Isolates with low-level vancomycin resistance associated with persistent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, p. 3039-47, 2006.

HOWDEN, B. P; DAVIES, J. K; JOHNSON, P. D. R. 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, p. 99-139, 2010.

HOWDEN, B. P; PELEG, A. Y; STINEAR, T. P. The evolution of vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) and heterogenous-VISA. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 21, p. 575-582, 2014.



HOWE, R. A; MONK, A; WOOTTON, M. et al. Vancomycin susceptibility within methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineages. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 10, p. 855-857, 2004.

HU, J; MA, X. X; TIAN, Y. et al. Reduced vancomycin susceptibility found in methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* clinical isolates in northeast China. **PLoS ONE**, v. 8, p. 1-9, 2013.

HU, Q; PENG, H; RAO, X. Molecular events for promotion of vancomycin resistance in vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus*. **Front. Microbiol.**, v. 7, p. 1-18, 2016.

HUMPHRIES, R. M; HINDLER, J. A. Should laboratories test methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* for elevated vancomycin minimum inhibitory concentrations by Etest as a driver of treatment changes? **Clin. Infect. Dis.**, v. 55, p. 612-613, 2012.

HUSEBY, M; SHI, K; BROWN, C. K. et al. Structure and biological activities of beta toxin from *Staphylococcus aureus*. **J Bacteriol**, v. 189, p. 8719-26, 2007.

IMAIZUMI, T; HASEGAWA, T; NOMURA, A. et al. Association between *Staphylococcus aureus* bacteremia and hospital mortality in hemodialysis patients with bloodstream infection: a multicenter cohort from Japanese tertiary care centers. **Ther Apher Dial.**, v. 21, p. 354-360, 2017.

INRIG, J. K; REED, S. D; SZCZECH, L. A. et al. Relationship between clinical outcomes and vascular access type among hemodialysis patients with *Staphylococcus aureus* bacteremia. **Clin. J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 01, p. 518-524, 2006.

JEVONS, M. P. "Celbenin"-resistant *Staphylococci*. **Br Med J**, v. 1, p. 124-125, 1961.

JOHNSON, P. J. T; LEVIN, B. R. Pharmacodynamics, population dynamics, and the evolution of persistence in *Staphylococcus aureus*. **PloS Genet.**, v. 9, p. e1003123, 2013.

KAATZ, G. W; SEO, S. M; DORMAN, N. J. et al. Emergence of teicoplanin resistance during therapy of *Staphylococcus aureus* endocarditis. **J. Infect. Dis.**, v. 162, p. 103-108, 1990.

KAHNE, D; LEIMKUHNER, C; LU, W. et al. Glycopeptide and lipoglycopeptide antibiotics. **Chem.Rev.**, v. 105, p. 425-448, 2005.

KATAYAMA, Y; MURAKAMI-KURODA, H; CUI, L. et al. Selection of heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* by imipenem. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 53, p. 3190-3196, 2009.

KESTER, J. C; FORTUNE, S. M. Persists and beyond: mechanisms of phenotypic drug resistance and drug tolerance in bacteria. **Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.**, v. 49, p. 91-101, 2014.

KHATIB, R; RIEDERER, K; SHARMA, M. et al. Screening for intermediately vancomycin-susceptible and vancomycin heteroresistant *Staphylococcus aureus* by use of vancomycin-supplemented brain heart infusion agar biplates: defining growth interpretation criteria based on gold standard confirmation. **J Clin Microbiol**, v. 53, p. 3543-3546, 2015.

KIEM, S; SCHENTAG, J. J. Interpretation of antibiotic concentration ratios measured in epithelial lining fluid. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 52, p. 24-36, 2008.

KIM, M. C; CHA, M. H; RYU, J. G. et al. Characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from fresh produces and human fecal samples. **Foodborne Pathog Dis.**, v. 14, p. 195-201, 2017.

KIRST, H. A; THOMPSON, D. G; NICAS, T. I. Historical yearly usage of vancomycin. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 42, p. 1303-4, 1998.

KITANO, K; TOMASZ, A. *Escherichia coli* mutants tolerant to  $\beta$ -lactam antibiotics. **J. Bacteriol.**, v. 140, p. 955-963, 1979.

KONEMAN, E. W; ALLEN, S. D; JANDA, W. M. et al. **Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido**. 6ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KOZIEL, J; POTEPA, J. Protease-armed bacteria in the skin. **Cell Tissue Res**, v. 351, p. 325-337, 2013.

KULLAR, R; SAKOULAS, G; DERESINSKI, S. et al. When sepsis persists: a review of MRSA bacteraemia salvage therapy. **Antimicrob Chemother**, v. 71, p. 576-586, 2016.

LAHEY, T; SHAH, R; GITTZUS, J. et al. Infectious diseases consultation lowers mortality from *Staphylococcus aureus* bacteremia. **Medicine**, v. 88, p. 263-7, 2009.

LAI, C. F; LIAO, C. H; PAI, M. F; et al. Nasal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* is associated with higher all-cause mortality in hemodialysis patients. **Clin. J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 06, p. 167-174, 2011.

LAPLANTE, K. L; 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 an *in vitro* pharmacodynamic model. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, p. 4665-4672, 2004.

LAPLANTE, L. K; RYBAK, M. J. Clinical glycopeptide-intermediate staphylococci tested against arbekacin, daptomycin, and tigecycline. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 50, p. 125-130, 2004.

LAUPLAND, K. B; LYYTIKAINEN, O; SOGAARD, M. et al. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus* bloodstream infection: a multinational population-based surveillance study. **Clin Microbiol Infect**, v. 19, p.465-71, 2013.

LEE, H. H; MOLLA, M. N; CANTOR, C. R. et al. Bacterial charity work leads to population-wide resistance. **Nature.**, v. 467, p. 82-85, 2010.

LENHARD, J. R; BROWN, T; RYBAK, M. J. et al. sequential evolution of vancomycin-intermediate resistance alters virulence in *Staphylococcus aureus*: pharmacokinetic/pharmacodynamic targets for vancomycin exposure. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 60, p. 1584-91, 2015.

LENHARD, J. R; von EIFF, C; HONG, I .S. et al. Evolution of *Staphylococcus aureus* under vancomycin selective pressure: the role of the small-colony variant phenotype. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 59, p. 1347-1351, 2015.

LEVINE, D. P. Vancomycin: a history. **Clin Infect Dis.**, v. 42, p. S5–S12, 2006.

LEWIS, K. Persister cells, dormancy and infectious disease. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 5, p. 48-56, 2007.

LEWIS, K. Persister cells. **Annu Rev Microbiol.**, v. 64, p. 357-72, 2010.

LI, J; XIE, S; AHMED, S. et al. Antimicrobial activity and resistance: influencing factors. **Front Pharmacol.**, v. 13, p. 364, 2017.

LIM, D; STRYNADKA, N. C. Structural basis for the beta lactam resistance of PBP2a from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Nat. Struct. Biol.**, v. 9, p. 870-876, 2002.

LIN, Y. T; TSAI, J. C; YAMAMOTO, T. et al. Emergence of a small colony variant of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in a patient with septic arthritis during long-term treatment with daptomycin. **J Antimicrob Chemother** 71: 1807-1814, 2016.

LIU, C; CHAMBERS, H. F. *Staphylococcus aureus* with heterogeneous resistance to vancomycin: epidemiology, clinical significance, and critical assessment of diagnostic methods. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 47, p. 3040-3045, 2003.

LODISE, T. P; GRAVES, J; EVANS, A. et al. Relationship between vancomycin MIC and failure among patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia treated with vancomycin. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 52, p. 3315-3320, 2008.

LODISE, T. P; MILLER, C. D; GRAVES, J. et al. Predictors of high vancomycin MIC values among patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 62, p. 1138-1141, 2008.

LOFFLER, B; TUCHSCHERR, L; NIEMANN, S. et al. *Staphylococcus aureus* persistence in non-professional phagocytes. **Int J Med Microbiol**, v. 304, p. 170-176, 2014.

LOWY, F. D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Investigation.**, v. 111, p 1265-1273. 2003.

LU, P. L; TSAI, J. C; CHIU, Y. W. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage, infection and transmission in dialysis patients, healthcare workers and their family members. **Nephrol Dial Transplant.**, v. 23, p. 1659-65, 2008.

MA, X. X; WANG, E. H; LIU, Y. et al. Antibiotic susceptibility of coagulase-negative staphylococci (CoNS): emergence of teicoplanin non-susceptible CoNS strains with inducible resistance to vancomycin. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, p. 1661-1668, 2011.

MA, Y; XU, Y; YESTREPSKY, B. D. et al. Novel inhibitors of *Staphylococcus aureus* virulence gene expression and biofilm formation. **PloS One**, v. 7, p. e47255, 2012.

MACLAYTON, D. O; SUDA, K. J; COVAL, K. A. et al. Case-control study of the relationship between MRSA bacteremia with a vancomycin MIC of 2 microg/mL and risk factors, costs, and outcomes in inpatients undergoing hemodialysis. **Clin Ther.**, v. 28, p. 1208-1216, 2006.

MAINARDI, J. L; SHLAES, D. M; GOERING, R. V. et al. Decreased teicoplanin susceptibility of methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. **J. Infect. Dis.**, v. 171, p. 1646-1650, 1995.

MANQUAT, G; CROIZE, J; STAHL, J. P. et al. Failure of teicoplanin treatment associated with an increase in MIC during therapy of *Staphylococcus aureus* septicaemia. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 29, p. 731-732, 1992.

MARENCO, L. L; del FIOLE, de S. F; OLIVEIRA, S. de J. et al. Vancomycin: the need to suit serum concentrations in hemodialysis patients. **Braz J Infect Dis.**, v. 14, p. 203-208, 2010.

MARR, K. A; KONG, L; FOWLER, V. G. et al. Incidence and outcome of *Staphylococcus aureus* bacteremia in hemodialysis patients. **Kidney International**, v. 54, p. 1684-1689, 1998.

MARCHESE, A; BALISTRERI, G; TONOLI, E. et al. Heterogeneous vancomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated in a large Italian hospital. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p. 866-869, 2000.

MARQUES, V; DA MOTTA, C. C; SOARES, B. S. et al. Biofilm production and beta-lactamic resistance in Brazilian *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis. **Braz J Microbiol**, v. 8, p. 118-124, 2016.

MARTIN, P. K; LI, T; SUN, D. et al. Role in cell permeability of an essential two-component system in *Staphylococcus aureus*. **J Bacteriol**, v. 181, p. 3666-3673, 1999.

MARZEC, N. S; BESSESEN, M. T. Risk and outcomes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) bacteremia among patients admitted with and without MRSA nares colonization. **American Journal of Infection Control**, v. 44, p. 405-8, 2016.

MASSEY, R. C; BUCKLING, A; PEACOCK, S. J. Phenotypic switching of antibiotic resistance circumvents permanent costs in *Staphylococcus aureus*. **Curr Biol**, v. 11, p. 1810-1814, 2001.

MATSUO, M; HISHINUMA, T; KATAYAMA, Y. et al. Mutation of RNA polymerase beta subunit (rpoB) promotes hVISA-to-VISA phenotypic conversion of strain Mu3. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 55, p. 4188-4195, 2011.

MATSUMOTO, K; TAKESUE, Y; OHMAGARI, N. et al. Practice guidelines for therapeutic drug monitoring of vancomycin: a consensus review of the Japanese Society of Chemotherapy and the Japanese Society of Therapeutic Drug Monitoring. **J Infect Chemother.**, v. 19, p. 365-380, 2013.

MATZKE, G. R; ZHANEL, G. G; GUAY, D. R. P. Clinical pharmacokinetics of vancomycin. **Clin Pharmacokinet.**, v. 11, p. 257-282, 1986.

MAY, J; SHANNON, K; KING, A. et al. Glycopeptide tolerance in *Staphylococcus aureus*. **J Antimicrobi Chemother.**, v. 42, p. 189-197, 1998.

MCKESSAR, S. J; BERRY, A. M; BELL, J. M. et al. Genetic characterization of *vanG*, a novel vancomycin resistance locus of *Enterococcus faecalis*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 44, p. 3224-8, 2000.

MCNAMARA, P. J; PROCTOR, R. A. *Staphylococcus aureus* small colony variants, electron transport and persistent infections. **Int. J. Antimicrob. Agents.**, v. 14, p. 117-122, 2000.

MEEHL, M; HERBERT, S; GOTZ, F. et al. Interaction of the GraRS two-component system with the VraFG ABC transporter to support vancomycin-intermediate resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 51, p. 2679-2689, 2007.

MEGHRNI, A; NEJMA M, B; HENTATI, H. et al. Adhesive properties and extracellular enzymatic activity of *Staphylococcus aureus* strains isolated from oral cavity. **Microbial Pathogenesis**, v. 73, p. 7-12, 2014.

MELTER, O; RADOJEVIC. B. Small colony variants of *Staphylococcus aureus* - review. **Folia microbiol.**, v. 55, p. 548-558, 2010.

MERMEL, L. A; ALLON, M; BOUZA, E. et al. Clinical practice guidelines for the diagnosis and management of intravascular catheter-related infection: 2009 Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clin Infect Dis**, v. 49, p. 1-45, 2009.

MIKO, B. A; HAFER, C. A; LEE, C. J. et al. Molecular characterization of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* clinical isolates in the United States, 2004 to 2010. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, p. 874-879, 2013.

MIRANI, Z. A; AZIZ, M; KHAN, M. N. et al. Biofilm formation and dispersal of *Staphylococcus aureus* under the influence of oxacillin. **Microb Pathog**, v. 61, p. 66-72, 2013.

MIRZAEI, M; NAJAR-PEERAYEH, S; BEHMANESH, M. et al. Relationship between adhesin genes and biofilm formation in vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* clinical isolates. **Curr Microbiol.**, v. 70, p. 665-70, 2015.

MITCHELL, D. B; VOGEL, K; WEIMANN, B. J. et al. The phytase subfamily of histidine acid phosphatases: isolation of genes for two novel phytases from the fungi *Aspergillus terreus* and *Myceliophthora thermophila*. **Microbiology**, v. 143, p. 245-252, 1997.

MOISE, P. A; SAKOULAS, G; FORREST, A. et al. Vancomycin *in vitro* bactericidal activity and its relationship to efficacy in clearance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 51, p 2582-2586, 2007.



MOISE-BRODER, P. A; SAKOULAS, G; ELIOPOULOS, G. M. et al. Accessory gene regulator group II polymorphism in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* is predictive of failure of vancomycin therapy. **Clin Infect Dis**, v. 38, p. 1700-5, 2004.

MORAN, G. J; ABRAHAMIAN, F. M; LOVECCHIO, F. et al. Acute bacterial skin infections: Developments since the 2005 infectious diseases society of america (idsa) guidelines. **J. Emerg. Med.**, v. 44, p. e397-e412, 2013.

MORFELDT, E; TAYLOR, D; von GABAIN, A. et al. Activation of alpha-toxin translation in *Staphylococcus aureus* by the trans-encoded antisense RNA, RNAlII. **EMBO J**, v. 14, p. 4569-4577, 1995.

MURRAY, B. E. Vancomycin-resistant enterococcal infections. **N Engl J Med**, v. 342, p. 710-21, 2000.

MURRAY, P. R; ROSENTHAL, K. S; PFALLER, M. A. 2009. **Microbiologia Médica. In: Metabolismo bacteriano - 6ª ed.** Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil, p. 74-82.

MWANGI, M. M; WU, S. W; ZHOU, Y. et al. Tracking the in vivo evolution of multidrug resistance in *Staphylococcus aureus* by whole-genome sequencing. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 104, p. 9451-9456, 2007.

NAKIPOGLU, Y; DERBENTLI, S; CAGATAY, A. A. et al. Investigation of *Staphylococcus strains* with heterogeneous resistance to glycopeptides in a Turkish university hospital. **BMC Infectious Diseases**, v. 5, p. 1-8, 2005.

NASSAR, G. M; AYUS, J. C. Infectious complications of the hemodialysis access. **Kidney Int.**, v. 60, p. 1-13, 2001.

NEELY, M. N; YOUN, G; JONES, B. et al. Are vancomycin trough concentrations adequate for optimal dosing? **Antimic Agents and Chemoth.**, v. 58, p. 309-316, 2014.

NIELSEN, L. H; JENSEN-FANGEL, S; BENFIELD, T. et al. Risk and prognosis of *Staphylococcus aureus* bacteremia among individuals with and without end-stage renal disease: a Danish, population-based cohort study. **BMC Infect Dis**, v. 15, p. 1-8, 2015.

NGUYEN, D. B; SHUGART, A; LINES, C. et al. National Healthcare Safety Network (NHSN) Dialysis Event Surveillance Report for 2014. **Clin J Am Soc Nephrol.**, v. 7, p. 1139-1146, 2017.

NOVICK, R. P; ROSS, H. F; PROJAN, S. J. et al. Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. **EMBO J**, v. 12, p. 3967-3975, 1993.

NOVICK, R. P; JIANG, D. The staphylococcal saeRS system coordinates environmental signals with agr quorum sensing. **Microbiology**, v. 149, p. 2709-2717, 2003.

NOVICK, R. P; GEISINGER, E. Quorum sensing in staphylococci. **Annu Rev Genet**, v. 42, p. 541-564, 2008.

NUNES, E. L. C; SANTOS, K. R. N; MODINO, P. J. J. et al. Detection of *ileS-2* gene encoding mupirocin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by multiplex PCR. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 34, p. 77-81, 1999.

NUNES, A. P. F; TEIXEIRA, L. M; IORIO, N. L. P. et al. Heterogeneous resistance to vancomycin in *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus warneri* clinical strains: characterisation of glycopeptide susceptibility profiles and cell wall thickening. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 27, p. 307-315, 2006.

NUNES, A. P. F; SCHUENCK, R. P; BASTOS, C. C. R. et al. Heterogeneous resistance to vancomycin and teicoplanin among *Staphylococcus* spp. isolated from bacteremia. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 11, p. 345-350, 2007.

OGSTON, A. *Micrococcus* poisoning. **J. Anal. Physiol.**, v. 17, p. 24-58, 1883.

OLIVEIRA, D. C; de LECASTRE, H. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 46, p. 2155-61, 2002.

de OLIVEIRA, A. C; de PAULA, A. O. Decolonization of *Staphylococcus aureus* carriers: indications, advantages and limitations. **Enferm.**, v. 21, p. 448-57, 2012.

PAI, M. P; NEELY, M; RODVOLD, K. A. et al. Innovative approaches to optimizing the delivery of vancomycin in individual patients. **Adv Drug Deliv Rev.**, v. 77, p. 50-7, 2014.

PARK, S. Y; CHONG, Y. P; PARK, H. J. et al. *agr* dysfunction and persistent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia in patients with removed eradicable foci. **Infection**, v. 41, p. 111-119, 2013.

PARK, S. Y; OH, I. H; LEE, H. J. et al. Impact of reduced vancomycin MIC on clinical outcomes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, p. 5536-5542, 2013.

PARRILLO, J. E. Pathogenetic Mechanisms of Septic Shock. **N Engl J Med.**, v. 328, p. 1471-1477, 1993.

PATEL, P. R; KALLEN, A. J; ARDUINO, M. J. Epidemiology, surveillance, and prevention of bloodstream infections in hemodialysis patients. **Am J Kidney Dis.**, v. 56, p. 566-577, 2010.

PAULANDER, W; VARMING, N. A; BAEK, K. T. et al. Antibiotic-mediated selection of quorum-sensing-negative *Staphylococcus aureus*. **MBio**, v. 3, p. e00459–00412, 2013.

PELEG, A. Y; MONGA, D; PILLAI, S. et al. Reduced susceptibility to vancomycin influences pathogenicity in *Staphylococcus aureus* infection. **J Infect Dis**, v. 199, p. 532-6, 2009.

PENG, H; HU, Q; SHANG, W. et al. Walk (S221P), a naturally occurring mutation, confers vancomycin resistance in VISA strain XN108. **J Antimicrob Chemother**, v. 72, p. 1-8, 2016.

PEREIRA, P. M; FILIPE, S. R; TOMASZ, A. et al. Fluorescence ratio imaging microscopy shows decreased access of vancomycin to cell wall synthetic sites in vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 51, p. 3627-3633, 2007.

PÉREZ-MONTARELO, D; VIEDMA, E; MURCIA, M. et al. Pathogenic characteristics of *Staphylococcus aureus* endovascular infection isolates from different clonal complexes. **Front. Microbiol.**, v. 8, p. 917, 2017.

PFELTZ, R. F; SINGH, V. K; SCHMIDT, J. L. et al. Characterization of passage-selected vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strains of diverse parental backgrounds. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 44, p. 294-303, 2000.

PILLAI, S. K; WENNERSTEN, C; VENKATARAMAN, L. et al. Development of reduced vancomycin susceptibility in methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. **Clin. Infect. Dis.**, v. 49, p. 1169-1174, 2009.

PRAKASH, V; LEWIS, J. S; JORGENSEN, J. H. Vancomycin MICs for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates differ based upon the susceptibility test method used. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 52, p. 4528, 2008.

PROCTOR, R. A; van LANGEVELDE, P; KRISTJANSSON, M. et al. Persistent and relapsing infections associated with small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. **Clin. Infect. Dis.**, v. 20, p. 95-102, 1995.

PROCTOR, R. A; von EIFF, C; KAHL, B. C. et al. Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 4, p. 295-305, 2006.

QUIBLIER, C; ZINKERNAGEL, A. S; SCHUEPBACH, R. A. et al. Contribution of SecDF to *Staphylococcus aureus* resistance and expression of virulence factors. **BMC Microbiol**, v. 11, p. 72-79, 2011.

QUIRK, M. First VRSA isolate identified in USA. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 2, p. 510, 2002.

QURESHI, N. K; YIN, S; BOYLE-VAVRA, S. The role of the staphylococcal VraTSR regulatory system on vancomycin resistance and vana operon expression in vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. **PLoS ONE**, v. 9, p. e85873, 2014.

RAAD, I; COSTERTON, W; SABHARWAL, U. et al. Ultrastructural analysis of indwelling vascular catheters: a quantitative relationship between luminal colonization and duration of placement. **J. Infect. Dis.**, v. 168, p. 400-407, 1993.

RASMUSSEN, G; MONECKE, S; BRUS, O. et al. Long term molecular epidemiology of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia isolates in Sweden. **PLoS ONE**, v. 9, p. 1-14, 2014.

REBOLLO-PEREZ, J; ORDONEZ-TAPIA, S; HERAZO-HERAZO, C. et al. Nasal carriage of Panton Valentine leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in healthy preschool children. **Rev Salud Publica**, v. 13, p. 824-32, 2011.

REED, S. D; FRIEDMAN, J. Y; ENGEMANN, J. J. et al. Costs and outcomes among hemodialysis-dependent patients with methicillin-resistant or methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, v. 26, p. 175-183. 2005.

RICHARDS, R. L; HAIGH, R. D; PASCOE, B. et al. Persistent *Staphylococcus aureus* isolates from two independent cases of bacteremia display increased

bacterial fitness and novel immune evasion phenotypes. **Infect Immun**, v. 83, p. 3311-3324, 2015.

ROJAS, L; BUNSOW, E; MUÑOZ, P. et al. Vancomycin MICs do not predict the outcome of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bloodstream infections in correctly treated patients. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 67, p. 1760-1768, 2012.

RONGPHARPI, S. R; DUGGAL, S; KALITA, K. et al. *Staphylococcus aureus* bacteremia: targeting the source. **Postgraduate medicine**, v. 126, p. 167-75, 2014.

ROSE, W. E; FALLON, M; MORAN, J. J. M. et al. Vancomycin tolerance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: influence of vancomycin, daptomycin, and telavancin on differential resistance gene expression. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, p. 4422-4427, 2012.

ROSENBACH, A. J. Mikro-Organismen bei den Wund-Infektions-Krankheiten des Menschen. **Wiesbaden, J.F. Bergmann**, p. 18, 1884.

ROTUN, S. S; MCMATH, V; SCHOONMAKER, D. J. et al. *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin isolated from a patient with fatal bacteremia. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 5, p. 147-149, 1999.

RUIZ, J; RAMIREZ, P; VILLARREAL, E. et al. From MIC creep to MIC decline: *Staphylococcus aureus* antibiotic susceptibility evolution over the last 4 years. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, p. 741-742, 2016.

RYBAK, M. J; AKINS, R. L. Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with intermediate glycopeptide resistance: clinical significance and treatment options. **Drugs**, v. 61, p. 1-7, 2001.

RYBAK, M. J. The pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of vancomycin. **Clin Infect Dis.**, v. 42 (Suppl 1), p. S35–9, 2006.

RYBAK, M; LOMAESTRO, B; ROTSCHAFER, J. C. 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. **Am J Health Syst Pharm.**, v. 66, p. 82-98, 2009.

RYBAK, M. J; VIDAILLAC, C; SADER, H. S. et al. Evaluation of vancomycin susceptibility testing for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: comparison of Etest and three automated testing methods. **J Clin Microbiol**, v. 51, p. 2077-2081, 2013.

SADER, H. S; FEY, P. D; LIMAYE, A. P. et al. Evaluation of vancomycin and daptomycin potency trends (MIC creep) against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates collected in nine U.S. medical centers from 2002 to 2006. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 53, p. 4127-4132, 2009.

SAKOULAS, G; ELIOPOULOS, G. M; MOELLERING, R. C. JR. et al. Accessory gene regulator (*agr*) locus in geographically diverse *Staphylococcus aureus* isolates with reduced susceptibility to vancomycin. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 46, p. 1492-502, 2002.

SAKOULAS, G; ELIOPOULOS, G. M; MOELLERING, R. C. JR. et al. *Staphylococcus aureus* accessory gene regulator (*agr*) group II: Is there a relationship to the development of intermediate-level glycopeptide resistance? **J. Infect. Dis.**, v. 187, p. 929-938, 2003.

SAKOULAS, G; MOISE-BRODER, P. A; SCHENTAG, J. et al. Relationship of MIC and bactericidal activity to efficacy of vancomycin for treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. **J Clin Microbio.**, v. 42, p. 2398-2402, 2004.

SAKOULAS, G; ELIOPOULOS, G. M; FOWLER, V. G. et al. Reduced susceptibility of *Staphylococcus aureus* to vancomycin and platelet microbicidal protein correlates with defective autolysis and loss of accessory gene regulator (*agr*) function. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, p. 2687-2692, 2005.

SAKOULAS, G; MOELLERING, J. R. R. C; ELIOPOULOS, G. M. Adaptation of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in the face of vancomycin therapy. **Clin Infect Dis.**, v. 42, p. S40-50, 2006.

dos SANTOS, A. L. S; SANTOS, D. O; DE FREITAS, C. C. et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 43, p. 413-423, 2007.

SATOLA, S. W; FARLEY, M. M; ANDERSON, K. F. et al. Comparison of detection methods for heteroresistant vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*, with the population analysis profile method as the reference method. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 49, p. 177-183, 2011.

SCANVIC, A; DENIC, L; GAILLON, S. et al. Duration of colonization by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* after hospital discharge and risk factors for prolonged carriage. **Clin Infect Dis.**, v. 15, p. 1393-8, 2001.

SIERADZKI, K; TOMASZ, A. Alterations of cell wall structure and metabolism accompany reduced susceptibility to vancomycin in an isogenic series of clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. **J Bacteriol.**, v. 185, p. 7103-10, 2003.

SIERADZKI, K; TOMASZ, A. Inhibition of the autolytic system by vancomycin causes mimicry of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* - type resistance, cell concentration dependence of the mic, and antibiotic tolerance in vancomycin-susceptible *S. aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, p. 527–533, 2006.

SIEVERT, D. M; RUDRIK, J. T; PATEL, J. B. et al. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in the United States, 2002-2006. **Clin Infect Dis**, v. 46, p. 668-674, 2008.

SINGH, R; RAY, P. Quorum sensing-mediated regulation of staphylococcal virulence and antibiotic resistance. **Future Microbiol**, v. 9, p. 669-681, 2014.



SENDI, P; PROCTOR, R.A. *Staphylococcus aureus* as an intracellular pathogen: the role of small colony variants. **Trends Microbiol.**, v. 17, p. 54-58, 2009.

SESSO, R. C; LOPES, A. A; THOMÉ, F. S. et al. Inquérito Brasileiro de Diálise Crônica 2016. **J Bras Nefrol**, v. 39, p. 261-266, 2017.

SHENOY, S. E; PARAS, M. L; NOUBARY, F. et al. Natural history of colonization with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and vancomycin-resistant *Enterococcus* (VRE): a systematic review. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, p. 177-190, 2014.

SIEVERT, D. M; RICKS, P; EDWARDS, J. R. et al. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009-2010. **Infect Control Hosp Epidemiol.**, v. 34, p. 1-14, 2013.

SINGH, M; MATSUO, M; SASAKI, T. et al. *In vitro* tolerance of drug-naive *Staphylococcus aureus* strain FDA209P to vancomycin. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 61, p. e01154-16, 2017.

SMITH, T. L; PEARSON, M. L; WILCOX, K. R. et al. Emergence of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. Glycopeptide-Intermediate *Staphylococcus aureus* Working Group. **N. Engl. J. Med.**, v. 340, p. 493-501, 1999.

SMYTH, D. S; KAFER, J. M; WASSERMAN, G. A. et al. Nasal carriage as a source of *agr*-defective *Staphylococcus aureus* bacteremia. **J Infect Dis**, v. 206, p. 1168-1177, 2012.

SORIANO, A; MARCO, F; MARTINEZ, J. A. et al. Influence of vancomycin minimum inhibitory concentration on the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. **Clin Infect Dis.**, v. 46, p. 193-200, 2008.

SPAGNOLO, A. M; P. ORLANDO, P; PANATTO, D. et al. *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin in healthcare settings. **J prev med hyg**, v. 55, p. 137-144, 2014.

STEIN, G. E; WELLS, E. M. The importance of tissue penetration in achieving successful antimicrobial treatment of nosocomial pneumonia and complicated skin and soft-tissue infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: vancomycin and linezolid. **Current Medical Research & Opinion**, v. 26, p. 571-588, 2010.

STEPANOVIC, S; VUKOVIC', D; HOLA, V. et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **APMIS**, v. 115, p. 891-9, 2007.

SUN, H; MADERAZO, E. G; KRUSELL, A. R. Serum protein-binding characteristics of vancomycin. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 37, p. 1132-6, 1993.

SUZUKI, M; SATOH, N; NAKAMURA, M. et al. Bacteremia in hemodialysis patients. **World J Nephrol.**, v. 5, p. 489-496, 2016.

SWENSON, J. M; ANDERSON, K. F; LONSWAY, D. R. et al. Accuracy of commercial and reference susceptibility testing methods for detecting vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. **J Clin Microbiol**, v. 47, p. 2013-2017, 2009.

TAJIMA, A; IWASE, T; SHINJI, H. et al. Inhibition of endothelial interleukin-8 production and neutrophil transmigration by *Staphylococcus aureus* beta-hemolysin. **Infect.Immun.**, v. 77, p. 327-334, 2009.

TAKESUE, Y; NAKAJIMA, K; TAKAHASHI, Y. et al. Clinical characteristics of vancomycin minimum inhibitory concentration of 2 µg/ml methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients with bacteremia. **J Infect Chemother**, v. 17, p. 52-57, 2011.

TANDE, A. J; OSMON, D. R; GREENWOOD-QUAINTANCE, K. E. et al. Clinical characteristics and outcomes of prosthetic joint infection caused by small colony variant staphylococci. **MBio.**, v. 5, p. e01910–e01914, 2014.

TAVARES, A; FARIA N. A; de LENCASTRE, H et al. Population structure of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) in Portugal over a 19-year period (1992–2011). **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 33, p. 423-432, 2014.

TAYLOR, M. E; ALLON, M. Practical vancomycin dosing in hemodialysis patients in the era of emerging vancomycin resistance: a single-center experience. **Am J Kidney Dis.**, v. 55, p. 1163-1165, 2010.

TENOVER, F. C; MOELLERING, R. C. Jr. The rationale for revising the Clinical and Laboratory Standards Institute vancomycin minimal inhibitory concentration interpretive criteria for *Staphylococcus aureus*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 44, p. 1208-1215, 2007.

TENOVER, F. C; SINNER, S. W; SEGAL, R. E. et al. Characterisation of a *Staphylococcus aureus* strain with progressive loss of susceptibility to vancomycin and daptomycin during therapy. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 33, p. 564-568, 2009.

TEVELL, S; CLAESSION, C; HELLMARK, B. et al. Heterogeneous glycopeptide intermediate *Staphylococcus epidermidis* isolated from prosthetic joint infections. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 33, p. 911-7, 2013.

THIJSSSEN, S; WONG, M. M; USVYAT, L. A. et al. Nutritional competence and resilience among hemodialysis patients in the setting of dialysis initiation and hospitalization. **Clin J Am Soc Nephrol.**, v. 10, p. 1593-1601, 2015.

THOMPSON, T. A; BROWN, P. D. Association between the agr locus and the presence of virulence genes and pathogenesis in *Staphylococcus aureus* using a *Caenorhabditis elegans* model. **Int J Infect Dis**, v. 54, p. 72-76, 2017.

THWAITES, G. E; GANT, V. Are bloodstream leukocytes Trojan Horses for the metastasis of *Staphylococcus aureus*? **Nat Rev Microbiol**, v. 9, p. 215-222, 2011.

TOMASZ, A. **The staphylococcal cell wall**. In V. A. FISCHETTI, R. P. NOVICK, J. J. FERRETTI, D. A. PORTNOY, AND J. I. ROOD (ed.), Gram-positive pathogens, 2<sup>a</sup> ed. ASM Press, p. 443–455. Washington, DC. 2006.

TOPRAK, E; VERES, A; MICHEL, J. B. et al. Evolutionary paths to antibiotic resistance under dynamically sustained drug selection. **Nat. Genet.**, v. 44, p. 101-105, 2012.

TORTORA, G. J; FUNKE, B. R; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

TRABER, K. E. LEE, E; BENSON, S. et al. *agr* function in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. **Microbiology**, v. 154, p. 2265-2274, 2008.

TUCHSCHERR, L; KREIS, C. A; HOERR, V. et al. *Staphylococcus aureus* develops increased resistance to antibiotics by forming dynamic small colony variants during chronic osteomyelitis. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 71, p. 438-448, 2016.

TUCHSCHERR, L; HEITMANN, V; HUSSAIN, M. et al. *Staphylococcus aureus* small-colony variants are adapted phenotypes for intracellular persistence. **J. Infect. Dis.**, v. 202, p. 1031-1040, 2010.

TUCHSCHERR, L; MEDINA, E; HUSSAIN, M. et al. *Staphylococcus aureus* phenotype switching: an effective bacterial strategy to escape host immune response and establish a chronic infection. **EMBO Mol. Med.**, v. 3, p. 129-141, 2011.

UNITED STATES RENAL DATA SYSTEM. Annual Data Report: Economic Costs of ESRD. ADR 2013. 2013.

UNITED STATES RENAL DATA SYSTEM. Annual Data Report: Medicare Expenditures for Persons with ESRD. 2016.

UNITED STATES RENAL DATA SYSTEM. Annual Data Report: Hospitalizations. 2016.

UNITED STATES RENAL DATA SYSTEM. Annual Report: Chapter 4 Hospitalization. 2017.

USLAN, D. Z; CRANE, S. J; STECKELBERG, J. M. et al. Age and sex associated trends in bloodstream infection: a population based study in Olmsted County, Minnesota. **Arch Intern Med.**, v. 167, p. 834-839, 2007.

UTTLEY, A. H. C; COLLINS, C. H; NAIDOO, J. et al. Vancomycin-resistant *Enterococci*. **Lancet.**, v. 342, p. 57-58, 1988.

VANDECASTEELE, S. J; de VRIESE, A. S; TACCONELLI, E. The pharmacokinetics and pharmacodynamics of vancomycin in clinical practice: evidence and uncertainties. **Antimicrob Chemother**, v. 68, p. 743-748, 2013.

VANHOLDER, R; RINGOIR, S. Infectious morbidity and defects of phagocytic function in end-stage renal disease: A review. **J Am Soc Nephrol.**, v. 03, p 1541-54, 1993.

VASCULAR ACCESS 2006 WORK GROUP. Clinical practice guidelines for vascular Access. **Am. J. Kidney Dis.**, v. 48, p. S176-S247, 2006.

VIEDMA, E; SANZ, F; ORELLANA, M. A. et al. Relationship between agr dysfunction and reduced vancomycin susceptibility in methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* causing bacteremia. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 69, p. 51-58, 2013.

VITÓRIA, M. P; CLIPES, M. V. Determinação dos níveis séricos de vancomicina em pacientes em hemodiálise. 2013. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia). Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Vitória. 2013.

da VITÓRIA, M. P. Monitoramento de vancomicina em pacientes em tratamento hemodialítico com infecções de corrente Sanguínea por *Staphylococcus* spp. 2015.

Dissertação de Mestrado em Doenças Infecciosas. Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Vitória. 2015.

VIVONI, A. M; SANTOS, K. R. N; de OLIVEIRA, M. P. et al. Mupirocin for controlling methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: lessons from a decade of use at a university hospital. **Infect. Control. Hosp. Epidemiol**, v. 26, p. 662-667, 2005.

WAIKAR, S. S; MOUNT, D. B; CURHAN, G. C. Mortality after hospitalization with mild, moderate, and severe hyponatremia. **Am J Med.**, v. 122, p. 857-865, 2009.

WALSH, T. R; BOLMSTROM, A; QWARNSTROM, A. et al. Evaluation of current methods for detection of staphylococci with reduced susceptibility to glycopeptides. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, p. 2439-2444, 2001.

WALTERS, M; LONSWAY, D; RASHEED, K. et al. Investigation and control of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a guide for health departments and infection control personnel. Atlanta, GA 2015. Disponível em: <[http://www.cdc.gov/hai/pdfs/VRSA-Investigation-Guide-05\\_12\\_2015.pdf](http://www.cdc.gov/hai/pdfs/VRSA-Investigation-Guide-05_12_2015.pdf)>. Acesso em: 26 fev. 2018.

van WAMEL, W; XIONG, Y. Q; BAYER, A. S. et al. Regulation of *Staphylococcus aureus* type 5 capsular polysaccharides by agr and sarA in vitro and in an experimental endocarditis model. **Microb Pathog**, v. 33, p. 73-79, 2002.

WANG, Y; LI, X; JIANG, L. et al. Novel mutation sites in the development of vancomycin-intermediate resistance in *Staphylococcus aureus*. **Front Microbiol.**, v. 10, p. 2163-215, 2017.

WATANABE, Y; CUI, L; KATAYAMA, Y. et al. Impact of rpoB mutations on reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 49, p. 2680-2684, 2011.

WEIGEL, L. M; CLEWELL, D. B; GILL, S. R. et al. Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. **Science.**, v. 302, p. 1569-71, 2003.

WEIJMER, M. C; VERVLOET, M. G; TER WEE, P. M. Compared to tunnelled cuffed haemodialysis catheters, temporary untunnelled catheters are associated with more complications already within 2 weeks of use. **Nephrol Dial Transplant.**, v. 19, p. 670-677, 2004.

WERTHEIM, H. F; VOS, M. C; OTT, A. et al. Risk and outcome of nosocomial *Staphylococcus aureus* bacteraemia in nasal carriers versus non-carriers. **Lancet**, v. 364, p. 703-5, 2004.

WERTHEIM, H. F. L; VERVEER, J; BOELENS, H. A. et al. Effect of mupirocin treatment on nasal, pharyngeal, and perineal carriage of *Staphylococcus aureus* in healthy adults. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 49, p. 1465-1467, 2005.

WIEGAND, I; HILPERT, K; HANCOCK, R. E. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. **Nat. Protoc.**, v. 3, p. 163-175, 2008.

WISPLINGHOFF, H; BISCHOFF, T; TALLENT, S. M. et al. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. **Clin Infect Dis.**, v. 39, p. 309-17, 2004.

WORTH, L. J; SPELMAN, T; HOLT, S. G. et al. Epidemiology of infections and antimicrobial use in Australian haemodialysis outpatients: findings from a Victorian surveillance network, 2008-2015. **J Hosp Infect.**, v. 97, p. 93-98, 2017.

WU, J. N; GAN, T. E; ZHU, Y. X. et al. Epidemiology and microbiology of nosocomial bloodstream infections: analysis of 482 cases from a retrospective surveillance study. **J Zhejiang Univ-Sci B**, v. 16, p. 70-77, 2015.

YAMAKAWA, J; AMINAKA, M; OKUZUMI, K. et al. Heterogeneously vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (hVISA) emerged before the clinical introduction of vancomycin in Japan: a retrospective study. **J Infect Chemother.**, v. 18, p. 406-9, 2012.

YARETS, Y; RUBANOV, L; NOVIKOVA, I. et al. The Biofilmforming capacity of *Staphylococcus aureus* from chronic wounds can be useful for determining Wound-Bed Preparation methods. **EWMA J**, v. 13, p. 7-13, 2013.

YARWOOD, J. M; SCHLIEVERT, P. M. Quorum sensing in *Staphylococcus* infections. **J Clin Invest**, v. 112, p. 1620-1625, 2003.

YEAMAN, M. R; FILLER, S. G; SCHMIDT, C. S. et al. Applying Convergent Immunity to Innovative Vaccines Targeting *Staphylococcus aureus*. **Frontiers From Immunology.**, v. 5, p. 1-21, 2014.

YOON, Y. K; KIM, J. Y; PARK, D. W. et al. Predictors of persistent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia in patients treated with vancomycin. **J Antimicrob Chemother.**, v. 65, p. 1015-1018, 2010.

ZHANG, H; LI, L; JIA, H. et al. Surveillance of Dialysis Events: one year experience at 33 outpatient hemodialysis centers in China. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1-7, 2017.

ZHU, W; CLARK, N. C; MCDUGAL, L. K. et al. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with Inc18-like *vanA* plasmids in Michigan. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 52, p. 452- 457, 2008.

ZHU Y. *Staphylococcus aureus* virulence factors synthesis is controlled by central metabolism. 2010. Tese de Doutorado em Veterinária e Ciências Biomédicas. University of Nebraska-Lincon. Lincon. 2010.



ZHU, Y. L; MEI, Q; HU, L. F. et al. Vancomycin MICs of the resistant mutants of *S. aureus* ATCC 43300 vary based on the susceptibility test methods used. **J Antibiot**, v. 65, p.307-10, 2012.

**ANEXO A** - Tabela com os dados gerais de todas as 41 amostras de *S. aureus* parentais em comparação com suas respectivas derivadas.

Data de isolamento	Amostra	PFGE	CMI parental	CMI derivada	Autólise*	Biofilme*	$\Delta$ hemolisi na*	Fita se*	Fosfolipase*	Este rase*	Hemolisi na*	Dnase*	<i>G. mellone lla</i> *	Adesão ao Fibrinogênio*	Viabilidade Metabólica*
nov/12	12	B2	1	1.5	↑	↓	=	↓	=	=	=	=		↓	↑
dez/12	19	B1	1	2	↑	↓	↑	↓	=	↓	=	=			
dez/12	21	C1	1.5	2	↑	↓	=	=	=	=	=	=		=	↑
dez/12	23	$\beta$	1	1	↑	↓	=	↓	=	↓	=	=	↓		
dez/12	28	H1	1	2	↓	=	↓	↓	↓	↓	↓	=	↑		
mar/13	50	B1	1	1.5	↑	↓	↓	↓	↓	↓	↓	=		↓	↑
abr/13	65	G2	1	1.5	↑	=	=	↓	=	=	=	=		↑	↑
abr/13	67	B1	1	1.5	↑	↓	↓	=	=	↓	↓	=			
mai/13	70	B1	1	1.5	↑	=	↓	↓	=	↓	↓	=			
jun/13	77	B2	0.5	1.5	↑	↓	=	=	=	=	=	=		↑	↑
jun/13	78	$\zeta$	1	1	↓	=	=	=	↓	↓	↓	=		↓	↓
jun/13	88	$\theta$	1.5	1.5	↓	=	↓	↓	↓	↓	↓	=		↓	↓
jul/13	99	E2	1	2	↓	↓	↓	=	=	↓	↓	=	↓	↑	↓
ago/13	101	$\kappa$	1	1.5	↓	↑	↓	=	=	=	↓	=			
ago/13	104	A1	1.5	1	↑	↓	↑	=	=	↓	↓	=			
set/13	113	$\lambda$	1	1	↓	=	=	=	=	↓	↓	=		↑	↑
out/13	122	C2	1	1	↑	↓	=	=	↑	=	=	=		=	↑
out/13	127	C2	1	1.5	↓	=	↓	=	↑	↑	↓	=	↑**		
nov/13	131	D3	1	1	↑	=	=	=	=	=	=	=		↓	↓
nov/13	137	A2	1.5	1.5	↓	=	↓	=	=	=	=	=		↑	↓
dez/13	145A	$\mu$	1	1	↑	=	↓	=	=	=	↓	↑		↓	=

dez/13	145B	D2	1	1.5	↓	↓	=	=	↓	↓	=	=			
dez/13	146	v	1.5	1.5	↑	=	=	=	=	↓	=	=		↓	=
dez/13	150	o	1.5	1.5	↓	↓	=	=	=	↓	=	=		↑	↑
jan/14	161	π	1.5	1.5	↑	↓	=	=	↓	↓	↓	=		↑	↑
jan/14	166	G1	1	1.5	↑	=	=	=	↓	↓	↓	=		↑	=
jan/14	170	ρ	0.5	2	↑	=	=	n/d	↓	=	=	↓			
jan/14	172	F3	1	2	↑	=	=	=	=	=	=	=		↑	↑
jan/14	177	H1	1	1	↓	=	↑	↑	↓	↓	↓	=		↑	↑
jan/14	182	D1	1	1.5	↓	=	=	=	=	=	=	=		↓	↑
fev/14	184	ς	1	1.5	↑	=	=	↑	=	↓	=	=		↑	↑
mar/14	191	σ	1	1	↑	↓	=	=	=	↓	↓	=		↓	↑
mar/14	194	τ	1.5	1.5	↑	=	=	↓	↓	=	=	↑		↑	=
mar/14	195	F1	1	2	↑	↑	=	↑	↑	↓	↓	=		↑	↑
mar/14	198	E1	1	1	↓	↓	=	=	=	=	↓	=			
abr/14	200	u	1	1.5	↑	↓	=	=	=	=	↓	=		=	=
abr/14	201	F2	1	1.5	↓	↓	=	↑	↓	=	=	=		↓	↓
abr/14	214	φ	1	1.5	↑	=	=	↑	↓	=	=	=		↑	↑
mai/14	216	χ	1	1	↑	↓	=	=	↓	↓	↓	=		↓	↓
jul/14	223	A1	1	1.5	↑	↓	=	↑	↓	↓	↓	=			
set/14	240	B1	1.5	1.5	↑	↓	=	↑	=	=	↓	=		↓	↑

\* dados em comparação com a respectiva amostra derivada.

\*\* sem significância estatística.