

Clarice Iomara Silva

**ANÁLISE DE GENES REGULADORES DA SÍNTESE DA
PAREDE CELULAR EM ISOLADOS DE *Staphylococcus aureus*
HETERORRESISTENTES À VANCOMICINA (hVISA)
OBTIDOS EM HOSPITAIS DE SANTA CATARINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia, da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre em Farmácia na área de concentração de Análises Clínicas

Orientadora: Profa. Dra. Thaís Cristine Marques Sincero
Coorientador: Prof. Dr. Alessandro Conrado de Oliveira Silveira

Florianópolis
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Silva, Clarice Iomara

Análise de genes reguladores da síntese da parede celular em isolados de *Staphylococcus aureus* heterorresistentes à vancomicina (hVISA) obtidos em hospitais de Santa Catarina / Clarice Iomara Silva ; orientadora, Thaís Cristine Marques Sincero ; coorientador, Alessandro Conrado de Oliveira Silveira. - Florianópolis, SC, 2016.

135 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Microbiologia. 3. Biologia molecular. 4. Sequenciamento. 5. Expressão gênica. I. Sincero, Thaís Cristine Marques. II. Silveira, Alessandro Conrado de Oliveira. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. IV. Título.

**“ANÁLISE DE GENES REGULADORES DA
SÍNTESE DA PAREDE CELULAR EM ISOLADOS
DE *Staphylococcus aureus*
HETERORRESISTENTES À VANCOMICINA
(hVISA) OBTIDOS EM HOSPITAIS DE SANTA
CATARINA”**

POR

Clarice Iomara Silva

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelo(a) Orientador(a) e membros da Banca Examinadora, composta pelos Professores Doutores:

Banca Examinadora:



Prof(a). Dr(a). Sharbel Weidner Maluf (UFSC – Membro Titular)



Prof(a). Dr(a). Maria Claudia Santos da Silva (UFSC – Membro Titular)



Prof(a). Dr(a). Pedro Alves d'Azavedo (UECSPA - Membro Titular)



Prof(a). Dr(a). Thais Cristine Marques Sincero (UFSC – Orientador(a))

Profa. Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da
UFSC

Florianópolis, 21 de março de 2016.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Thaís Sincero pela oportunidade e ensinamentos adquiridos no decorrer destes dois anos de trabalho e estudo.

À professora Maria Luiza Bazzo, que gentilmente abriu as portas do seu laboratório, sem o qual não seria possível desenvolver etapas importantes deste trabalho.

Ao professor Alessandro Silveira pela sugestão do tema e apoio no desenvolvimento da pesquisa.

À professora Claudia Regina dos Santos por toda amizade, companheirismo, compreensão e apoio nestes dois anos de trabalho juntas.

À chefe da Divisão de Análises Clínicas Maria Cláudia Santos da Silva pela colaboração e flexibilização de horários no HU.

À professora Ana Carolina pela orientação quanto as análises estatísticas aplicadas neste estudo.

Às colegas Ana Paula e Aline, da empresa Neopropecta, pela extrema gentileza, atenção e ensinamentos quanto a técnica de RTqPCR.

Aos colegas Saulo Martins, Iris Mattos, Camila Matiollo e Cristiane Coelho pelo carinho, atenção e colaboração na etapa final deste trabalho.

A todos os servidores e colegas da Divisão de Análises Clínicas do HU pelo apoio e torcida.

Aos colegas do Setor de Microbiologia pelos ensinamentos e apoio ao ingresso na pós-graduação, em especial, Karine e Ivonete pelo carinho de sempre.

À amiga Lisléia Golfetto pelo carinho, amizade e colaboração incondicional em todas as etapas deste projeto.

A todos os alunos do Laboratório de Biologia Molecular e Micobactérias pela amizade e apoio direto na execução deste trabalho.

A todas os bolsistas e estagiários do Setor de Toxicologia pelo apoio e trabalho desenvolvido nos meus períodos de ausência.

A todas as bolsistas do Laboratório de Microbiologia Molecular Aplicada, em especial, a Nathalia Cividini que participou mais ativamente deste projeto.

A equipe do laboratório LAMEB pelo auxílio, atenção e gentileza.

À Sandra Andrade por todo carinho, incentivo e suporte emocional.

Às queridas amigas Daniela Tartari e Caetana Zamparette pela parceria e amizade construída no decorrer destes dois anos.

Aos meus grandes amigos e colegas de faculdade Alexsander Augusto, Carolinne Gianvechio e Flávia Neri por serem sempre os maiores torcedores e incentivadores do meu crescimento pessoal e profissional.

Às minhas grandes amigas Emerita, Michelle, Adriana Scotti, Letícia e Andressa por todo apoio, torcida, amizade e companheirismo.

A Zenaide e Zé Humberto Prim pelo carinho e incentivo.

Aos meus pais Rosa e Elifas Levi por todo suporte, educação e amor incondicional.

Ao meu irmão Pedro Ivo, minha família e amigos por estarem sempre ao meu lado, mesmo que fisicamente distantes.

Ao Rodrigo Prim pela compreensão, apoio, amor e companheirismo.

E, finalmente, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho fosse possível.

RESUMO

A exposição de *Staphylococcus aureus* a glicopeptídeos pode determinar mudanças transcricionais em genes envolvidos na biossíntese da parede celular. Somado a isso, mutações em sistemas reguladores de dois componentes como *graSR*, *vraSR*, *walKR*, além do gene codificador da unidade beta da RNA polimerase (*rpoB*) têm sido descritas e apresentam possível relação causal com o desenvolvimento de *S. aureus* com heterorresistência intermediária à vancomicina (hVISA). O fenômeno da heterorresistência é caracterizado pela presença de raras sobpopulações de células que apresentam níveis mais elevados de resistência e está associado a falha terapêutica, maior tempo de hospitalização, além de ser de difícil detecção laboratorial. Os mecanismos genéticos envolvidos neste fenótipo são pouco compreendidos e sua análise pode conduzir a determinação de marcadores moleculares da resistência além de auxiliar na validação de métodos laboratoriais que possibilitem um diagnóstico mais fácil, rápido e acurado. Nosso estudo contou com 12 isolados de hVISA obtidos de quatro hospitais de Santa Catarina e objetivou analisar dados de sequenciamento e o perfil de transcrição nos genes *graSR*, *vraSR*, *walKR* e *rpoB* destas amostras. Cinco isolados apresentaram-se mutados em pelo menos um dos genes avaliados. As mutações *rpoB* H481N e *graS* T224I foram as mais frequentes, seguidas pelas mutações *graR* D148Q e *walK* A468T. As mutações *walK* R222K e *vraR* E59D foram observadas com menor frequência, porém assim como as demais mutações citadas estão mais sugestivamente implicadas na aquisição da resistência em nossas amostras. Mutações em *vraS* e *walR* não foram descritas. Da mesma forma, alterações do perfil transcricional nos genes *vraSR* e *walKR* não foram observadas neste estudo. No entanto, a exposição à vancomicina aumentou o nível de expressão dos genes *rpoB* e *graSR* em pequeno número de nossas amostras, indicando a possível participação dos mesmos no desenvolvimento do fenótipo hVISA. Embora algumas questões permanecem sem resposta, nosso estudo possibilitou a descrição de alterações genéticas em isolados com redução de suscetibilidade à vancomicina que naturalmente ocorreram em hospitais de Santa Catarina, auxiliando, ainda, na compreensão dos prováveis mecanismos envolvidos na determinação deste fenótipo.

Palavras-chaves: hVISA; VISA; sistema regulador de dois componentes (SRDC)

ANALYSIS OF REGULATORY GENES INVOLVED IN CELL WALL SYNTHESIS IN *Staphylococcus aureus* HETERO-RESISTANT TO VANCOMYCIN (hVISA) ISOLATED FROM HOSPITALS OF SANTA CATARINA

ABSTRACT

Staphylococcus aureus constantly exposed to glycopeptides determines transcriptional changes of genes involved in cell wall biosynthesis. Furthermore, mutations in two-component regulatory systems as *graSR*, *vraSR*, *walKR* and in gene encoding RNA polymerase beta unit (*rpoB*) have been described and may be related to heteroresistant vancomycin-intermediate *S. aureus* (hVISA). Heteroresistance is characterized by the presence of a rare population of cells with larger levels of resistance, and it is associated with therapy failure and longer hospital stays. Furthermore their laboratory detection is very difficult. The genetic mechanisms involved in this phenotype are poorly understood and their analysis may lead to the determination of molecular markers and validation of methods, which could make laboratory diagnosis earlier, faster and accurate. Our study included 12 hVISA isolates obtained from four hospitals in Santa Catarina and aimed to analyze sequencing data and the transcription levels of *graSR*, *vraSR*, *walKR* and *rpoB* genes. Five isolates showed mutations in at least one of the genes evaluated. The *rpoB* H481N and *graS* T224I were the most frequent mutations, followed by *graR* D148Q and *walK* A468T. The *walK* R222K and *vraR* E59D mutations were observed less frequently, but like other mutations were more involved in the acquisition of resistance in our samples. Mutations were not described in *vraS* and *walR*. Similarly, changes in the transcriptional profile of *vraSR* and *walKR* genes were not observed in this study. However, exposure to vancomycin increased the expression level of *rpoB* and *graSR* genes in small number of our samples. This indicated their possible participation in the development of hVISA phenotype. Although some questions remain unanswered, our study allowed the description of genetic changes in strains with reduced sensitivity to vancomycin that naturally occurred in hospitals in Santa Catarina and helped understanding the mechanism involved in the determination of this phenotype.

Key words: hVISA; VISA; two-component regulator system (TCRS)

LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Construção da parede celular em <i>Staphylococcus aureus</i>	27
Figura 02. Mecanismo de resistência endógeno à vancomicina em <i>S. aureus</i>	29
Figura 03. Análise do perfil populacional pela área sob a curva (PAP-AUC).....	38
Figura 04. Elementos regulatórios ligados aos fenótipos hVISA e VISA.....	50
Figura 05. Fluxograma de atividades desenvolvidas no estudo.....	57
Figura 06. Programa LinRegPCR, demonstrando as curvas de amplificação de todas as amostras analisadas por RT-qPCR, com as respectivas taxas de eficiência.....	66
Figura 07. Mutações pontuais na sequência aminoacídica encontradas nos genes <i>graS</i> e <i>graR</i>	72
Figura 08. Mutações pontuais na sequência aminoacídica encontradas no gene <i>graS</i> da amostra 10.....	73
Figura 09. Mutações pontuais na sequência aminoacídica encontradas no gene <i>walK</i>	74
Figura 10. Mutações pontuais na sequência aminoacídica encontradas no gene <i>rpoB</i>	75
Figura 11. Mutação pontual na sequência aminoacídica encontrada no gene <i>vraR</i>	75
Figura 12. Curvas de dissociação para os <i>amplicons</i> dos genes de referência <i>hu</i> , <i>pta</i> , <i>tpi</i> e <i>gyrB</i>	77
Figura 13. Produtos gerados em reação de RT-qPCR para todos os genes do estudo.....	78

Figura 14. Gráfico de estabilidade da expressão dos genes de referência testados, gerado pelo programa geNorm.....	79
Figura 15. Gráfico de variação da estabilidade dos genes de referência, gerado pela ferramenta <i>online</i> RefFinder.....	79
Figura 16. Determinação da eficiência por amostra, pelo programa LinRegPCR.....	80
Figura 17. Gráfico da expressão relativa do gene <i>graSR</i> nas amostras 69 e Mu50.....	81
Figura 18. Gráfico da expressão relativa dos genes <i>graSR</i> , <i>vraSR</i> , <i>walKR</i> e <i>rpoB</i> nas amostras 69, 80, 92, Mu3 e Mu50.....	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Estudos de prevalência de hVISA em diferentes países.....	43
Tabela 02. Amostras utilizadas no estudo e locais de coleta.....	56
Tabela 03. Iniciadores da reação de qPCR utilizados no estudo.....	62
Tabela 04. Mutações pontuais na sequência aminoacídica dos genes <i>graSR</i> , <i>vraSR</i> , <i>walkR</i> e <i>rpoB</i> em diferentes amostras clínicas de hVISA relativas a amostra VSSA sequenciada neste estudo.....	71
Tabela 05. Temperaturas de dissociação por <i>amplicon</i>	76
Tabela 06. Eficiência dos iniciadores da reação de qPCR.....	81
Tabela 07. Comparação das mutações encontradas no presente estudo com as descritas na literatura.....	94

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

- aa - aminoácido
- A – refere-se ao aminoácido alanina em sequências de proteína
- A – refere-se ao nucleotídeo adenina em sequências de DNA
- Aps - do inglês *Antimicrobial peptide sensing* (sinônimo de GraSR)
- Amplicon* - produto gerado na reação de PCR
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- ATCC - do inglês *American Type Culture Colletion*
- AUC - área sob a curva
- BHI - caldo infusão de cérebro e coração, do inglês *Brain Heart Infusion*
- BHIA - ágar infusão de cérebro e coração, do inglês *Brain Heart Infusion agar*
- BHIA4V - ágar BHI contendo 4 µg/mL de vancomicina
- BHIA6V - ágar BHI contendo 6 µg/mL de vancomicina
- BHIAC4V - ágar BHI contendo 4 µg/mL de vancomicina e 1g/litro de Digestão pancreática de caseína
- BIVR - Resistência à vancomicina induzida por betalactâmicos
- BrCAST - Comitê Brasileiro de Teste de Sensibilidade aos antimicrobianos
- C - refere-se ao nucleotídeo citosina em sequências de DNA
- cDNA - ácido desoxidoribonucléico complementar
- CI - intervalo de confiança
- CIM - concentração inibitória mínima
- CLSI - do inglês *Clinical and Laboratory Standards Institute*
- Cq - ciclo de quantificação
- D – refere-se ao aminoácido aspartato em sequências de proteínas
- DMSO - dimetilsulfóxido
- DNA - ácido desoxidoribonucléico
- DO - densidade óptica
- D-Glu – refere-se ao resíduo D-glutamato
- D-Ala – refere-se ao resíduo D-alanina
- D-Ala-D-Ala – refere-se ao resíduo D-alanil-D-alanina
- EDTA - ácido etilenodiaminotetracético
- Etest - teste de tira gradiente
- EUA - Estados Unidos da América
- EUCAST - do inglês *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*
- F – refere-se ao aminoácido fenilalanina em sequências de proteína
- FURB - Fundação Universidade Regional de Blumenau
- G – refere-se ao aminoácido glicina em sequências de proteína

G - refere-se ao nucleotídeo guanina em sequências de DNA
GISA - *S. aureus* com resistência intermediária aos glicopeptídeos
GlcNac - ácido N-Acetilglicosamina
graSR – refere-se ao gene *graSR*
GraSR – refere-se a proteína GraSR
GRD - teste gradiente dupla face, do inglês *Glycopeptide Resistance Detection*
gyrB - refere-se ao gene de referência *gyrB*
hVISA - *S. aureus* com heterorresistência intermediária à vancomicina
hGISA - *S. aureus* com heterorresistência intermediária aos glicopeptídeos
hu – refere-se ao gene de referência *hu*
I – refere-se ao aminoácido isoleucina em sequências de proteínas
K – refere-se ao aminoácido lisina em sequências de proteínas
L – refere-se ao aminoácido leucina em sequências de proteínas
L-Ala – refere-se ao resíduo L-alanina
L-Lis – refere-se ao resíduo L-lisina
MALDI-TOF - do inglês *Matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry*
mecA – refere-se ao gene *mecA*
MHA - ágar *Mueller Hinton*
MHA5T - ágar *Mueller Hinton* contendo 5 µg/mL de teicoplanina
MET - macro Etest
MRSA - *S. aureus* resistente à metilicina
MurNac - ácido N-acetilmurâmico
NaCl - cloreto de sódio
NCCLS - atual CLSI, do inglês *National Committee for Clinical Laboratory Standards*
PAP-AUC - análise de perfil de populações - área sob a curva
pb - pares de bases
PBP - proteína ligadora de penicilina
PCR - reação em cadeia de polimerase
PDIF - teste de pré-difusão do inglês
pta - gene *pta*
Q – refere-se ao aminoácido glutamina em sequências de proteínas
qPCR - reação em cadeia de polimerase quantitativa
R – refere-se ao aminoácido arginina em sequências de proteínas
R² - coeficiente de correlação
RNA - ácido ribonucléico
rpoB - gene *rpoB*
RT - transcrição reversa

RT-qPCR - reação em cadeia de polimerase quantitativa precedida de transcrição reversa
S – refere-se ao aminoácido serina em sequências de proteínas
SA-RVS - *S. aureus* com suscetibilidade reduzida à vancomicina
SRDC - sistema regulador de dois componentes
sVISA - *slow VISA*
T – refere-se ao aminoácido treonina em sequências de proteínas
T – refere-se ao nucleotídeo timina em sequências de DNA
TAE - tampão Tris-Acetato-EDTA
 T_M - temperatura de dissociação ou *melting*
Tn1546 - *transposon* 1546
tpi - gene de referência *tpi*
UFC - unidade formadora de colônia
UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina
USP - Universidade de São Paulo
UV - ultravioleta
V – refere-se ao aminoácido valina em sequências de proteínas
vanA – refere-se ao gene *vanA*
vanB – refere-se ao gene *vanB*
vanC – refere-se ao gene *vanC*
VISA - *S. aureus* com resistência intermediária à vancomicina
VLSA - *S. aureus* com baixo nível de resistência à vancomicina
vraSR – refere-se ao gene *vraSR*
VraSR – refere-se a proteína VraSR
VRE - *Enterococcus sp.* resistente à vancomicina
VRSA - *S. aureus* resistente à vancomicina
VSSA - *S. aureus* suscetível à vancomicina
walKR – refere-se ao gene *walKR*
WalKR – refere-se a proteína WalKR

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
2.1	<i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	25
2.2	PAREDE CELULAR DE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	26
2.3	MECANISMO DE AÇÃO DA VANCOMICINA	28
2.4	REDUÇÃO DE SUSCETIBILIDADE À VANCOMICINA	29
2.5	DEFINIÇÃO DA RESISTÊNCIA À VANCOMICINA	31
2.6	DETECÇÃO LABORATORIAL.....	33
2.6.1	Métodos de triagem e confirmação	33
2.6.2	Métodos alternativos de detecção	38
2.7	EPIDEMIOLOGIA	40
2.8	IMPACTO CLÍNICO.....	43
2.9	FATORES DE RISCO	45
2.10	TRATAMENTO	45
2.11	DETERMINANTES GENÉTICOS DE RESISTÊNCIA	46
3	OBJETIVOS	53
3.1	GERAL	53
3.2	ESPECÍFICOS	53
4	METODOLOGIA	55
4.1	ASPECTOS ÉTICOS	55
4.2	OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS.....	55
4.3	DELINEAMENTO E FLUXOGRAMA DO ESTUDO	56
4.4	DETECÇÃO DAS MUTAÇÕES NOS GENES ANALISADOS	57
4.4.1	Sequenciamento das amostras	57
4.4.2	Análise das sequências	58
4.5	ANÁLISE DE EXPRESSÃO DOS GENES ANALISADOS	58
4.5.1	Extração de RNA total	58
4.5.2	Tratamento das amostras de RNA com enzima DNase	59
4.5.3	Determinação do rendimento e quantificação do RNA total	60
4.5.4	Síntese de DNA complementar (cDNA)	60
4.5.5	Desenho dos iniciadores utilizados na qPCR	61
4.5.6	Reação em cadeia de polimerase quantitativa (qPCR)	62

4.5.6.1	Determinação da contaminação do RNA com DNA genômico.....	63
4.5.6.2	Análise da eficiência da reação de qPCR.....	64
4.5.6.3	Análise da especificidade dos iniciadores.....	66
4.5.6.4	Escolha dos genes normalizadores.....	67
4.5.6.5	Quantificação relativa de transcritos de RNAm.....	69
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	70
5	RESULTADOS	71
5.1	DETECÇÃO DAS MUTAÇÕES NOS GENES ANALISADOS.....	71
5.2	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES ANALISADOS.....	76
5.2.1	Padronização da RTqPCR	76
5.2.1.1	Análise da especificidade dos iniciadores.....	76
5.2.1.2	Escolha dos genes normalizadores.....	78
5.2.1.3	Análise da eficiência da reação de qPCR.....	80
5.2.2	Avaliação da expressão gênica nos isolados.....	81
6	DISCUSSÃO	85
7	CONCLUSÃO.....	102
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	105
9	PERSPECTIVAS.....	107
	REFERÊNCIAS.....	109
	APÊNDICE A.....	131

1 INTRODUÇÃO

Staphylococcus aureus é, há mais de 100 anos, reconhecido como um importante patógeno humano (LOWY, 1998). Desde a sua descoberta, em 1880, responde por uma ampla gama de infecções, demonstrando versatilidade e um grande potencial patogênico (DEURENBERG; STOBBERINGH, 2008). Embora constituinte natural da microbiota humana, é uma das espécies de maior importância no quadro de infecções comunitárias e nosocomiais devido, especialmente, a seu extenso arsenal de fatores de virulência e a sua capacidade de adaptação e resistência (SANTOS et al., 2007). Este microorganismo é particularmente importante como causa frequente de bacteremia e demais infecções adquiridas em ambiente hospitalar, representando o principal patógeno relacionado a infecções de pele e corrente sanguínea e o segundo patógeno mais frequentemente isolado em pacientes hospitalizados com pneumonia no Brasil (GALES et al., 2009). Seu tratamento tem se tornado cada vez mais difícil e preocupante em função da emergência de isolados multirresistentes (LOWY, 1998).

A primeira resistência descrita em *S. aureus* foi em 1942 (dois anos após a introdução da penicilina para uso médico), quando as primeiras bactérias produtoras de penicilinasas foram isoladas em diferentes regiões, limitando o uso deste antimicrobiano nos anos seguintes (DEURENBERG; STOBBERINGH, 2008; ROSSI; ANDREAZZI, 2006). Em 1960, quando a meticilina foi lançada no mercado, aproximadamente 80% dos *S. aureus* eram resistentes à penicilina (ROSSI; ANDREAZZI, 2006). A meticilina foi a primeira penicilina semissintética resistente à ação das penicilinasas introduzida como alternativa terapêutica para isolados produtores de betalactamases. Sua introdução, entretanto, foi rapidamente seguida pelos primeiros relatos de resistência, decorrente da aquisição do gene *mecA*, gerando grande preocupação na comunidade médica e científica (HORNE et al., 2009). No Brasil, entre os anos de 2005 e 2008, eles representaram 31% das infecções nosocomiais provocadas por *S. aureus* (GALES et al., 2009). Uma vez que estas bactérias são resistentes aos betalactâmicos e, usualmente apresentam resistência a outras classes de antimicrobianos (CLSI, 2015), os glicopeptídeos, especialmente a vancomicina, passaram a ser opção para tratamento de infecções graves por MRSA (ENA et al., 1993; HOWDEN et al., 2010a). O início dos anos 90, dessa forma, apresentou um perceptível aumento no uso deste antimicrobiano (TENOVER; BIDDLE; LANCASTER, 2001).

A crescente utilização da vancomicina conduziu ao surgimento de resistência e a conseqüente redução de sua eficácia contra MRSA no ambiente clínico. O primeiro isolado de *S. aureus* com redução de suscetibilidade à vancomicina foi relatada no Japão em 1997 (HIRAMATSU et al., 1997a), sendo posteriormente observada em países de todo mundo (ZHANG et al., 2015). No Brasil, seu primeiro relato ocorreu em 2001 no estado de São Paulo (OLIVEIRA et al., 2001).

O fenótipo VISA (*S. aureus* com resistência intermediária à vancomicina) está associado a concentrações inibitórias mínimas (CIMs) entre 4 e 8 µg/mL, e seu mecanismo parece envolver um processo adaptativo, acompanhado por mutações em diferentes determinantes genéticos (ALAM et al., 2014; HOWDEN et al., 2010a; SAITO et al., 2014), resultando em um significativo espessamento da parede celular (CUI et al., 2006a). Assim como acontece com MRSA, o alto custo biológico gerado pela resistência aos glicopeptídeos faz com que sua expressão ocorra de forma heterogênea (HIRAMATSU et al., 1997b). Infecções provocadas por isolados heterorresistentes (hVISA), onde somente uma pequena fração da população bacteriana apresenta redução de suscetibilidade à vancomicina, estão cada vez mais associadas com falha terapêutica e prolongado tempo de hospitalização, quando comparadas aos isolados sensíveis (BAE et al., 2009; CASAPAO et al., 2013; CHARLES et al., 2004a; VAN HAL; PATERSON, 2011). Ainda assim, frente ao uso massivo da vancomicina, espera-se que isolados com este perfil venham a ser cada vez mais encontrados, justificando seu monitoramento constante por meio de técnicas laboratoriais adequadas (MANFREDINI; PICOLI; BECKER, 2011).

Os métodos convencionais de detecção laboratorial falham em detectar este fenótipo, e muitas vezes necessitam de prolongados períodos de incubação para melhoria dos parâmetros de sensibilidade (CHANG et al., 2015; HOWDEN et al., 2010a). A abordagem mais confiável e reprodutível é a análise do perfil populacional pela área sob a curva (PAP-AUC) que, embora considerada padrão-ouro, é bastante trabalhosa, cara e inadequada à rotina laboratorial (SATOLA et al., 2011; VAN HAL et al., 2011).

Considerando que os métodos de triagem laboratorial e, por conseqüência, os dados epidemiológicos e o impacto clínico do fenótipo hVISA não são totalmente conclusivos, a sua aplicação para situações clínicas é extremamente difícil (GOMES; WARD; LAPLANTE, 2015). Nesse sentido, o conhecimento dos determinantes genéticos da resistência em bactérias com redução de suscetibilidade à vancomicina se faz

essencial e importante, uma vez que conduzirá ao desenvolvimento de marcadores moleculares ou validação de metodologias mais rápidas e acuradas de detecção laboratorial.

Embora o exato mecanismo e os eventos genéticos responsáveis por este fenótipo não estejam claramente elucidados, modificações genéticas nos sistemas reguladores de dois componentes *graSR*, *vraSR*, *walKR* e no gene codificador da subunidade beta da RNA polimerase (*rpoB*) estão mais frequentemente associados (HAFER et al., 2012; HOWDEN; PELEG; STINEAR, 2014) e podem ter importantes implicações no desenvolvimento da heterorresistência, justificando assim, a sua pesquisa.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus* pertence à família *Staphylococcaceae* e possui 51 espécies, muitas das quais podem ser isoladas de amostras biológicas humanas (EUZEBY, 2016). Bactérias desse gênero fazem parte da microbiota residente de vários sítios anatômicos humanos, e são, ao mesmo tempo, membros do grupo de patógenos Gram positivos invasivos, conhecidos como cocos piogênicos, que provocam uma variedade de doenças supurativas em humanos e animais (BAIRD-PARKER, 1972). Os estafilococos têm aproximadamente 0,5 a 1,5 μm de diâmetro. São imóveis, catalase positivos, anaeróbios facultativos, não esporulados e, geralmente crescem agrupados, com aspecto semelhante a cachos de uva. Podem ser divididos em dois grupos com base na síntese da enzima coagulase. Bactérias não produtoras de coagulase são geralmente pouco invasivas, estando, porém, bastante associadas a infecções sérias como patógenos oportunistas (BAIRD-PARKER, 1972; WINN JR et al., 2008).

A espécie de maior interesse clínico, especialmente em ambiente hospitalar, é o *Staphylococcus aureus*, uma espécie coagulase positiva, produtora de pigmento amarelo-ouro (característica que deu nome a espécie, do latim *aurum*) (LOWY, 1998) que pode causar desde infecções relativamente benignas, como lesões cutâneas, até infecções sistêmicas, potencialmente fatais (SANTOS et al., 2007). Embora seja membro transitório ou persistente da microbiota normal humana, responde por uma grande variedade de infecções agudas e crônicas como foliculites, furúnculos, carbúnculos, endocardite, osteomielite, artrite, meningite, septicemia e enterocolite, constituindo uma das principais espécies causadoras de infecções nosocomiais e da comunidade (BAIRD-PARKER, 1972; WINN JR et al., 2008). Sua grande importância como patógeno reside na combinação de numerosos fatores como: os variados determinantes de virulência (hemolisinas, lipases, proteases, enterotoxinas, moléculas de adesão, etc.); a capacidade de evadir-se do sistema imune do hospedeiro; o seu caráter invasivo, e ainda, a sua imensa facilidade em desenvolver mecanismos de resistência à ação de antimicrobianos (ARCHER, 1998; LOIR; BARON; GAUTIER, 2003).

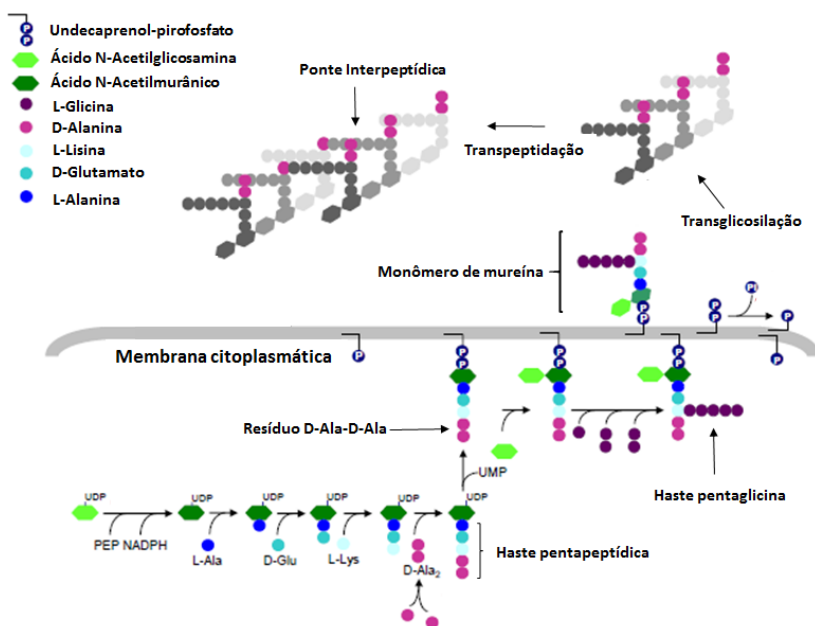
2.2 PAREDE CELULAR DE *Staphylococcus aureus*

A parede celular de *S. aureus* é uma estrutura dinâmica importante para a manutenção da integridade da célula e para interações críticas entre o hospedeiro e o agente patogênico. Está localizada sob uma cápsula polissacarídica mais externa e é composta por uma complexa estrutura extracelular rica em açúcares e aminoácidos (chamada de peptidoglicano), por ácidos teicóicos, ácidos lipoteicóicos e proteínas (GARDETE; TOMASZ, 2014). A composição da parede celular confere rigidez à célula e é capaz de evitar sua ruptura, uma vez que um ambiente hipertônico é necessário à manutenção e multiplicação celular. Cada cadeia de peptidoglicano é construída por subunidades dissacarídi-peptídicas (também chamadas de monômeros de mureína) compostas pelos ácidos N-acetilglicosamina (GlcNac) e N-acetilmurâmico (MurNac) e por dez aminoácidos (TAVARES, 2001). Para produzir as camadas de peptidoglicano, seus precursores monoméricos precisam ser sintetizados no interior da célula e transferidos para o exterior por meio de veículos lipídicos presentes na membrana citoplasmática (undecaprenol ou lipídeo II). O precursor MurNac, cujo terminal carboxil está ligado a um tronco pentapeptídico (L-Ala-D-Iso-Gln-L-Lis-D-Ala-D-Ala), ao ser transportado para exterior da célula, liga-se a uma unidade de GlcNac e a uma haste pentaglicina, compondo o monômero de mureína maduro (GEISEL et al., 2001; HIRAMATSU, 2001). Esta haste pentaglicina é um traço característico do peptidoglicano estafilocócico. Ela se liga ao grupamento amina da L-lisina do tronco pentapeptídico e o conecta ao penúltimo resíduo D-alanina de outro tronco, formando uma ponte interpeptídica entre duas cadeias de glicano (GIESBRECHT et al., 1998) (Figura 01). A acetilação do MurNac é outra importante característica do peptidoglicano estafilocócico e devido a isso, paredes celulares das células de estafilococos são raramente degradadas por lisozimas (ROGERS; PERKINS; WARD, 1980).

Duas enzimas participam da construção da estrutura de peptidoglicano: a glicosiltransferase, que polimeriza os monômeros de mureína (transglicosilação) e participa da construção das cadeias de peptidoglicano nascentes; e a transpeptidase, que liga as cadeias recém-formadas às cadeias pré-existentes (transpeptidação). A enzima transpeptidase é também conhecida como proteína ligadora de penicilina (PBP) devido a sua alta afinidade por beta-lactâmicos e reconhece resíduos de D-alanil-D-alanina (D-Ala-D-Ala) dos monômeros de mureína. Esta enzima atua na construção da parede celular nascente

clivando a ligação D-Ala-D-Ala do tronco pentapeptídico, de modo que a penúltima D-alanina é, então, ligada à ponta de uma haste pentaglicina saliente presente em camadas pré-existentes de peptidoglicano. Quando a ponte interpeptídica é formada, o terminal D-alanina do monômero de mureína é perdido e as cadeias de peptidoglicano são ligadas uma a uma, gerando a estrutura final da parede celular. Cerca de 20% de resíduos de D-Ala-D-Ala não são processados pelas PBP. Como resultado, muitos resíduos de D-Ala-D-Ala não transformados permanecem na parede celular de uma única célula de *S. aureus* (GEISEL et al., 2001; GIESBRECHT et al., 1998; HIRAMATSU, 2001).

Figura 1. Construção da parede celular em *Staphylococcus aureus*.



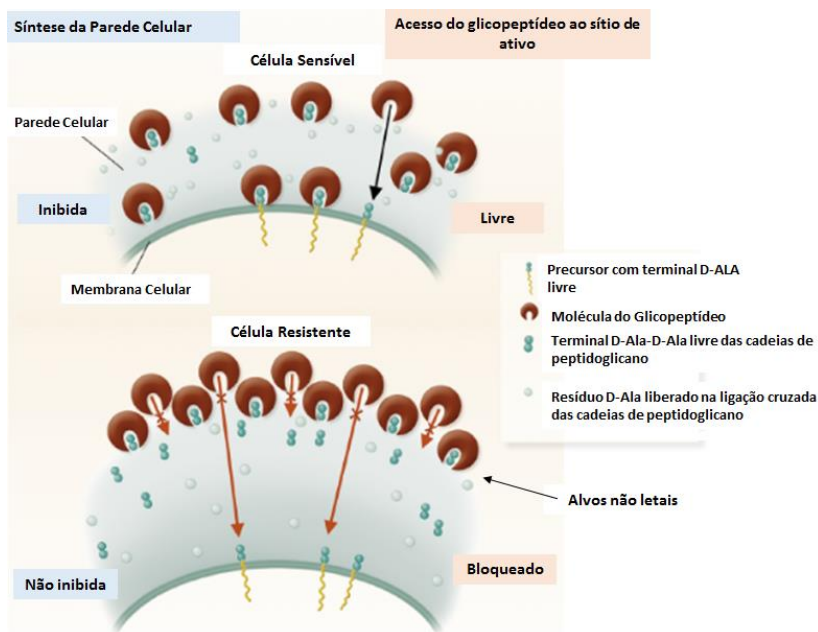
Fonte: adaptado de DENGLER et al., 2011.

A composição de peptidoglicano de diferentes isolados de *S. aureus* é altamente conservada, sugerindo que a composição é espécie-específica (GIESBRECHT et al., 1998). O principal local de síntese da parede em *S. aureus* é o septo de divisão celular (PEREIRA et al., 2007).

2.3 MECANISMO DE AÇÃO DA VANCOMICINA

Os glicopeptídeos, representados pela vancomicina e teicoplanina, são moléculas complexas sintetizadas por uma variedade de espécies, incluindo *Actinoplanes* e *Streptomyces*. São constituídos por grandes estruturas cíclicas, contendo em sua molécula aminoácidos e açúcares (REYNOLDS, 1989; TAVARES, 2001). Em contraste aos beta-lactâmicos, que possuem alta afinidade pela enzima transpeptidase, os glicopeptídeos se ligam aos resíduos D-Ala-D-Ala livres das cadeias precursoras de peptidoglicano e/ou dos monômeros de mureína (localizados próximos a membrana citoplasmática), impedindo a formação de ligações cruzadas entre as cadeias nascentes. A vancomicina, principal representante da classe, inibe a síntese da parede celular de *S. aureus* ou outros cocos Gram positivos e age formando um complexo estável, não covalente com a porção C-terminal do resíduo D-Ala-D-Ala da cadeia precursora de peptidoglicano. Oferece, dessa forma, um impedimento espacial à ação das PBPs (GEISEL et al., 2001; POOTOOLAL; NEU; WRIGHT, 2002). A sua ligação a resíduos D-Ala-D-Ala livres das camadas mais externas de peptidoglicano, embora possam interferir na formação das ligações cruzadas mediadas pelas PBP's, não inibe a síntese das cadeias nascentes e, são por isso chamados de alvos “não letais”. Por outro lado, a ligação do antimicrobiano aos monômeros de mureína próximos à membrana citoplasmática (no septo de divisão) ou a cadeias de peptidoglicano em formação é capaz de inibir completamente a síntese da parede, impedindo a célula de se multiplicar. Estes são os alvos efetivos (“letais”) (Figura 02) que precisam ser alcançados para que atividade antimicrobiana seja, de fato, efetivada (HIRAMATSU, 2001). A vancomicina para exercer sua função precisa, portanto, se difundir até o septo de divisão celular e se ligar aos precursores daquela localidade (PEREIRA et al., 2007). Alcançado o alvo efetivo (lipídeo II ligado a um monômero de mureína), ela inibe o estágio tardio da biossíntese do peptidoglicano, atuando fora da membrana citoplasmática por meio do bloqueio de acesso da PBP ao seu substrato. Por consequência, impede a formação da parede, propiciando um acúmulo de precursores monoméricos no interior da célula (REVERDY et al., 2001; REYNOLDS, 1989).

Figura 02. Mecanismo de resistência endógeno à vancomicina em *S.aureus*.



Fonte: adaptado de LOWY et al., 2003.

2.4 REDUÇÃO DE SUSCETIBILIDADE À VANCOMICINA

Após a emergência de enterococos resistentes à vancomicina (VRE), em meados dos anos 80, uma grande preocupação surgiu no que diz respeito ao potencial aparecimento de infecções por *S. aureus* resistentes aos glicopeptídeos, uma vez que já era conhecida a possibilidade de transferência de genes de resistência entre microorganismos Gram positivos (CETINKAYA; FALK; MAYHALL, 2000). A resistência total a glicopeptídeos em *S. aureus* foi primeiramente descrita em 2002 nos Estados Unidos (EUA) e ocorre devido a aquisição horizontal do gene *vanA*, presente em elementos genéticos móveis (Tn1546), provenientes de espécies de *Enterococcus sp.* Este mecanismo, chamado de “exógeno” (tipo *vanA*), confere alto nível de resistência (CIMs acima de 32 µg/mL) e resulta na substituição do resíduo terminal da haste pentapeptídica de D-Ala-D-Ala para D-Ala-D-Lac. O antimicrobiano não se liga eficientemente à nova estrutura gerada e, desse

modo, não consegue impedir a formação das ligações cruzadas da parede celular nascente (CHANG et al., 2003; MCCALLUM; BERGER-BÄCHI; SENN, 2010; WEIGEL, 2003). Esse tipo de resistência, apesar de importante, é relativamente raro entre *S. aureus* e não se espalha com rapidez. Em todo mundo, poucos exemplos de *S. aureus* resistentes à vancomicina (VRSA) foram reportados (HOWDEN et al., 2010a; SIEVERT et al., 2008).

Um outro mecanismo de redução de suscetibilidade, completamente diferente deste, foi observado pela primeira vez em um isolado clínico de *S. aureus* em 1997, no Japão (HIRAMATSU et al., 1997a), sendo posteriormente descrito em inúmeros países da Europa, Ásia, Oceania e América (ZHANG et al., 2015), incluindo o Brasil (OLIVEIRA et al., 2001; SILVEIRA, 2014). Antes disso, a redução de suscetibilidade à teicoplanina já havia sido detectada em amostras clínicas isoladas em hospitais da França (MAINARDI et al., 1995). Isolados de *S. aureus* exibindo resistência intermediária aos glicopeptídeos (denominados VISA, quando se refere à vancomicina ou GISA, quando se refere aos dois glicopeptídeos) caracterizam-se por apresentar um modesto declínio da suscetibilidade aos glicopeptídeos (CIMs que chegam a 8 ou 16 µg/mL) que, no entanto, é suficiente para provocar complicações na terapia, incluindo falha terapêutica. Este mecanismo, que é conhecido por resistência endógena, ocorre sem transferência de material genético, se desenvolve por meio de mutações gênicas em sistemas que controlam a síntese da parede celular e, em contraste à resistência exógena, é muito mais prevalente (GALBUSERA et al., 2011; HOWDEN et al., 2010a). Estudos demonstram que os isolados clínicos VISA apresentam, de modo geral, um espessamento da parede celular (CUI et al., 2003), que em alguns casos, pode estar associado ao aumento da síntese de peptidoglicano (HANAKI et al., 1998) e em outros, ao decréscimo da atividade de renovação celular ou autólise (SIERADZKI; PINHO; TOMASZ, 1999). Adicionalmente, Hanaki e colaboradores (1998) demonstraram produção três a cinco vezes maior de PBP 2 em isolados VISA quando comparados a isolados sensíveis.

Além disso, a redução da suscetibilidade está associada à diminuição, em maior ou menor grau, das ligações cruzadas das cadeias de peptidoglicano que resultam em aumento do número de resíduos D-Ala-D-Ala livres na parede celular (CUI et al., 2006a; SIERADZKI; TOMASZ, 1997, 2003). De fato, tem sido demonstrado que a vancomicina pode ser recuperada intacta da parede celular de isolados VISA, indicando que o antimicrobiano não é inativado, mas simplesmente, sequestrado pela bactéria por meio de sua ligação a estes

resíduos livres (LIU; CHAMBERS, 2003), fenômeno conhecido por *drug capture* (SIERADZKI; TOMASZ, 1997) ou *clogging* (HIRAMATSU, 2001). Pereira e colaboradores, em 2007, ainda propuseram uma redução na taxa de difusão da vancomicina nestes isolados.

O decréscimo da suscetibilidade aos glicopeptídeos por mecanismo endógeno é, portanto, um evento multifatorial uma vez que uma variedade de fatores biológicos (incluindo o aumento da síntese das cadeias de peptidoglicano, a redução da atividade autolítica e o espessamento da parede celular) podem limitar o acesso destes antimicrobianos ao seu sítio ativo na membrana citoplasmática (HOWDEN et al., 2010a; SRINIVASAN; DICK; PERL, 2002).

2.5 DEFINIÇÃO DA RESISTÊNCIA À VANCOMICINA

Uma grande confusão quanto às definições de resistência aos glicopeptídeos foi gerada na literatura dos últimos anos devido, especialmente, aos diferentes pontos de corte para interpretação de sensibilidade utilizados nos vários países onde os estafilococos com redução de suscetibilidade à vancomicina foram relatados (SRINIVASAN et al., 2002). Nos EUA, o CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*, antigo NCCLS) estabelece, há mais de 20 anos, os pontos de corte para a concentração inibitória mínima (CIM) e parâmetros para teste de disco difusão em isolados de *S. aureus* e outras bactérias. Os parâmetros para interpretação do teste de disco difusão para vancomicina foram modificados em 1998, quando foi reconhecido que isolados de *S. aureus* com resistência intermediária à vancomicina não eram detectadas por este método. Atualmente, o teste é contraindicado, podendo ser utilizado somente para testar o fenótipo VRSA, mediado por *vanA* (CLSI, 2015; EUCAST, 2015). Os critérios interpretativos de disco difusão para teicoplanina, a despeito da vancomicina, não foram reavaliados e, dessa forma, a capacidade do teste em diferenciar isolados de estafilococos intermediários/resistentes e isolados sensíveis à teicoplanina não é conhecida (CLSI, 2015).

Com relação à CIM de vancomicina, o ponto de corte clínico do EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*), para a resistência a este glicopeptídeo em *S. aureus* é ≥ 2 $\mu\text{g/mL}$, não existindo a categoria “resistência intermediária”. Os termos “*S. aureus* com resistência intermediária aos glicopeptídeos” (GISA ou VISA) e “*S. aureus* com heterorresistência intermediária aos glicopeptídeos” (hGISA ou hVISA), entretanto, são mantidos para os isolados com baixo nível de

resistência à vancomicina, não mediada pelo gene *vanA* (EUCAST, 2015). Outras terminologias, tais como “*S. aureus* com suscetibilidade reduzida à vancomicina” (SA-RVS) (TENOVER; MOELLERING, 2007), “*S. aureus* vancomicina tolerantes” (VT) (CÁZARES-DOMÍNGUEZ et al., 2015), ou ainda, “*S. aureus* com baixo nível de resistência à vancomicina” (VLSA) (HARAGA et al., 2002), também têm sido utilizadas para descrever estas bactérias. Quanto ao CLSI, inicialmente os pontos de corte para *S. aureus* eram 4 µg/mL para isolados sensíveis, 8 a 16 µg/mL para isolados com resistência intermediária e 32 µg/mL para resistentes. Em 2006, as CIMs foram reduzidas para 2 µg/mL e 16 µg/mL para isolados sensíveis e resistentes, respectivamente, de modo que a definição atual para isolados com resistência intermediária (VISA) estabelece CIMs entre 4 e 8 µg/mL (CLSI, 2015). Tal alteração refletiu a crescente quantidade de dados clínicos e microbiológicos que demonstravam a associação entre CIMs de 4 µg/mL (anteriormente consideradas sensíveis) e falha terapêutica com vancomicina (definida como infecção persistente por mais de sete dias após o início da terapia) (CHARLES et al., 2004), além do aumento da detecção de heterorresistência (TENOVER; MOELLERING, 2007). No Brasil, foi oficialmente lançado em 2014, o Comitê Brasileiro de Testes de Sensibilidade aos Antimicrobianos (BrCAST), que busca um consenso internacional e/ou harmonização com os comitês europeu (EUCAST) e americano (CLSI), embora esteja trabalhando para que a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) reconheça as normas do EUCAST como padrão oficial no país. Atualmente, está disponível a tradução das tabelas de pontos de cortes (segundo comitê europeu) e um documento sobre detecção de resistência de baixo nível, bem como de heterorresistência à vancomicina em *S. aureus* (BRCAST, 2016).

O fenômeno da heterorresistência em *S. aureus* refere-se à variabilidade da suscetibilidade à vancomicina em subpopulações de um único isolado. Dessa forma, um isolado heterorresistente contém duas populações de células: uma maioria suscetível e uma minoria da população resistente (SRINIVASAN; DICK; PERL, 2002). Estas raras subpopulações de bactérias (tipicamente 1 em cada 10^5 a 10^6 células) que apresentam níveis mais elevados de resistência, presumivelmente, servem como um reservatório que conduz a um eventual aparecimento da resistência homogênea à vancomicina, não mediada por *vanA* (EUCAST, 2015; HOWDEN et al., 2010a; RENZONI et al., 2011). São consideradas por alguns autores, as precursoras do fenótipo VISA, uma vez que a exposição prolongada ao antimicrobiano pode promover a seleção da população de células resistentes (CUI et al., 2006a; LIU; CHAMBERS,

2003). Mais recentemente, foi introduzida na literatura uma nova categoria fenotípica denominada sVISA (*slow VISA*) que foi assim denominada por apresentar uma taxa de crescimento extremamente lenta (colônias aparecem após 72h de incubação). Tais bactérias são capazes de resistir a concentrações relativamente altas do antimicrobiano (chegando a CIMs de 16 µg/mL ou 32 µg/mL) e podem servir como abrigo temporário para que os isolados hVISA consigam sobreviver ao tratamento com o glicopeptídeo (SAITO et al., 2014).

A definição e detecção laboratorial ideal de isolados hVISA permanecem incertas, uma vez que estes geralmente apresentam uma CIM para vancomicina dentro do intervalo de suscetibilidade, quando testados por métodos de rotina (como a microdiluição em caldo), ainda que uma pequena proporção da população de células esteja na categoria “resistência intermediária” (HIRAMATSU, 2001). Sendo assim, isolados de *S. aureus* com CIMs de 1 a 2 µg/mL (considerados sensíveis) podem ser heterorresistentes (CLSI, 2015) e a alteração dos pontos de corte pelos comitês de padronização internacionais, de fato, não auxiliaram na detecção laboratorial de isolados heterorresistentes com CIMs inferiores a 2 µg/mL (SADER; RHOMBERG; JONES, 2009). Apesar disso, a CIM sempre deve ser determinada ao utilizar a vancomicina como tratamento contra infecções graves por *S. aureus* e em casos selecionados, como por exemplo, quando há suspeita de falha terapêutica, o teste de triagem para detecção laboratorial de hVISA é justificável (EUCAST, 2015).

2.6 DETECÇÃO LABORATORIAL

2.6.1 Métodos de triagem e confirmação

As características morfológicas dos isolados hVISA podem ser bem diferentes da colônia padrão de *S. aureus* em placas de ágar. Alterações como redução da pigmentação e/ou do tamanho da colônia (*small colony variants*) são geralmente sutis, mas em alguns casos podem gerar uma morfologia “mista” a partir de culturas puras, confundindo o microbiologista e dificultando o diagnóstico laboratorial. Casos de infecções com má resposta clínica ao tratamento com vancomicina justificam o uso de métodos adequados para determinação de hVISA, sendo importante que para cada morfotipo proveniente de cultura de *S. aureus* seja realizado o teste de suscetibilidade à vancomicina (HOWDEN et al., 2010a; MARLOWE et al., 2001).

A metodologia mais indicada para determinação da CIM de vancomicina e teicoplanina em *S. aureus* é a microdiluição em caldo. Métodos como tiras gradientes (Etest), diluição em ágar ou sistemas de automação (MicroScan System - Siemmens; Vitek System - Biomèrieux; Sensititre System - TREK Diagnostic Systems; Phoenix System - Becton Dickinson) podem também ser utilizados para verificação da redução de suscetibilidade aos glicopeptídeos (CLSI, 2015; EUCAST, 2015).

Uma precisa detecção laboratorial de hVISA e VISA, entretanto, tem sido desafiadora e difícil (WOOTTON et al., 2007), uma vez que os resultados das CIMs por si só são limitados para distinguir estes isolados de *S. aureus* sensíveis à vancomicina (VSSA). Os níveis relativos de resistência à vancomicina e à teicoplanina podem variar bastante entre diferentes isolados VISA, e por esta razão, alguns autores sugerem uma classificação própria para tais bactérias (em classes A, B e C), embora esta não seja amplamente adotada (BOYLE-VAVRA et al., 2000; HOWDEN et al., 2010a). A variação também pode se manifestar num mesmo isolado, quando tratado por diferentes metodologias. Um estudo realizado por Manfredini e colaboradores (2011) comparou três métodos de determinação da CIM de vancomicina em MRSA (microdiluição, Etest e automação) e demonstrou que o Etest tende a superestimar o valor real das CIMs, quando comparado ao método de microdiluição, conforme já relatado em estudos anteriores (PAIVA et al., 2010; PRAKASH; LEWIS II; JORGENSEN, 2008; SADER; RHOMBERG; JONES, 2009; SWENSON et al., 2009). Apesar disso, este pode ser adotado como alternativa ao método recomendado, desde que sejam confirmados os isolados com CIMs superiores a 1,5 µg/mL, visando maior segurança terapêutica. Bactérias com esta característica, cujos valores de CIMs apresentam uma tendência ascendente (fenômeno conhecido por *MIC creep*) (STEINKRAUS; WHITE; FRIEDRICH, 2007) devem ser acompanhadas, pois podem abrigar linhagens hVISA (MANFREDINI; PICOLI; BECKER, 2011; SAKOULAS et al., 2004), embora já exista associação de hVISA com CIMs de vancomicina iguais ou menores que 1,0 µg/mL (CASAPAO et al., 2013). Considerando que a inconsistência de resultados ocorre também entre os métodos automatizados (SWENSON et al., 2009), recomenda-se que para fins de estudo ou decisões clínicas, a metodologia aplicada seja claramente descrita nos relatórios de resultados para CIM. Em função das limitações, uma quantidade cada vez maior de metodologias tem sido proposta, no sentido de auxiliar e aprimorar o rastreo e/ou confirmação destes fenótipos. Embora algumas delas sejam úteis para a detecção de VISA, a maioria não é adequada para a triagem de hVISA (HOWDEN et al., 2010a).

A variação e falta de reprodutibilidade entre os métodos quantitativos para detecção de hVISA podem ser atribuídas em grande parte às dificuldades para detectar a resistência em uma população heterogênea de células suscetíveis e resistentes. Os testes de suscetibilidade à base de ágar, apesar de serem mais sensíveis para detecção de subpopulações resistentes, requerem um tempo de incubação suficiente para a expressão do determinante de resistência e crescimento detectável, o que se traduz em tempos prolongados de incubação (24 h a 48 h, podendo chegar a 72 h) (MARLOWE et al., 2001; SAITO et al., 2014). Ainda assim, a baixa concentração do inóculo utilizado nestes métodos ($\sim 10^8$ UFC/ml - turbidez 0,5 da escala de McFarland) dificultam sua detecção laboratorial, considerando o caráter raro e instável do fenótipo hVISA (VOSS et al., 2007; WONGTHONG et al., 2015). Desse modo, os testes de triagem para a heterorresistência à vancomicina tendem a combinar condições que favoreçam o crescimento da subpopulação de células resistentes, como um inóculo bacteriano mais concentrado (2,0 McFarland), tempo de incubação prolongado (48 h ou mais) e uso de meios mais nutritivos, como o *Brain Heart Infusion agar* (BHIA) ou *Mueller Hinton agar* (MHA) com sangue (SATOLA et al., 2011). Isso porque isolados hVISA crescem lentamente e o espessamento da parede celular pode ser influenciado por nutrientes do meio (CUI et al., 2000; HIRAMATSU et al., 2014). Apesar de não ser útil para as determinações de CIM, o uso de agentes seletivos ou de condições de crescimento como o aumento da concentração de sal (WONG et al., 1999; WONGTHONG et al., 2015) ou diminuição da temperatura de incubação podem, também, auxiliar no rastreo da resistência à vancomicina, como já comentado por Tenover e colaboradores (1998).

Atualmente, os métodos de triagem mais utilizados para determinação de hVISA são: 1. o teste macro gradiente (Macro Etest ou MET), que utiliza um inóculo mais denso (2,0 McFarland) do que aquele utilizado nos testes convencionais, além de meio mais nutritivo; 2. o teste gradiente dupla face (GRD), que combina teicoplanina e vancomicina em uma única fita; 3. a triagem em ágar com teicoplanina (MHA5T), que utiliza placa de ágar *Mueller Hinton* contendo 5 $\mu\text{g/mL}$ de teicoplanina (EUCAST, 2015) e 4. a triagem em ágar com vancomicina (BHIA6V), onde colônias são selecionadas a partir do crescimento em ágar BHI contendo vancomicina na concentração de 6 $\mu\text{g/mL}$ (CLSI, 2015; HOWDEN et al., 2010a).

Uma diversidade de métodos tem sido avaliada com resultados variáveis (VAN HAL et al., 2011; VOSS et al., 2007), mas nenhuma técnica padronizada confiável foi estabelecida até o momento (CLSI,

2015; HOWDEN et al., 2010a; SATOLA et al., 2011), o que torna extremamente difícil o rastreamento de todos os pacientes cujas infecções por *S. aureus* não respondem à terapia com vancomicina (CLSI, 2015). De fato, os estudos têm demonstrado uma grande variação dos parâmetros de sensibilidade e especificidade entre os diversos métodos de triagem (CHANG et al., 2015; LEONARD et al., 2009; SATOLA et al., 2011; VAN HAL et al., 2011; VOSS et al., 2007; WALSH et al., 2001), o que provavelmente se deve a diferentes critérios de definição e rastreamento de hVISA ou à variabilidade das condições técnicas utilizadas como tempo de incubação, enriquecimento dos meios ou tamanho do inóculo bacteriano (SATOLA et al., 2011). De maneira geral, inóculos mais densos e tempos de incubação prolongados contribuíram de forma significativa para a melhoria do desempenho de grande parte dos métodos analisados (SAITO et al., 2014; SATOLA et al., 2011; VOSS et al., 2007), embora a baixa reprodutibilidade dos mesmos continue a ser um problema dentro do laboratório clínico (VOSS et al., 2007).

Considerando a irregularidade dos desempenhos dos testes de triagem, recomenda-se que estes sejam combinados, com intuito de melhorar a acurácia, o que muitas vezes eleva o custo laboratorial (HOWDEN et al., 2010a). Dessa forma, a escolha do método de triagem irá depender do número de isolados, do fluxo de trabalho e da capacidade de cada laboratório. Fatores-chave a serem considerados são a relevância do resultado na gestão hospitalar e a necessidade de rastreamento em pacientes de alto risco (HORNE et al., 2009).

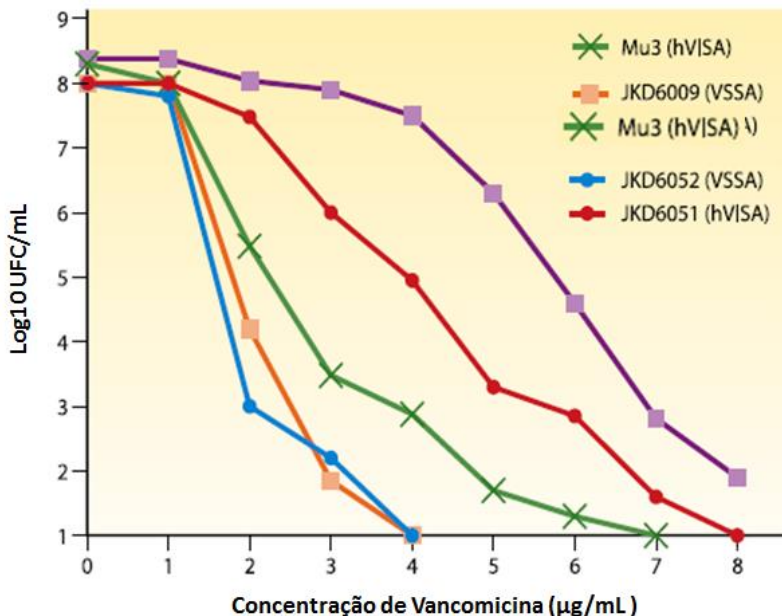
Para laboratórios onde o Etest é uma técnica viável, o MET ou GRD parecem métodos mais adequados por apresentarem maior acurácia (HORNE et al., 2009). O método MH5T é preferível ao método de triagem em ágar BHI com vancomicina (BHIAV) (HOWDEN et al., 2010a), uma vez que este último apresentou a maior variação interlaboratorial quando comparado aos demais métodos. Embora alguns estudos tenham apresentado médias de sensibilidade superiores a 90% (SATOLA et al., 2011; SILVEIRA et al., 2014), a maioria deles encontrou médias que não ultrapassaram 45% para este teste (SATOLA et al., 2011; VOSS et al., 2007; YUSOF et al., 2008).

Apesar da variabilidade, todo isolado com triagem positiva para redução de suscetibilidade aos glicopeptídeos, não identificado como VISA, pode potencialmente apresentar o fenótipo hVISA e deve ser investigado por método confirmatório, geralmente por meio de encaminhamento a um laboratório de referência (WALSH et al., 2001; CLSI, 2015; EUCAST, 2015).

O método confirmatório, considerado padrão-ouro para detecção de hVISA é o método PAP-AUC (análise do perfil populacional pela área sob a curva) modificado por Wootton e colaboradores (2001) (HIRAMATSU et al., 1997a; HOWDEN et al., 2010a; VAN HAL et al., 2011; WONGTHONG et al., 2015). Segundo esta técnica, diluições seriadas de uma suspensão bacteriana são inoculadas em diferentes placas de ágar BHI contendo concentrações crescentes de vancomicina. O número de colônias crescidas a 35 - 37°C após 48 h é plotado em um gráfico de crescimento padrão (PAP) (UFC *versus* concentração de vancomicina) a partir do qual realiza-se o cálculo da área sob a curva (AUC) de cada isolado teste (Figura 03). A cepa de referência Mu3 (ATCC 700698) é analisada paralelamente a todas as amostras testadas e suas áreas são, então, comparadas. Uma razão de área superior ou igual a 0,9 entre o isolado teste e a cepa padrão, confirma uma amostra hVISA (HOWDEN et al., 2010a; WOOTTON et al., 2001) (Figura 03). A grande vantagem desta técnica é a sua alta reprodutibilidade, porém trata-se de um método complicado e dispendioso aplicado somente em laboratórios de pesquisa, cujos resultados não são disponibilizados em um prazo clinicamente relevante (média de 3 a 5 dias) (CHARLES et al., 2004; SATOLA et al., 2011; WONGTHONG et al., 2015; WOOTTON et al., 2001).

De modo geral, devido aos crescentes relatos de má resposta ao tratamento com glicopeptídeos, é essencial que os laboratórios utilizem métodos adequados, rápidos e reprodutíveis para detecção de hVISA, de modo que sua prevalência e impacto clínico possam ser avaliados com confiabilidade e de maneira correta (SATOLA et al., 2011; VOSS et al., 2007; WOOTTON et al., 2007).

Figura 03. Análise do perfil populacional pela área sob a curva (PAP-AUC).



Fonte: adaptado de HOWDEN et al., 2010a.

2.6.2 Métodos alternativos de detecção

Com intuito de facilitar a detecção laboratorial, métodos alternativos têm sido propostos.

Um método alternativo (o teste de pré-difusão), desenvolvido para avaliar a suscetibilidade bacteriana a antimicrobianos de alto peso molecular (como vancomicina, teicoplanina, daptomicina ou polimixina) foi recentemente avaliado por Silveira e colaboradores (2014) apresentando boas taxas de especificidade (83,1%) e sensibilidade (91,7%), bem como um alto valor preditivo negativo (97,1%). O teste, além de possibilitar a avaliação da atividade antimicrobiana de glicopeptídeos e de daptomicina, pode também ser útil na triagem do fenótipo hVISA (SILVEIRA et al., 2014). Um outro método de difusão, que utiliza disco de vancomicina (20 µg) e um inóculo bacteriano de 1,0 McFarland em BHIA suplementado com 2% de NaCl é capaz de produzir resultado primário em 24 h e pode ser adequado para rastreamento de isolados com redução de suscetibilidade em pacientes com infecção crônica por

MRSA. O teste apresentou uma acurácia de 88,9%, quando usado um ponto de corte ≤ 12 mm, demonstrando taxas de sensibilidade de 71% (WONGTHONG et al., 2015).

Testes fenotípicos como a determinação do tempo de positividade da prova de coagulase em tubo, análise da resistência à lise por lisostafina e ensaios da atividade autolítica, apesar de não frequentemente utilizados com fins diagnósticos, demonstraram-se favoráveis ao rastreamento de isolados com redução de suscetibilidade à vancomicina (DODDANGOUDAR et al., 2011). Além disso, a redução da habilidade em formar biofilme também pode estar relacionada aos fenótipos hVISA e VISA (HOWDEN et al., 2006; SINGH et al., 2015).

Uma metodologia recentemente proposta permite a triagem destes isolados baseada na redução da produção da toxina δ hemolisina e sua visualização em ágar Columbia com 5% de sangue de carneiro (35 - 37 °C /24 h de incubação) (CAFISO et al., 2012a). O teste demonstrou maior sensibilidade quando comparado ao GRD em 24 h (88,9% contra 41,7%) e sua especificidade superou o GRD em 48 h de incubação (91,2% contra 82,4%), demonstrando ser uma alternativa rápida, barata e mais aplicável à rotina laboratorial.

Outra abordagem rápida e atualizada, é a microcalorimetria isotérmica, que tem como princípio a determinação de calor produzido durante a replicação e metabolismo bacterianos, apresentando bastante aplicabilidade na detecção ou caracterização de patógenos (BRAISSANT et al., 2013). O método foi recentemente testado para a triagem de isolados hVISA, VISA e VRSA. As suspensões bacterianas na escala 2,0 McFarland foram inoculadas em caldo BHI contendo diferentes concentrações de vancomicina e o fluxo de calor bacteriano foi mensurado a 37°C por 72 h. O método, além de oferecer um bom valor preditivo negativo (95%), demonstrou-se hábil em detectar isolados com redução de suscetibilidade à vancomicina em menos de 8 horas de incubação (ENTENZA et al., 2014). Sua grande desvantagem é o custo, que o torna inacessível a grande parte dos laboratórios com fins diagnósticos (WONGTHONG et al., 2015).

Importante destacar, por fim, a utilização da análise de proteômica para diferenciação de isolados hVISA/VISA e VSSA por método de MALDI-TOF, conforme recentemente validado e descrito por Mather e colaboradores (2016).

2.7 EPIDEMIOLOGIA

Após sua primeira descrição no Japão em 1997 (HIRAMATSU et al., 1997a), isolados hVISA têm sido reportados em todo mundo com taxas de prevalência estimadas entre 0% e 60% (Tabela 01) (ZHANG et al., 2015), embora seus verdadeiros valores sejam, de fato, desconhecidos. A significativa discrepância dos dados epidemiológicos, apesar de refletir a variação geográfica é, em grande parte, fruto da inconsistência metodológica do processo de detecção deste fenótipo; da ausência de padronização e, ainda, da variabilidade na definição da resistência em diferentes países (LIU; CHAMBERS, 2003; WALSH et al., 2001). Fatores como a fonte original do isolado, a população de pacientes testada e o número de amostras analisadas são também importantes interferentes nas taxas encontradas (VAN HAL; PATERSON, 2011).

Até o momento, especula-se que a incidência e prevalência reais de hVISA e VISA estejam subestimadas, possivelmente devido às características biológicas e ao próprio mecanismo de resistência destas bactérias. Isso porque, ao contrário de MRSA (gene *mecA*) e VRSA (gene *vanA*), os fatores genéticos associados a estes fenótipos permanecem obscuros e um método padronizado de biologia molecular que os detecte ainda não está disponível. Considerando que a técnica padrão para detecção de hVISA (PAP-AUC) é inadequada para a rotina em laboratórios clínicos (WOOTTON et al., 2001), é muito possível que um número significativo destes isolados tenha se perdido no decorrer do tempo (ZHANG et al., 2015).

Vale destacar que, dado o desconhecimento da importância médica e diante das dificuldades e custos envolvidos na detecção de isolados hVISA, seu rastreamento ficou por algum tempo limitado aos trabalhos de pesquisa (TENOVER et al., 1998) e, ainda que o fenômeno da heterorresistência fosse detectado na prática clínica e hospitalar, tal fato não era documentado em relatórios ou prontuários de pacientes (HUBERT et al., 1999). Considerando que nestes arquivos eram registrados somente as CIMs da população bacteriana majoritária (considerada suscetível, perante critérios interpretativos do CLSI), isolados clínicos verdadeiramente resistentes à vancomicina não haviam sido documentados até o ano de 2002, nos EUA, por exemplo (SRINIVASAN; DICK; PERL, 2002).

Ainda assim, o fenótipo hVISA é mais comum que o fenótipo VISA conforme já evidenciado por estudos em diferentes países (HANAKI et al., 2014; HUANG et al., 2015; ZHANG et al., 2015).

Um estudo de revisão sistemática realizado por Zhang e colaboradores (2015) analisou as prevalências de hVISA e VISA entre os isolados de MRSA de diferentes regiões do mundo, demonstrando que os isolados hVISA foram, em média, mais prevalentes (6,81%, na Ásia e 5,60%, na Europa e América) que os VISA (3,42%, na Ásia e 2,75%, na Europa e América) em todas as áreas geográficas analisadas.

Entre países asiáticos, os isolados hVISA são responsáveis por uma parcela substancial de MRSA, apresentando as maiores taxas de incidência quando comparados aos países americanos e europeus (ZHANG et al., 2015). Estudos em hospitais do Israel, Japão e China por exemplo, demonstraram taxas de prevalência de até 12,1% (MAOR et al., 2009), 18,5% (TAKATA et al., 2013) e 22,1% (LIU et al., 2015), respectivamente. Na Coreia, esta taxa alcançou 37,7% em estudo que analisou 268 pacientes com bacteriemia provocada por MRSA (PARK et al., 2012).

Em países europeus como França, Turquia, Polônia, Espanha, Bélgica, Irlanda, Itália, Grécia, Suíça, Alemanha e Inglaterra, as taxas de prevalência foram relativamente mais baixas, variando de 0,5% (PIÉRARD et al., 2004) a 25,9% (CAMPANILE et al., 2010), embora na França tenha sido encontrada uma taxa de 60%, em estudo realizado por Parer e colaboradores (2012). Um estudo com 117 pacientes de um hospital na Austrália, da mesma forma, apresentou uma taxa de prevalência relativamente alta de 47,9% (HORNE et al., 2009).

Nos EUA, um estudo de coorte retrospectivo conduzido com 202 pacientes do *Detroit Medical Center* (2002 a 2013) obteve a maior taxa de prevalência de isolados hVISA do país (18,8%) (CASAPAO et al., 2014), enquanto que, no Canadá, esta taxa não ultrapassou 5,3% (ADAM et al., 2010).

Entre países da América Latina, poucos dados foram levantados até o momento (VEGA et al., 2015; ZHANG et al., 2015). No México, um estudo realizado por Delgado e colaboradores (2007) encontrou apenas um isolado hVISA entre 152 MRSA analisados (0,7%). Um caso de hVISA em paciente com bacteriemia por MRSA associada a hemodiálise foi, ainda, relatado no Chile, e, apesar de sua confirmação não ter ocorrido por método padrão (GRD), esta foi a primeira descrição deste fenótipo em hospital público no país (VEGA et al., 2015). Em 2015, Gregorio e colaboradores (2015) publicaram uma prevalência de 3,3% de hVISA em hospital universitário da Argentina.

O primeiro relato de *S. aureus* com redução de suscetibilidade à vancomicina no Brasil ocorreu no ano de 2001, quando cinco amostras de MRSA isoladas de pacientes hospitalizados apresentaram CIM de 8

$\mu\text{g/mL}$ (na época classificadas como VRSA, conforme critérios do CLSI), além de espessamento da parede celular e ausência dos genes *vanA*, *vanB* e *vanC* (OLIVEIRA et al., 2001). Dois anos depois, foi documentado em São Paulo, um caso clínico de endocardite não responsiva a tratamento com vancomicina, resultante de infecção por VISA, negativa para o gene *vanA* (ANDRADE-BAIOCCHI et al., 2003). Em 2005, no estado de Minas Gerais, foi encontrada prevalência de 19,5% de hVISA em pacientes internados no Hospital das Clínicas de Uberlândia (MELO et al., 2005) e um isolado VISA (de 23 testadas) foi detectado em Santa Maria (RS) (MARQUES et al., 2013), no ano de 2012, embora a confirmação destes fenótipos não tenha ocorrido em nenhum destes trabalhos. Ainda em 2006, um estudo conduzido com pacientes do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, descreveu 18 isolados clínicos (12 MRSA e seis VSSA) como possíveis hVISA, baseado em método de triagem com ágar BHI contendo 4 $\mu\text{g/mL}$ de vancomicina e 48 h de incubação (LUTZ; BARTH, 2006). Mais recentemente, isolados hVISA confirmados por método padrão-ouro (PAP-AUC), foram detectados em hospitais do estado de Santa Catarina, onde se gerou um dado de prevalência de 9,7% (SILVEIRA et al., 2014).

Importante destacar que, apesar da variabilidade, essas taxas têm crescido em todo mundo no decorrer dos anos (HUANG et al., 2015; ZHANG et al., 2015). Estima-se que a frequência do fenótipo VISA entre 2010 e 2014 aumentou 3,87 vezes, quando comparada a anos anteriores a 2006. Somado a isso, a prevalência mundial de hVISA aumentou gradativamente, passando de 4,68% (95% CI 3,9 - 6,41), antes de 2006 a 7,01% (95% CI 12,12 - 14,42), entre 2010 e 2014 (ZHANG et al., 2015). Considerando que a prevalência do fenótipo hVISA é ainda significativamente maior em amostras de hemoculturas, que indicam infecção de alta gravidade para o paciente hospitalizado (ZHANG et al., 2015), é importante conhecer os dados epidemiológicos de cada região e desenvolver programas de vigilância que possam guiar uma antibioticoterapia bem fundamentada, predizendo o fracasso terapêutico e reduzindo a morbi/mortalidade associada a infecções provocadas por estes microorganismos (VAN HAL; PATERSON, 2011; VEGA et al., 2015).

Tabela 01. Estudos de prevalência de hVISA em diferentes países.

Prevalência	Métodos	N. Amostras	País	Referência
18,5%	MET PAP-AUC	162*	Japão	TAKATA et al., 2013
22,1%	PAP-AUC	77	China	LIU et al., 2014
37,7%	Etest PAP-AUC	268*	Coréia	PARK et al., 2012
12,1%	MET	223*	Israel	MAOR et al., 2009
25,9%	BHI MET PAP-AUC	139	Itália	CAMPANILE et al., 2010
0,5%	MH-5T PAP	1002	Bélgica	PIERARDI et al., 2004
60,0%	MHA	20	França	PARER et al., 2012
47,9%	CIM PAP	117	Austrália	HORNE et al., 2009
18,8%	PAP-AUC	266	EUA	CASAPAO et al., 2014
5,6%	GRD PAP-AUC	475	Canadá	ADAM et al., 2010
0,7%	PAP	152	México	DELGADO et al., 2007
3,3%	MET PDIF	92*	Argentina	GREGORIO et al., 2015

Legenda: O símbolo “ * ” indica que os isolados foram obtidos somente de amostras de sangue. BHIA4V: Ágar BHI contendo 4 µg/mL de vancomicina. CIM: Concentração Inibitória Mínima. Etest: Fita gradiente; GRD: Etest gradiente dupla face. MET: MacroEtest. MH-5T: Ágar Mueller Hinton com 5 µg/mL de teicoplanina. PAP: Análise do perfil populacional. PAP-AUC: Análise do perfil populacional – área sob a curva. PDIF: Pré-difusão. Fonte: desenvolvido pela autora.

2.8 IMPACTO CLÍNICO

O significado clínico do fenótipo hVISA não está claramente definido (HOWDEN et al., 2010a; JACOB; DIAZGRANADOS, 2013; KALIL et al., 2014). Embora um estudo de metanálise tenha demonstrado

ausência de associação significativa entre infecções por *S. aureus* com redução de suscetibilidade à vancomicina e o aumento do risco de morte em pacientes com bacteremia (KALIL et al., 2014), outros estudos sugerem que elevações na CIM de vancomicina estão diretamente associadas à falência terapêutica e maiores taxas de mortalidade (HAL; LODISE; PATERSON, 2012; JACOB; DIAZGRANADOS, 2013; MAVROS et al., 2012; SAKOULAS et al., 2004). Um trabalho publicado por Moise e colaboradores (2007) concluiu que a eficácia da vancomicina para bacteremia por MRSA está severamente comprometida quando a CIM se aproxima de 2 µg/mL, mesmo que estes isolados sejam definidos como suscetíveis pelas diretrizes nacionais. Takata e colaboradores (2013) demonstraram ainda que a combinação dos fenótipos hVISA e BIVR (resistência à vancomicina induzida por beta-lactâmicos) esteve também associada a maior probabilidade de morte em pacientes com bacteremia por MRSA, embora estudos adicionais sejam necessários para delinear o impacto clínico desta combinação (TAKATA et al., 2013).

Curiosamente, um estudo observou taxas reduzidas de choque em pacientes com infecção por isolados heterorresistentes em comparação com isolados sensíveis, demonstrando uma possível relação deste fenótipo com virulência atenuada, conforme já observado em modelos animais de infecção por VISA (HOWDEN et al., 2010a; SORIANO et al., 2008). Existem evidências, entretanto, de que os fenótipos hVISA estão associados com persistência de bacteremia, maior tempo de internação e piores desfechos clínicos (BAE et al., 2009; CASAPAO et al., 2013; FONG et al., 2009; VAN HAL; PATERSON, 2011).

Desse modo não se sabe se o aumento da resistência é, de fato, o responsável por falha no tratamento com glicopeptídeos ou se é uma consequência direta da mesma, especialmente porque muitos trabalhos não esclarecem em que momento hVISA ou VISA foram detectadas no curso da infecção (HOLMES; JOHNSON; HOWDEN, 2012). Somado a isso, faltam estudos prospectivos bem controlados, que permitam esclarecer se os relatos de morte em pacientes com infecções por hVISA são diretamente atribuíveis a este microorganismo ou não (CHARLES et al., 2004; HOWDEN et al., 2010a; MAOR et al., 2007). A falta de padronização na identificação, associada a discrepâncias entre os estudos e às diferentes populações de pacientes analisadas, dificultam ainda mais a determinação do impacto clínico e o papel deste fenótipo na falência do tratamento com vancomicina (LIU; CHAMBERS, 2003).

2.9 FATORES DE RISCO

Os fatores de risco associados a elevação da CIM da vancomicina são semelhantes aos de desenvolvimento de hVISA e incluem infecções com alta carga bacteriana, bacteremia persistente, tempo prolongado de exposição ao medicamento, idade aumentada do paciente e falha terapêutica com vancomicina (FONG et al., 2009; HOLMES; JOHNSON; HOWDEN, 2012; HOWDEN et al., 2006; SATOLA et al., 2011).

As infecções por hVISA pareceram ocorrer, ainda, em pacientes com doenças subjacentes graves como malignidade, diabetes, insuficiência renal e/ou naqueles que tenham sido submetidos recentemente a procedimento cirúrgico (CHARLES et al., 2004; HOWDEN et al., 2010a).

Além disso, estudos sugerem que a incidência de hVISA aumenta rapidamente quando a CIM de vancomicina se encontra entre 1 e 2 µg/mL, de forma que a incidência para isolados com CIM de 2 µg/mL chega a aproximadamente 40% (CHEN et al., 2011). Ao que tudo indica, a exposição à vancomicina funciona como pressão seletiva atuando como principal fator de risco para a conversão do fenótipo hVISA ao fenótipo VISA (KATAYAMA et al., 2009).

2.10 TRATAMENTO

Relatos crescentes de resistência e falhas terapêuticas com vancomicina enfatizam a necessidade de opções alternativas para o tratamento de infecções associadas a hVISA ou VISA. Preferencialmente, a escolha da melhor opção terapêutica deve estar fundamentada tanto em aspectos clínicos quanto em resultados laboratoriais (DEVI et al., 2015).

Tratamentos alternativos podem ser realizados por meio de pequeno número de antimicrobianos, cuja atividade antimicrobiana é potencialmente efetiva contra estes isolados. Dentre eles estão velhos agentes como rifampicina e ácido fusídico (em terapia combinada) (DEVI et al., 2015; GOMES; WARD; LAPLANTE, 2015) e novos agentes como os lipoglicopeptídeos semissintéticos (dalbavancin, oritavancin, telavancin) e as novas cefalosporinas anti-MRSA (ceftarolina e ceftobiprole). Na atualidade, entretanto, não há ensaios clínicos de tratamento contra hVISA e VISA e poucos casos de sucesso terapêutico frente a infecções graves provocadas por estes isolados têm sido reportados na literatura científica (HOWDEN et al., 2010a). A linezolida,

entretanto, tem surgido como opção terapêutica em casos de falha no tratamento com vancomicina, embora não apresente efeito bactericida que exceda a potência da vancomicina (HIRAMATSU, 2001). Da mesma forma, sucesso terapêutico contra isolados hVISA e VISA tem sido descrito com o uso de tigeciclina e quinupristin (derivado semissintético de estreptograminas) (HUANG et al., 2008). Quanto à daptomicina, tem sido postulado que sua suscetibilidade pode ser negativamente influenciada pelo aumento da resistência à vancomicina, especialmente devido ao significativo espessamento da parede celular encontrado nessas bactérias; no entanto, a associação de sulfametoxazol trimetopim a altas doses deste antimicrobiano pode ser uma terapia promissora contra isolados hVISA (CAFISO et al., 2012b; HIRAMATSU; CUI; KUWAHARA-ARAI, 2004). Embora alguns estudos sugiram que agentes antimicrobianos alternativos possam apresentar vantagens sobre a ação da vancomicina, nenhuma evidência definitiva de estudos randomizados confirmam esta hipótese (DEVI et al., 2015; FOWLER et al., 2006; GOMES; WARD; LAPLANTE, 2015).

2.11 DETERMINANTES GENÉTICOS DE RESISTÊNCIA

O genoma de bactérias do gênero *Staphylococcus* é constituído por um DNA circular cromossômico de aproximadamente 2800 pares de bases, além de fagos, plasmídeos e transposons. Os genes reguladores da virulência e resistência aos antimicrobianos são encontrados tanto em DNA cromossomal quanto em elementos extracromossomais, podendo ser transferidos entre espécies do mesmo gênero ou entre diferentes microorganismos Gram positivos (LOWY, 1998).

Tais bactérias podem, assim, desenvolver resistência aos antimicrobianos por meio de alterações da expressão e função de seus próprios genes (mutações) ou, ainda, pela aquisição externa de novos elementos genéticos. A localização de determinantes da resistência em elementos móveis aumenta ainda mais a sua mobilidade, contribuindo para a disseminação horizontal dos mesmos por mecanismos de transdução, transformação ou conjugação (MCCALLUM; BERGER-BÄCHI; SENN, 2010).

A bactéria *S. aureus* faz uso de todos os meios conhecidos para o desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos (MCCALLUM; BERGER-BÄCHI; SENN, 2010). A alteração de suscetibilidade aos glicopeptídeos, entretanto, se dá por meio de dois mecanismos possíveis. Diferente do mecanismo exógeno, que confere alto nível de resistência e

ocorre pela aquisição do gene *vanA* herdado de bactérias do gênero *Enterococcus*, os determinantes genéticos do mecanismo endógeno, que responde pelos fenótipos hVISA e VISA, não estão completamente elucidados (HOWDEN et al., 2010a; MCALEESE et al., 2006). Mais de 20 genes podem estar relacionados à redução de suscetibilidade à vancomicina (MATSUO; CUI; KIM, 2013; SAITO et al., 2014), de modo que esta se desenvolve como resultado do acúmulo de múltiplas alterações genéticas, incluindo mutações gênicas e/ou alterações regulatórias (BOYLE-VAVRA et al., 2000; CUI et al., 2003).

Uma vez demonstrado o espessamento e síntese ativada da parede celular como importantes fatores vinculados à resistência endógena (CUI et al., 2003; HANAKI et al., 1998), um interesse significativo em mecanismos moleculares da resistência em isolados hVISA e VISA tem se concentrado nas vias genéticas da regulação e biossíntese da parede celular (HOWDEN et al., 2010a).

De modo geral, tanto o fenótipo MRSA, quanto o VISA e hVISA, são desenvolvidos, direta ou indiretamente, em resposta à estresses ou quaisquer sinais de danos provenientes do ambiente externo, sejam estes decorrentes de grupos individuais de antimicrobianos ou provenientes de outras fontes de injúria. Estudos indicam que o estresse global provocado por antimicrobianos ativos contra a parede celular, como betalactâmicos e glicopeptídeos, podem provocar alterações no padrão de expressão gênica que resultam em estímulo da síntese da parede celular (MCALEESE et al., 2006; QURESHI; YIN; BOYLE-VAVRA, 2014).

Os principais facilitadores do processo de regulação são os sistemas reguladores de dois componentes (SRDC) (JORDAN; HUTCHINGS; MASCHER, 2008). Estes sistemas consistem de uma proteína sensora ancorada à membrana plasmática (sensor histidina quinase), cuja resposta a estímulos ambientais ativa uma segunda proteína citoplasmática com função reguladora (regulador de resposta). As quinases sensoras, ao detectarem um sinal ambiental passam por um processo de autofosforilação e em seguida transferem um grupo fosforil para o regulador intracelular, que promove, então, a regulação da transcrição gênica (GALBUSERA et al., 2011; MADIGAN et al., 2010). Este grupo é altamente específico e, geralmente, está desativado sob condições normais de crescimento, sendo ativado somente na presença de um agente indutor (que pode ser um antimicrobiano ou não) resultando, assim, em elevados níveis de resistência (MCCALLUM; BERGER-BÄCHI; SENN, 2010).

Supostos genes candidatos dos fenótipos hVISA e VISA foram reportados em múltiplos estudos e geralmente, estão associados com as vias de renovação e autólise, além de incluir reguladores globais da biossíntese da parede celular. Genes como *walkK*, *walR*, *rpoB*, *sarA*, *graR*, *graS*, *vraF*, *vraG*, *clpP*, *ccpA*, *prsA*, *vraR*, *vraS* e *yvqF* já foram listados (CUI et al., 2009; HOWDEN et al., 2010a, 2011; KATAYAMA et al., 2009; MATSUO et al., 2011; SAITO et al., 2014; SHOJI et al., 2011) e são encontrados em mais de 95% dos *S. aureus* (ALAM et al., 2014). Genes reguladores da expressão da virulência também têm sido associados (*sigB*, o sistema *quorum sensing agr* e o *sarA*), embora nenhum deles esteja especificamente vinculado à resistência endógena (ALAM et al., 2014; CUI et al., 2006a; MCCALLUM; BERGER-BÄCHI; SENN, 2010). O elevado número de genes diferentemente regulados indicam que estes podem estar sob controle de reguladores comuns (MCCALLUM; BERGER-BÄCHI; SENN, 2010).

Embora um elevado número de mutações e modificações genéticas tenham sido descritas, estudos recentes indicam que os sistemas reguladores *walkR*, *vraRS*, *graRS*, além do gene codificador da subunidade beta da RNA polimerase, o gene *rpoB*, estão mais frequentemente implicados na redução de suscetibilidade à vancomicina em *S. aureus* (HAFFER et al., 2012; HOWDEN; PELEG; STINEAR, 2013; SHOJI et al., 2011; YOO et al., 2013).

O regulador-chave da resposta ao estresse da parede celular em *S. aureus* é o SRDC *VraRS* (JORDAN; HUTCHINGS; MASCHER, 2008). Recentemente, ele foi considerado como parte do operon de quatro membros constituído por *vraU*, *vraT* (ou *yvqF*), *vraS* e *vraR*. O gene *vraT* é considerado essencial para função de *VraSR* como regulador da síntese da parede celular (BOYLE-VAVRA et al., 2013; GARDETE et al., 2012).

A exposição a antimicrobianos engatilha a supra regulação do SRDC *VraSR* que responde ao estímulo gerado por danos a parede celular bacteriana (DENGLER et al., 2011). A depleção de enzimas essenciais à biossíntese da parede, como *MurF* e *PBP2*, pode induzir este sistema, demonstrando que a própria inibição da síntese, e não somente os mecanismos de dano, é capaz de sinalizar a sua ativação. Belcheva e colaboradores (2008) demonstraram que *VraR* é fosforilado e desfosforilado por *VraS* e que a atividade de *VraR* é dependente de alterações conformacionais induzidas pela fosforilação. O rápido processo de autofosforilação de *VraS* e subsequente fosfo-transferência para *VraR* sugerem que a resposta ao estresse celular é ativada muito rapidamente *in vivo*. Este sistema, dessa forma, regula um elevado

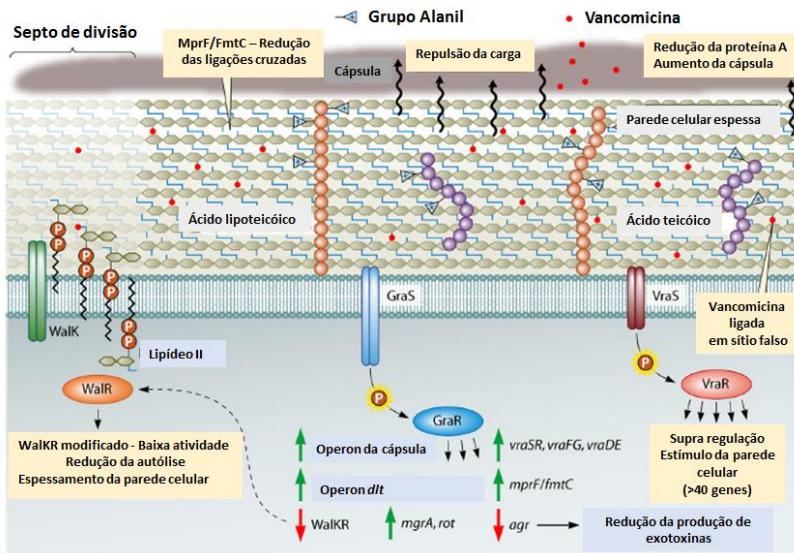
número de genes envolvidos na biossíntese das cadeias de peptidoglicano. Dentre eles estão genes como *murZ* (isoenzima MurA), *sgtB* (transglicosilase solúvel) e *fntA* (PBP acessória com baixa afinidade a betalactâmicos). Somado a isso, ele compõe o chamado “estímulo da parede celular”, que compreende um *status* de alerta celular, no qual uma série de enzimas estão ativadas como resposta ao dano. O SRDC *VraSR* é, portanto, um sistema “sentinela”, hábil em captar sinais de injúria da parede celular e, de imediato, estruturar uma resposta de defesa. Sua ativação tem como resultado final a redução de suscetibilidade aos antimicrobianos cujo principal alvo é a biossíntese de cadeias de peptidoglicano da parede celular (BELCHEVA; GOLEMI-KOTRA, 2008; KURODA et al., 2003; MCCALLUM; BERGER-BÄCHI; SENN, 2010).

O SRDC *GraSR*, também conhecido por *Aps* (*antimicrobial peptide sensing*), é abundante em bactérias Gram positivas e constitui um sistema independente da ação de antimicrobianos. Ele apresenta uma ligação genética ao sistema ABC transportador-*VraFG*, de modo que *GraSR* ativa a transcrição do operon *vraFG*, localizado a jusante do gene *graSR* (MCCALLUM; BERGER-BÄCHI; SENN, 2010; MEEHL et al., 2007). Os genes *graS*, *graR*, *vraF* e *vraG*, junto com o gene adjacente *graX*, constituem um sistema sensor para peptídeos catiônicos de cinco componentes (FALORD et al., 2011). De acordo com Cui e colaboradores (2005), a superexpressão de *GraSR* está possivelmente vinculada à redução de suscetibilidade à vancomicina em *S. aureus*, embora este sistema não seja necessariamente ativado por mecanismos de estresse da parede celular. A exata contribuição do complexo *GraSR-VraFG* na modulação da resistência é desconhecida (MEEHL et al., 2007), mas células contendo mutações nos genes *graSR* apresentaram alterações das propriedades do envelope celular, como redução da atividade autolítica e aumento de cargas superficiais positivas, favorecendo o aumento da resistência a peptídeos catiônicos como a daptomicina, por exemplo (NEOH et al., 2008). Já foi demonstrado ainda que *vraFG* não é o alvo único de *GraSR*, uma vez que inúmeros outros genes estão também sob sua regulação. Entre os genes regulados por *GraSR* estão o operon *dlt*, que codifica enzimas envolvidas na D-alanilação de ácidos teicóicos e *mprF*, que codifica uma enzima responsável pela modificação da lisina no processo de biossíntese de fosfatidilglicerol da membrana citoplasmática (MCCALLUM; BERGER-BÄCHI; SENN, 2010; MUZAMAL et al., 2014; SASS; BIERBAUM, 2009). O sistema *GraSR* regula ainda os genes *rot* e *mgrA* que codificam proteínas regulatórias do controle de expressão de outros genes codificadores de determinantes de

virulência, além daqueles cujos produtos são também proteínas reguladoras (HERBERT et al., 2007). Além disso, GraRS regula negativamente o gene *spa*, responsável pela produção de proteína A, cuja redução da expressão é fenômeno já conhecido entre isolados hVISA e VISA (CUI et al., 2009) (Figura 04).

O sistema WalKR (também conhecido por YycFG e VicRK) é um SRDC essencial, que funciona como um sistema de regulação do metabolismo da parede celular, sendo o mais importante regulador das enzimas hidrolases (DUBRAC et al., 2008; SHOJI et al., 2011). Ele está, portanto, vinculado a ação de autolisinas e sua depleção pode resultar em taxa reduzida da produção de peptidoglicano (MCCALLUM; BERGER-BÄCHI; SENN, 2010).

Figura 04. Elementos regulatórios ligados aos fenótipos hVISA e VISA.



Fonte: adaptado de HOWDEN et al., 2010a.

Apesar de significativos esforços, os determinantes genéticos dos fenótipos hVISA e VISA não foram completamente compreendidos e, até o momento, não há ensaios moleculares padronizados para detecção destes isolados. Com o custo cada vez menor das técnicas moleculares, estas podem ser mais facilmente aplicadas para identificar mutações associadas à resistência em isolados clínicos de MRSA. Para ir além de

uma associação e compreender a contribuição de cada mutação na determinação da resistência, é preciso, no entanto, o desenvolvimento de ferramentas que facilitem a manipulação genética de *S. aureus* (HOWDEN et al., 2010a).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar o papel de genes reguladores da biossíntese da parede celular bacteriana em isolados de *Staphylococcus aureus* com heterorresistência à vancomicina (hVISA) obtidos de amostras clínicas de hospitais de Santa Catarina.

3.2 ESPECÍFICOS

- Analisar o sequenciamento dos genes *graSR*, *vraSR*, *walKR* e *rpoB* de *S. aureus* com heterorresistência intermediária à vancomicina (hVISA), previamente isolados em hospitais de Santa Catarina;
- Verificar a presença de mutações quando comparados com o genoma de um isolado VSSA;
- Padronizar a quantificação dos genes *graSR*, *vraSR*, *walKR* e *rpoB* por RT-qPCR;
- Avaliar o nível de transcritos dos genes *graSR*, *vraSR*, *walKR* e *rpoB* de isolados hVISA;
- Avaliar a relação dos genes pesquisados com o desenvolvimento do fenótipo hVISA.

4 METODOLOGIA

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), sob número 974/12. Foram obedecidos os critérios éticos estabelecidos pela Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Ética em Pesquisa, Diretrizes e Normas Regulamentadores de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos, garantindo, dessa forma, o sigilo da identidade dos participantes da pesquisa (SILVEIRA et al., 2014).

4.2 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Os isolados hVISA foram obtidos e identificados em estudo anterior realizado por Silveira e colaboradores (2014), a partir de amostras clínicas coletadas em quatro hospitais de Santa Catarina, sendo três na cidade de Florianópolis (Hospital Governador Celso Ramos, Hospital Caridade e S.O.S Córdio) e um na cidade de Blumenau (Hospital Santa Isabel), no período compreendido entre novembro de 2009 e outubro de 2012 (Tabela 02). Foram obtidos no estudo um total de 124 isolados de MRSA (considerado um isolado por paciente), os quais foram submetidos a três testes de triagem para detecção do fenótipo hVISA (SILVEIRA et al., 2014).

Todos os isolados de MRSA com pelo menos um teste de triagem positivo foram confirmados por meio da metodologia de análise de perfil populacional (PAP-AUC) (SILVEIRA et al., 2014; WOOTTON et al., 2001). Dessa forma, obteve-se um total de 12 isolados, que foram então analisados neste estudo (Figura 05). Os isolados de hVISA foram identificados numericamente conforme a seguir: 10, 36, 43, 54, 69, 74, 80, 84, 92, SI4, SI11 e SI13 (Tabela 02).

Tabela 02. Amostras utilizadas no estudo e locais de coleta.

Amostra	Local	Cidade	Data de isolamento
10	Hospital 1	Florianópolis	23/11/2009
36	Hospital 1	Florianópolis	03/09/2010
43	Hospital 1	Florianópolis	14/10/2010
54	Hospital 1	Florianópolis	04/05/2011
69	Hospital 1	Florianópolis	01/07/2011
74	Hospital 2	Florianópolis	22/12/2011
80	Hospital 2	Florianópolis	09/01/2012
84	Hospital 1	Florianópolis	25/02/2012
92	Hospital 3	Florianópolis	18/08/2012
SI4	Hospital 4	Blumenau	28/09/2012
SI11	Hospital 4	Blumenau	20/02/2011
SI13	Hospital 4	Blumenau	12/04/2012

Dados obtidos em estudo anterior realizado por Silveira e colaboradores (2014).
Fonte: adaptado de SILVEIRA et al., 2014.

Os isolados foram mantidos congelados em freezer à temperatura de -80°C em solução “Skim Milk” (Difco®) no Laboratório de Biologia Molecular e Micobactérias da UFSC.

4.3 DELINEAMENTO E FLUXOGRAMA DO ESTUDO

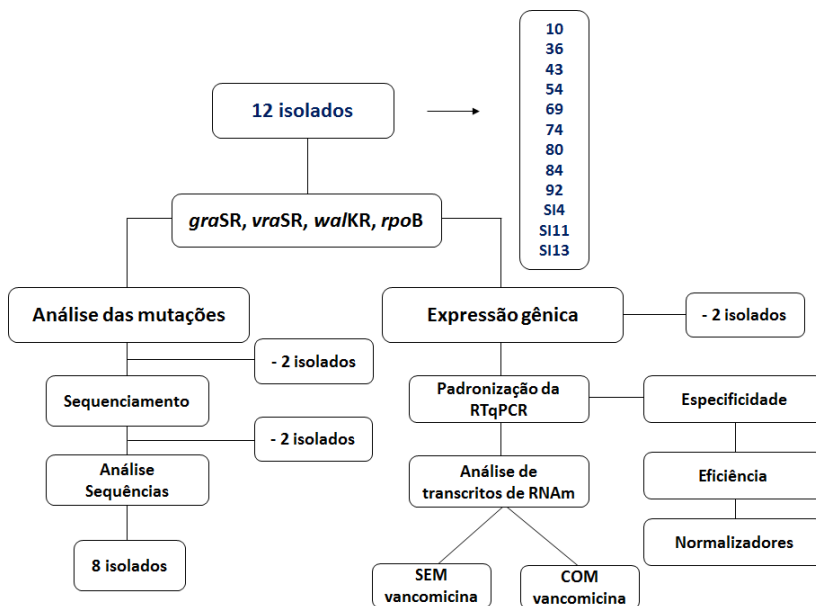
Trata-se de um estudo transversal observacional descritivo, realizado em parceria com o Laboratório de Microbiologia Clínica da Fundação Universidade Regional de Blumenau (FURB) e com o Laboratório de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (USP).

Para detecção de mutações nos genes *graSR*, *vraSR*, *walKR* e *rpoB* foram analisadas as 12 amostras clínicas de hVISA. Dados de sequenciamento de todos os isolados foram comparados aos de um isolado de *S. aureus* (VSSA), sequenciado em paralelo. Os isolados 74 e 84, identificados como *Staphylococcus haemolyticus* por análise de sequenciamento, foram excluídos do estudo. O processo de sequenciamento dos isolados 54 e 92 permanece em andamento e, portanto, dados referentes a tais amostras não foram relatados no presente trabalho (Figura 05).

Para avaliação da expressão dos genes *graSR*, *vraSR*, *walKR* e *rpoB* em *S. aureus* com heterorresistência intermediária à vancomicina

foram excluídas as amostras 74 e 84, previamente identificadas como *Staphylococcus haemolyticus*. O presente estudo, deste modo, trabalhou com um total de 13 amostras, sendo 10 isolados clínicos de hVISA e as cepas-controles Mu3 ATCC 700698 (hVISA), Mu50 ATCC 700699 (VISA) e *S. aureus* ATCC 25923 (VSSA).

Figura 05. Fluxograma de atividades desenvolvidas no estudo.



Fonte: desenvolvido pela autora.

4.4 DETECÇÃO DAS MUTAÇÕES NOS GENES ANALISADOS

4.4.1 Sequenciamento das amostras

O sequenciamento completo dos isolados foi realizado no Laboratório de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (USP) pelo Dr. John Anthony McCulloch, sob supervisão da Dra. Elza Mamizuka, em equipamento MiSeq (Illumina, Inc). A qualidade do sequenciamento foi avaliada por meio da utilização do programa *Phred/Phrap*. Valores para qualidade das bases acima de 30 foram consideradas aceitáveis para este estudo (1 erro a cada 1000 pb).

4.4.2 Análise das sequências

As sequências foram analisadas e comparadas por meio do programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* versão 7.2.5, usando como referência o isolado VSSA sequenciado neste estudo e a cepa VSSA N315 (*GenBank* BA00018.3) cujas sequências apresentaram 100% de similaridade. As sequências correspondentes a cada gene foram, ainda, comparadas a outras sequências publicadas no site *GenBank* sob os números de acesso seguintes: AP002394.1 (Mu3), BA000017.4 (Mu50), CP009361.1 (ATCC 25293 -VSSA) e CP002120.1 (JKD6008-VISA).

4.5 ANÁLISE DE EXPRESSÃO DOS GENES ANALISADOS

No processo de padronização da PCR quantitativa foi primeiramente realizada uma PCR convencional usando como molde o DNA genômico dos isolados hVISA. O objetivo desta etapa foi uma verificação prévia da funcionalidade dos iniciadores desenhados e a formação de bandas dos produtos de interesse, além da verificação atenta de bandas inespecíficas. As concentrações de uso ideais para o cDNA e o par de iniciadores foi realizada por meio da visualização da intensidade dos produtos formados e das eficiências obtidas por amostra nas reações de qPCR. Ademais, o processo de padronização consistiu ainda das etapas de avaliação da eficiência (item 4.5.6.2) e da especificidade dos iniciadores (item 4.5.6.3), além da escolha dos genes normalizadores (item 4.5.6.4).

4.5.1 Extração de RNA total

Para extração do RNA total dos isolados hVISA foi utilizado o Reagente Trizol® (Ambion®, Life Technologies), seguindo as instruções do fabricante. Os isolados previamente congelados em temperatura de -80°C foram semeados em ágar BHI (Merck, Alemanha) e incubados em estufa à 35-37°C, por 48 h. Em seguida, foi preparada suspensão bacteriana em 30 mL de caldo BHI (Merck, Alemanha) livre de vancomicina e em 30 mL de caldo BHI com vancomicina (Sigma-Aldrich, EUA) na concentração equivalente ao CIM de cada amostra (1,0 µg/mL para os isolados 10, 43 e SI4, e 2,0 µg/mL para os demais isolados), de modo a obter uma leitura inicial de Densidade Óptica em 600 nm (DO600) de 0,05 (UV 1800 Spectrophotometer - Shimadzu, Japão). A suspensão foi submetida à incubação (35-37°C) por 2 a 7 h, sob

rotação de 130 rpm, até que a DO600 atingisse um valor entre 0,3 a 0,5 (fase exponencial inicial). As células bacterianas foram coletadas por centrifugação a 12.000 x g (5 minutos) a 4°C (Centrifuge 5340 R - Eppendorf) e o meio de cultura foi, então, descartado. Foi adicionado 1,0 mL de reagente Trizol para cada 0,25 mL de amostra (10^7 células de origem bacteriana). As células foram, então, lisadas por homogeneização em vórtex e a suspensão mantida à temperatura ambiente por 5 minutos. Foram adicionados 0,2 mL de clorofórmio P.A. (Merck, Alemanha). A mistura foi agitada vigorosamente por 15 segundos, incubada por 2 a 3 minutos à temperatura ambiente e logo após, centrifugada a 12000 x g por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa (que contém o conteúdo de RNA) foi removida e transferida para um novo tubo, a fim de proceder o isolamento do RNA total. A precipitação do RNA foi realizada pela adição de 0,50 mL de Isopropanol BioReagent >99,5% (Sigma-Aldrich, EUA) à fase aquosa separada na etapa anterior. A suspensão foi incubada à temperatura ambiente por 10 minutos e, em seguida, centrifugada a 12.000 x g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi retirado do tubo, deixando apenas o sedimento de RNA, que foi, então, lavado com 1,0 mL de Etanol 70% (Sigma-Aldrich, EUA). A solução de lavagem foi homogeneizada em vórtex e centrifugada a 7500 x g durante 5 minutos a 4°C. Em seguida, esta foi descartada e o sedimento de RNA foi parcialmente seco à temperatura ambiente por 20 a 30 minutos. O sedimento de RNA foi ressuspenso em água livre de DNase/RNase (Promega Corporation, EUA) e a mistura incubada em banho-maria a 55-60°C, por 10 a 15 minutos. As amostras de RNA total, quando não imediatamente utilizadas, foram estocadas a -80°C.

4.5.2 Tratamento das amostras de RNA com enzima DNase

Para a eliminação de prováveis contaminações das amostras de RNA total com DNA genômico foi realizado tratamento com DNase I (Promega Corporation, EUA) seguindo as orientações do fabricante. Logo após a extração, foram adicionados a 12 μ L de RNA: 1,5 μ L de RQ1 DNase 10X Reaction Buffer e 1,5 μ L de RQ1 DNase 1U/ μ g para um volume final de 15 μ L. As amostras foram mantidas por 30 minutos a 37°C, quando foi acrescentado 1 μ L de RQ1 DNase Stop Solution (solução de EDTA 20 mM, pH 8,0) a fim de inativar a enzima DNase. As amostras foram, então, incubadas a 65°C por 10 minutos. As amostras de RNA tratadas, quando não imediatamente utilizadas, foram estocadas a -80°C.

4.5.3 Determinação do rendimento e quantificação do RNA total

A concentração do RNA total foi obtida por meio da leitura da absorbância (260nm) em espectrofotômetro (Nanovue™ Plus - GE Healthcare, Alemanha), zerando o equipamento com água livre de DNase/RNase (Promega Corporation, EUA). Para avaliação da pureza das amostras foi utilizada a razão 260/280. Valores entre 1,8 e 2,1 foram considerados aceitáveis para o grau de pureza da amostra de RNA. A integridade do RNA total foi avaliada por meio de visualização de bandas 23S/16S em gel de agarose 1,2% com TAE 1X (20 mM Tris acetato; 0,5 mM EDTA, pH 8,0) após corrida eletroforética a 80V por 30 minutos com Brometo de Etídio (Sigma-Aldrich, EUA). O gel foi visualizado e fotodocumentado em transiluminador de luz ultravioleta (ImageQuant LAS 500 - GE, Alemanha).

4.5.4 Síntese de DNA complementar (cDNA)

A síntese de cDNA foi realizada por meio da utilização do kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Invitrogen®, Life Technologies), conforme instruções do fabricante. Todas as reações foram realizadas partindo de uma concentração fixa de 100 ng/μL de RNA total. Inicialmente, preparou-se o 2X RT Mastermix pela adição de 2,0 μL de 10X RT Buffer; 0,8 μL de 25X dNTP Mix (100 mM); 2,0 μL de 10X RT Random Primers; 1,0 μL de MultiScribe™ Reverse Transcriptase; 1,0 μL de RNase Inhibitor e 3,2 μL de água livre de DNase/RNase (Promega Corporation, EUA), para cada 10μL de volume final. O 2X RT Mastermix foi mantido em gelo até que as reações fossem iniciadas. Para cada reação foram adicionados 10 μL de RNA a 10 μL de 2x RT Mastermix, totalizando um volume final de reação de 20 μL. As amostras foram incubadas em termociclador Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems, EUA) por 10 minutos a 25°C, seguido por 120 minutos a 37°C. A enzima transcriptase reversa foi inativada pela incubação final a 85°C por 5 minutos. Uma reação com *pool* previamente quantificado de RNA das amostras foi realizada sem a adição da transcriptase reversa para posterior verificação de contaminação do RNA com DNA genômico. Como controle negativo da síntese de cDNA foram adicionados 10 μL de água livre de DNase/RNase (Promega Corporation, EUA) no lugar do RNA.

Quando a síntese de cDNA foi completada, as amostras de cDNA foram diluídas 10X em água livre de DNase/RNase (Promega

Corporation, EUA) e, em seguida, estocadas -20°C, até que a reação de qPCR pudesse ser realizada. Para uso na reação de qPCR, o estoque de cDNA foi novamente diluído em água (10X) de modo que a diluição final das amostras utilizadas foi de 1:100.

4.5.5 Desenho dos iniciadores utilizados na qPCR

Para análise de transcritos dos genes *graSR*, *vraSR*, *walKR* e *rpoB*, foi utilizado um conjunto de genes de referência (normalizadores) que foram, então, selecionados com base em pesquisa em literatura científica. Foram escolhidos os genes de referência, *hu*, *pta*, *tpi* e *gyrB*, que, segundo os trabalhos publicados, apresentaram melhor estabilidade frente às variadas condições experimentais para análise de expressão gênica em *Staphylococcus aureus* (LEWIS; RICE, 2015; VALIHRACH; DEMNEROVA, 2012). As sequências de todos os iniciadores foram desenhadas utilizando o programa *Primer Select* versão 3.0.25, sendo, em seguida, avaliadas quanto a especificidade por meio da ferramenta *PrimerBlast* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), disponível no site *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genban/>). Os iniciadores foram desenhados nas regiões mais conservadas dos respectivos genes. Todos os iniciadores senso (F) e antissenso (R) foram produzidos pela empresa Exxtend Biotecnologia LTDA (Campinas, São Paulo) e diluídos em água livre de DNase/RNase (Promega Corporation, EUA) para uma concentração estoque de 50 µM (Tabela 03). Para desenho dos iniciadores foi utilizada sequência da cepa de referência Mu3 (hVISA), disponível no *GenBank* sob o número de acesso AP002394.1.

Tabela 03. Iniciadores da reação de qPCR utilizados no estudo.

Gene		Sequências	Tamanho do produto (pb)
<i>graSR</i>	F	5' GATTTCCGGCAAAGTAATGGATA 3'	196
	R	5' AATCATCTGCGCCAAGTTC 3'	
<i>walKR</i>	F	5' GAGTATGCCAACCGTCAAGA 3'	188
	R	5' TTACCACCGCCATAATCTTTT 3'	
<i>rpoB</i>	F	5' CCGTGACGCTACTTATGCTG 3'	153
	R	5' ATTACACGTTCTGCACCATTG 3'	
<i>vraSR</i>	F	5' AGTCGTCGCTTCTACACCATC 3'	149
	R	5' CAAGTTATCTATCAACGCAAAGTG 3'	
Gene		Sequências	Tamanho do produto (pb)
<i>gyrB</i>	F	5' TCCTCAATTCGAAGGTCAAAC 3'	153
	R	5' CGTGCCGCCATAATACCT 3'	
<i>hu</i>	F	5' AGCTTTGAATGCTGGAACCTTTAC 3'	161
	R	5' TATTCGAATCAATCCAAAACCTCA 3'	
<i>pta</i>	F	5' CACATTCAACAGGCGACACT 3'	193
	R	5' AATGCTGATTTTGCACCTTCTAC 3'	
<i>tpi</i>	F	5' CTGAAGATGCAAATGAAATGTG 3'	173
	R	5' TGATGCGCCACCTACTAATG 3'	

Legenda: (F) iniciador senso e (R) iniciador antissenso. Fonte: desenvolvido pela autora.

4.5.6 Reação em cadeia de polimerase quantitativa (qPCR)

Para quantificação de transcritos de RNA dos diferentes isolados de hVISA foi utilizada a técnica de qPCR precedida de transcrição reversa (RT-qPCR), usando o intercalante SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain - 10,000X concentrado em DMSO (Applied Biosystems®, Life Technologies). Este foi diluído 100X em DMSO >99,5% (Sigma-Aldrich, EUA) e fracionado em pequenas alíquotas de 10 µL (protegidas da luz) que foram, então, acondicionadas como estoque em temperatura de -20°C. No momento do uso, a solução estoque (100X) foi diluída em água livre de DNase/RNase (Promega Corporation, EUA) (1:100), de modo a obter

uma solução final de SYBR® Green (1X) que foi, então, utilizada na reação de qPCR. As reações foram realizadas em equipamento 7900 HT Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems®, EUA), com placas de 96 poços (MicroAmp Optical, Applied Biosystems®) e otimizadas para um volume final de 15 µL por poço. O mix foi preparado com a adição de 3,0 µL de SYBR® Green (1X); 1,5 µL de Tampão 10X (200 mM Tris-HCl pH 8,4; 500 mM KCl) (Invitrogen™ - Life Technologies); 0,3 µL de cada de um dos iniciadores senso (F) e antissenso (R) (ambos na concentração final de 200 nM); 0,75 µL de dNTPs (Invitrogen™ - Life Technologies) (cada desoxirribonucleotídeo trifosfato na concentração final de 0,1 mM); 0,9 µL de MgCl₂ (Invitrogen™ - Life Technologies) (concentração final de 3 mM); 0,15 µL de ROX Referene Dye (Invitrogen™ - Life Technologies) (concentração final de 0,0005X); 0,75 µL de Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen™ - Life Technologies) (concentração final de 0,025U/µL) e 0,3 µL de água livre de DNase/RNase (Promega Corporation, EUA), para cada poço de reação. Para a reação de amplificação foram adicionados 7,5 µL do mix a 7,5 µL do cDNA (diluído 1:100) e a placa foi selada com MicroAmp® Optical Adhesive Covers (Applied Biosystems®) sendo, em seguida, centrifugada por 1 minuto a 130 x g. As reações ocorreram sob as seguintes condições no termociclador: 50°C por 2 minutos e 95°C por 2 minutos para ativação da enzima polimerase, seguida de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C para a desnaturação da fita de cDNA, 15 segundos a 55°C para anelamento dos iniciadores e 1 min a 72°C para extensão da fita. Após o fim dos 40 ciclos, foi realizada a curva de dissociação por meio da elevação gradual da temperatura (1°C) de 60°C a 95°C, mantendo-se por 15 segundos em cada grau. Todos os dados foram analisados por meio do *software* ABI 7900HT Sequence Detection System (SDS versão 2.4, Applied Biosystems). As reações de qPCR foram realizadas em duplicata biológica e triplicata técnica para todos os genes utilizados no estudo. Pelo menos uma triplicata de reação sem amostra (água no lugar do cDNA) foi incluída para cada par de iniciadores a fim de funcionar como controle negativo da reação (*no template control*, NTC).

4.5.6.1 Determinação da contaminação do RNA com DNA genômico

Para verificação de possível contaminação do RNA total com DNA genômico, foi preparado um *pool* de RNA das amostras previamente quantificado e a mistura de RNAs foi, então, diluída em água

livre de DNase/RNase (Promega Corporation, EUA) para uma concentração final de 100 ng/ μ L. O *pool* de RNA (10 μ L) foi submetido à reação de síntese de cDNA (protocolo descrito no item 4.5.4), adicionando água livre de DNase/RNase (Promega Corporation, EUA) no lugar da enzima transcriptase reversa. Procedeu-se a reação de qPCR com amostras de RNA em triplicata e a média dos ciclos de quantificação (Cqs) foi, então examinada. Médias superiores a 35 ou ausência de amplificação foram considerados indicativos de ausência de contaminação por DNA genômico (LEWIS; RICE, 2015).

4.5.6.2 Análise da eficiência da reação de qPCR

A avaliação da eficiência dos iniciadores é um importante ponto a ser considerado no processo de quantificação relativa de genes, uma vez que o método do Cq comparativo é bastante sensível a variações da eficiência das reações de qPCR (RAMAKERS et al., 2003).

Fatores experimentais como o tamanho, estrutura secundária e conteúdo de GC do *amplicon* podem influenciar a eficiência da reação que, idealmente, deve ser de 100%, condição em que o produto gerado é duplicado ao final de cada ciclo térmico. Outras condições que podem influenciar a eficiência da PCR são: reagentes em concentrações não ideais, a qualidade da enzima utilizada e a própria dinâmica da reação, que pode resultar em eficiências inferiores a 90%. Uma boa reação deve ter uma eficiência no intervalo de 90% a 110%.

O método do Cq comparativo assume que as eficiências de amplificação dos genes alvos e de referência são muito similares, variando entre 1,8 e 2,0.

Para avaliação da eficiência da PCR, uma abordagem bastante utilizada é a construção de curvas de diluição, na qual a eficiência da reação é determinada pelo valor do *slope* obtido da linha de regressão, conforme equação: $E = 10^{(-1/\text{slope})}$ (BUSTIN et al., 2009). Embora esta abordagem considere constantes as eficiências para todas as diluições, quando uma amostra de cDNA é diluída, todos os componentes que possam inibir a reação de PCR são igualmente diluídos, podendo resultar em maiores valores de eficiências em amostras menos concentradas (RAMAKERS et al., 2003). Este problema pode ser contornado pela determinação direta de eficiência a partir do aumento da fluorescência em cada amostra individual, para a qual modelos matemáticos têm sido propostos (RUIJTER et al., 2009).

A fim de avaliar a eficiência das reações de qPCR, os dados brutos de fluorescência gerados ao final de cada ciclo amplificação foram exportados para o Programa LinRegPCR- *Analysis of quantitative RT-qPCR Data*, versão 2012.3 (RUIJTER et al., 2009), disponível mediante pedido pelo email bioinfo@amc.uva.nl; Assunto: LinRegPCR (RAMAKERS et al., 2003).

O programa LinRegPCR (Figura 06) utiliza uma análise de regressão linear dos dados de fluorescência da fase exponencial da qPCR para calcular a quantidade inicial de RNAm (N_0) e a eficiência individual de cada amostra amplificada (E), com base nas fórmulas (1), (2) e (3).

$$\text{Log}(N_c) = \text{Log}(N_0) + \text{Log}(E) \times C \quad (1)$$

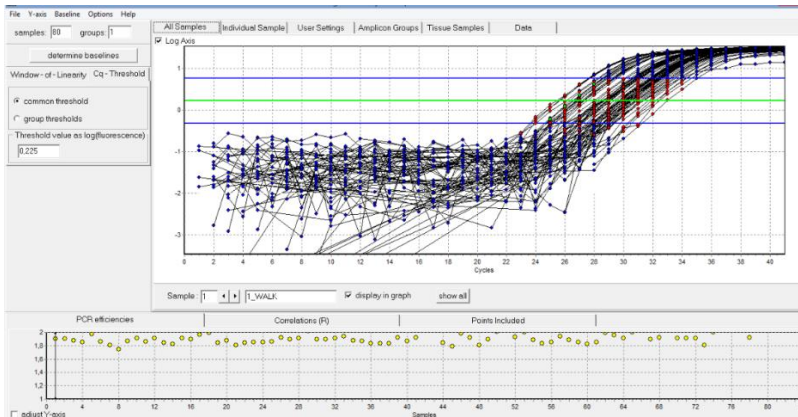
$$N_0 = 10^{\text{intercept}} \quad (2)$$

$$E = 10^{\text{slope}} \quad (3)$$

Onde N_c e C são os dados de fluorescência e número de ciclos, respectivamente.

Para determinação das médias de eficiência correspondentes a cada par de iniciadores, foram utilizados o mínimo de 3 e máximo de 6 pontos da curva individual de amplificação da fase exponencial de cada amostra, de modo a obter o maior valor possível de R^2 (entre 0,995 e 0,999) (RAMAKERS et al., 2003; RUIJTER et al., 2009). Valores de eficiência no intervalo entre 1,8 e 2,0 foram consideradas ideais para o estudo.

Figura 06. Programa LinRegPCR demonstrando as curvas de amplificação de todas as amostras analisadas por RT-qPCR, com as respectivas taxas de eficiência.



Legenda: O gráfico inferior mostra o intervalo de eficiência variando de 1,0 a 2,0. Cada ponto amarelo representa a eficiência das amostras individuais submetidas a reação de qPCR. Fonte: desenvolvido pela autora.

4.5.6.3 Análise da especificidade dos iniciadores

A análise da especificidade dos iniciadores é de extrema importância em reações de qPCR, especialmente em ensaios que utilizam ligantes de DNA inespecíficos, como o SYBR®Green I. Embora algumas ferramentas *in silico* permitam estimar a equivalência das sequências dos iniciadores com alvos inesperados, sua especificidade necessita ser validada empiricamente por meio de evidências experimentais diretas (BUSTIN et al., 2009), a fim de garantir que o processo de amplificação resulte somente no produto desejado.

Para isso, realiza-se a análise da curva de dissociação, obtida ao final dos ciclos de amplificação, a fim de determinar a temperatura na qual 50% dos produtos gerados encontram-se desnaturados (temperatura de dissociação ou *melting* - T_M). Ensaios específicos geram um único pico na curva, apresentando valores de T_M altamente específicos para cada *amplicon* formado. Tal procedimento descarta a presença de dímeros de iniciadores, que além de gerar resultados falso-positivos, podem afetar parâmetros como a sensibilidade e a eficiência da reação de qPCR.

Nesse sentido, foram realizadas as análises das curvas de dissociação formadas ao final dos 40 ciclos de amplificação, com o

objetivo de verificar a formação de produtos inespecíficos ou dímeros de iniciadores, possivelmente gerados por erros no processo de desenho dos iniciadores, bem como pelo excesso dos mesmos na reação de qPCR.

Para análise da especificidade dos iniciadores, reações de qPCR foram realizadas com todas as amostras de cDNA, utilizando pares de iniciadores específicos para cada gene usado no experimento (genes alvos e genes de referência). As curvas de dissociação geradas ao final dos 40 ciclos de amplificação foram avaliadas a fim de assegurar a qualidade e verificar a característica dos produtos formados. A formação de curva com pico único e específico foi adotada como critério para garantia da especificidade dos iniciadores.

A fim de complementar a análise, os produtos formados nas reações de qPCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 2,5% com TAE 1X (20 mM Tris acetato; 0,5 mM EDTA, pH 8,0) e Brometo de Etídio (Sigma-Aldrich, EUA). A corrida eletroforética ocorreu a 80V por 30 minutos e as bandas geradas foram comparadas a um padrão de tamanho molecular de 100 pb (Ludwig Biotec, Brasil) sendo, posteriormente, visualizadas e fotodocumentadas em transiluminador de luz ultravioleta (ImageQuant LAS 500 - GE, Alemanha).

4.5.6.4 Escolha dos genes normalizadores

Um dos processos mais importantes e problemáticos da análise de expressão gênica por RT-qPCR é a etapa de normalização (BUSTIN et al., 2009; PFAFFL, 2001; VANDESOMPELE; KUBISTA; PFAFFL, 2009). Erros específicos na quantificação de transcritos são facilmente atribuídos a qualquer variação inerente ao processo metodológico e é especialmente relevante para amostras obtidas a partir de diferentes indivíduos ou intervalos de tempo, podendo resultar em má interpretação do perfil de expressão dos genes alvos. A normalização, desse modo, é um componente essencial para a confiança do ensaio, uma vez que controla as variações de rendimento das etapas de extração, transcrição reversa e a eficiência das reações de qPCR, permitindo, assim, comparações entre concentrações de RNAm de diferentes amostras (HUGGETT et al., 2005).

A estratégia utilizada, geralmente, envolve um gene expresso constitutivamente que funciona como controle endógeno e é chamado gene de referência. O gene de referência deve ser expresso de forma estável de modo que a concentração do seu RNAm apresente forte relação com as quantidades totais de RNAm presentes nas amostras. Tem sido

demonstrado, entretanto, que, não existem genes expressos constitutivamente sob todas as condições experimentais, e dessa forma, a estabilidade de um gene de referência deve ser verificada para cada condição experimental (BUSTIN et al., 2009; VANDESOMPELE; KUBISTA; PFAFFL, 2009).

Estudos demonstram que a normalização com um único gene não é apropriada, a menos que seja apresentada evidência clara de sua expressão invariável sob as condições experimentais utilizadas. Sendo assim, o número ideal e a escolha dos genes de referência devem ser determinados experimentalmente, de modo que a utilização da média geométrica dos genes mais estáveis constitui a estratégia mais adequada para garantia da acurácia da normalização (PFAFFL, 2001; VALIHRACH; DEMNEROVA, 2012; VANDESOMPELE; KUBISTA; PFAFFL, 2009).

Para seleção dos normalizadores, reações de qPCR foram conduzidas para todas as amostras em duplicata biológica e triplicata técnica, utilizando cada um dos quatro pares de iniciadores específicos dos genes de referência inicialmente propostos: *hu*, *pta*, *tpi* e *gyrB*.

A partir da média dos valores brutos de C_{qs} gerados, os dados de 2^{-ΔC_q} referentes a cada amostra por gene avaliado foram, posteriormente, calculados e lançados no programa geNorm VBA - *Microsoft Excel*, conforme orientação dos autores (VANDESOMPELE; KUBISTA; PFAFFL, 2009). Este algoritmo calcula o *M-value* que representa a estabilidade da expressão de determinado gene ou método de normalização, de modo que o menor valor gerado assegura a maior estabilidade da expressão gênica. O programa fornece, além disso, informação quanto ao número mais apropriado de genes de referência a serem utilizados no método de normalização (VALIHRACH; DEMNEROVA, 2012).

A fim de selecionar os genes ou combinações mais estáveis para normalização da reação de RT-qPCR foi utilizada, ainda, a ferramenta *online* RefFinder (<http://fulxie.ofees.us/?type=reference&ckattempt=3>), desenvolvida para avaliação e triagem de genes de referência a partir de dados experimentais. Esta ferramenta integra os principais programas computacionais disponíveis atualmente tais como geNorm, Normfinder, BestKeeper e o método comparativo delta-C_q, a fim de comparar e classificar os melhores genes e/ou combinações de genes possíveis. Dessa forma, baseando-se na classificação gerada por cada programa isoladamente, foi atribuído o peso adequado a um gene individual ou combinação de genes, para então, definir a classificação final, por meio da média geométrica dos pesos atribuídos a cada um deles (ANDERSEN;

LEDET-JENSEN; ORNTOFT, 2004; PFAFFL, 2004; SILVER et al., 2006; VANDESOMPELE; KUBISTA; PFAFFL, 2009). Por este programa, além da avaliação da estabilidade de cada gene isoladamente, foram avaliadas, também, as médias geométricas de todas as combinações possíveis dos genes selecionados pelo programa anterior (geNorm).

4.5.6.5 Quantificação relativa de transcritos de RNAm

A quantificação relativa de transcritos de RNAm por RT-qPCR é um método de quantificação comparativa, na qual o nível de expressão do gene de interesse é comparado entre uma amostra experimental e outra tida como controle não tratado (calibrador). Independentemente do método de detecção utilizado, o número de ciclos em que a quantidade de produto amplificado é suficiente para produzir um sinal de fluorescência detectável (ciclo de quantificação - Cq), é a medida real utilizada para calcular a quantidade inicial de RNA presente na amostra, apresentando com esta uma relação proporcionalmente inversa.

No método do Cq comparativo, a média dos valores brutos de Cq do gene de interesse, tanto para amostra teste quanto para a amostra calibradora são ajustados em relação ao gene normalizador resultando no valor de $\Delta\Delta Cq$, utilizado, então, para determinação das diferenças nos valores de expressão gênica.

A determinação da expressão dos genes *graSR*, *vraSR*, *walKR* e *rpoB* em isolados de *S. aureus* com heterorresistência intermediária à vancomicina se deu por meio do método de quantificação relativa, a partir de dados brutos de Cq gerados nas reações de RT-qPCR, cujos detalhes foram descritos acima. Para análise dos dados, a amostra de cDNA da cepa de *S. aureus* ATCC 25923 (VSSA) foi utilizada como “calibrador” e as amostras de cDNA provenientes dos dez isolados hVISA foram considerados como amostras “testes” para o cálculo de quantificação. Alternativamente, amostras crescidas em caldo BHI enriquecidos com vancomicina foram também utilizadas como calibradores para análise de modulação gênica dos isolados expostos ao antimicrobiano. Análise de expressão gênica das cepas Mu3 ATCC 700698 (hVISA) e Mu50 ATCC 700699 (VISA) foi realizada paralelamente à análise das amostras.

Os valores de Cq obtidos foram normalizados para cada gene alvo utilizando a média geométrica dos genes de referência *pta*, *tpi* e *gyrB*, conforme a fórmula de Livak (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001):

$$\Delta Cq (\text{teste}) = Cq (\text{gene alvo, teste}) - Cq (\text{normalizador, teste})$$

ΔCq (calibrador) = Cq (gene alvo, calibrador) - Cq (normalizador, calibrador)

O cálculo da expressão gênica para cada amostra teste foi realizado pelo método do Cq comparativo ($2^{-\Delta\Delta Cq}$) (LIVAK et al, 2001), onde $\Delta\Delta Cq = \Delta Cq$ (teste) - ΔCq (calibrador). O valor de $2^{-\Delta\Delta Cq}$, dessa forma, representou a taxa da expressão normalizada.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas por meio do *software Statistical Package for the Social Sciences v. 22* (SPSS Statistics 22). O programa *GraphPadPrism v. 6* foi utilizado para a construção dos gráficos. A expressão relativa dos genes analisados foi comparada pelo teste t Student, adotando nível de significância $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 DETECÇÃO DAS MUTAÇÕES NOS GENES ANALISADOS

Foram encontradas mutações pontuais em pelo menos um dos genes analisados em cinco isolados clínicos de hVISA, sendo eles: 10, 43, 69, SI4 e SI13. Nenhuma mutação foi encontrada nos isolados 36, 80 e SI11 (Tabela 04).

Tabela 04. Mutações pontuais na sequência aminoacídica dos genes *graSR*, *vraSR*, *walKR* e *rpoB* em diferentes amostras clínicas de hVISA relativas à amostra VSSA sequenciada neste estudo.

Amostra	<i>graS</i>	<i>graR</i>	<i>vraS</i>	<i>vraR</i>	<i>walK</i>	<i>walR</i>	<i>rpoB</i>
10	L26I T224I	V136I D148Q S207G	-	-	A468T	-	V731A Y737F
36	-	-	-	-	-	-	-
43	L26F I59L T224I	D148Q	-	E59D	R222K A468T	-	H481N
54	D.I.	D.I.	D.I.	D.I.	D.I.	D.I.	D.I.
69	-	-	-	-	-	-	H481N
80	-	-	-	-	-	-	-
92	D.I.	D.I.	D.I.	D.I.	D.I.	D.I.	D.I.
SI4	-	-	-	-	-	-	H481N
SI11	-	-	-	-	-	-	-
SI13	L26F T224I	-	-	-	A117V	-	-

Legenda: A sigla “D.I.” indica dados indisponíveis. O símbolo “-” representa ausência de mutação. Fonte: desenvolvido pela autora.

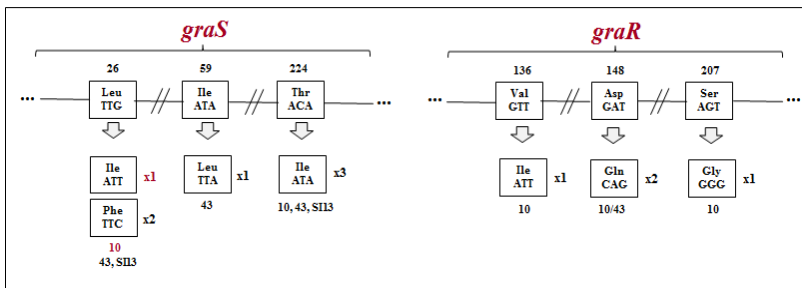
Três amostras apresentaram mutações pontuais no gene *graSR*: 10, 43 e SI13. A mutação mais frequente entre os isolados foi a *graS* T224I, na qual o aminoácido (aa) treonina (T) foi substituído pelo aa isoleucina (I) na posição 224. Outras mutações encontradas em *graS* foram: I59L, na qual houve substituição do aa isoleucina pelo aa leucina (L) na posição 59 e L26F, onde a leucina foi substituída pela fenilalanina (F) na posição 26. No isolado 10, a troca aminoacídica ocorrida nesta posição foi de uma leucina por uma isoleucina (L26I). Ademais, este foi o isolado mais mutado no gene *graS*, apresentando um total de 29

mutações, das quais duas estão representadas na figura 07 e 27 representadas na figura 08.

Em *graR*, a amostra 10 apresentou as mutações V136I, na qual houve troca do aa valina (V) pelo aa isoleucina e S207G, na qual a troca foi de uma serina (S) por uma glicina (G). A mutação D148Q decorrente da substituição do aa aspartato (D) por uma glutamina (Q) na posição 148, foi comum aos isolados 10 e 43 (Figura 07).

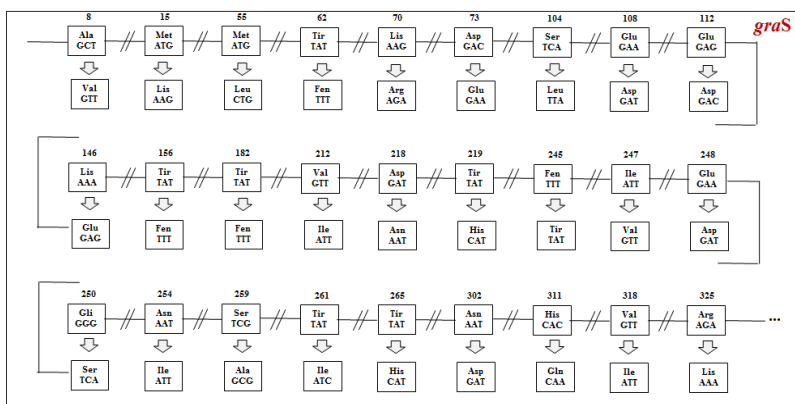
A amostra SI13 apresentou duas mutações comuns ao isolado 43 em *graS*, porém não foram detectadas mutações em *graR*. As amostras 10 e 43, ao contrário, apresentaram mutações para ambos os genes. Mutações nos códons 26 e 224 ocorreram nos três isolados, em *graS*.

Figura 07. Mutações pontuais na sequência aminoacídica encontradas nos genes *graS* e *graR*.



Legenda: Cada quadrado representa um códon e seu respectivo aminoácido. A seta representa a substituição. Números acima dos quadrados representam o códon onde ocorreu a mutação. Números à direita dos quadrados representam a quantidade de isolados mutados. Números abaixo dos quadrados representam a identificação das amostras mutadas. Fonte: desenvolvido pela autora.

Figura 08. Mutações pontuais na sequência aminoacídica encontradas no gene *graS* da amostra 10.



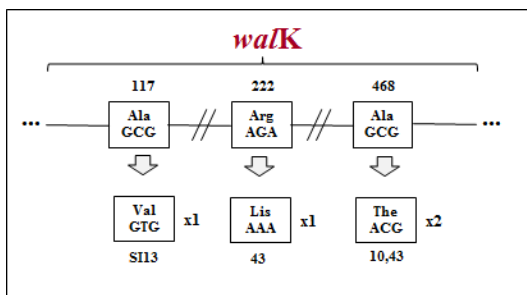
Legenda: Cada quadrado representa um códon e seu respectivo aminoácido. A seta representa a substituição. Números acima dos quadrados representam o códon onde ocorreu a mutação. Fonte: desenvolvido pela autora.

Mutações silenciosas, nas quais a substituição de um ou mais nucleotídeos não gerou alteração na sequência aminoacídica, foram encontradas em cinco isolados clínicos hVISA: 10, 43, 69, SI4 e SI13. Foram encontradas oito mutações silenciosas em *graS* e cinco em *graR*, conforme demonstrado no apêndice A. A troca de uma adenina por uma guanina na posição 198 do gene *graS* foi comum às amostras 69 e SI4, além disso, quatro mutações silenciosas foram comuns às amostras 10 e 43 no mesmo gene.

Das cinco mutações silenciosas detectadas em *graR*, quatro foram apresentadas pelo isolado 43. A amostra 10 apresentou o maior número de mutações silenciosas, sendo 101 mutações no gene *graS* e 36 no gene *graR*, sendo estas apresentadas separadamente no apêndice A.

Três amostras apresentaram mutações pontuais no gene *walkR*: 10, 43 e SI13. A mutação mais frequente entre os isolados foi a *walkR* A468T, na qual o aa alanina (A) foi substituído pelo aa treonina na posição 468. Outras mutações encontradas em *walkR* foram: A117V, na qual houve substituição do aa alanina pelo aa valina na posição 117 e R222K, onde a arginina (R) foi substituída pela lisina (K) na posição 222 (Figura 09). Nenhum isolado apresentou mutações no gene *walkR*.

Figura 09. Mutações pontuais na sequência aminoacídica encontradas no gene *walK*.



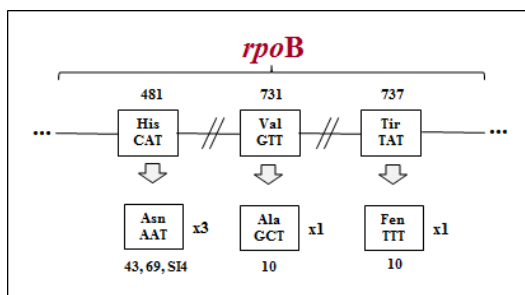
Legenda: Cada quadrado representa um códon e seu respectivo aminoácido. A seta representa a substituição. Números acima dos quadrados representam o códon onde ocorreu a mutação. Números à direita dos quadrados representam a quantidade de isolados mutados. Números abaixo dos quadrados representam a identificação das amostras mutadas. Fonte: desenvolvido pela autora.

Mutações silenciosas nos genes *walK* e *walR* foram encontradas em três isolados clínicos hVISA: 10, 43 e SI13. As amostras 10 e 43, apresentaram, igualmente, o maior número de mutações silenciosas, sendo 16 no gene *walK* e três no gene *walR*. A amostra SI13 totalizou 13 destas mutações, sendo 10 em *walK* e três em *walR* (Apêndice A). Seis mutações foram comuns aos três isolados em *walK* (Apêndice A). No gene *walR*, a troca do nucleotídeo contendo adenina por outro contendo timina na posição 228 do gene esteve presente nos isolados 10, 43 e SI13 (Apêndice A).

Quatro amostras clínicas de hVISA apresentaram mutações pontuais no gene *rpoB*: 10, 43, 69 e SI14. A mutação mais frequentemente observada entre os isolados foi a *rpoB* H481N, na qual o aa histidina (H) foi substituído pelo aa asparagina (N) na posição 481. Além desta, outras mutações encontradas no gene *rpoB* foram: V731A, na qual houve substituição do aa valina pelo aa alanina na posição 731 e Y737F, onde a tirosina foi substituída pela fenilalanina na posição 737 (Figura 10).

Somente as amostras 10, 43 e SI13 apresentaram mutações silenciosas no gene *rpoB*. A amostra 10 novamente apresentou o maior número destas mutações (15), seguida pelas amostras SI13 (12) e 43, com seis mutações (Apêndice A).

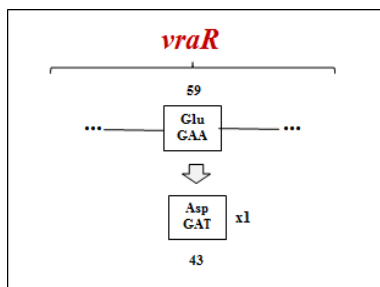
Figura 10. Mutações pontuais na sequência aminoacídica encontradas no gene *rpoB*.



Legenda: Cada quadrado representa um códon e seu respectivo aminoácido. A seta representa a substituição. Números acima dos quadrados representam o códon onde ocorreu a mutação. Números à direita dos quadrados representam a quantidade de isolados mutados. Números abaixo dos quadrados representam a identificação das amostras mutadas. Fonte: desenvolvido pela autora.

O gene *vraSR* foi o menos mutado entre todos os genes analisados. Apenas o isolado 43 apresentou a mutação E59D em *vraR* (Figura 11). Não foram observadas mutações no gene *vraS*, bem como mutações silenciosas em *vraSR*.

Figura 11. Mutação pontual na sequência aminoacídica encontradas no gene *vraR*.



Legenda: Cada quadrado representa um códon e seu respectivo aminoácido. A seta representa a substituição. Números acima dos quadrados representam o códon onde ocorreu a mutação. Números à direita dos quadrados representam a quantidade de isolados mutados. Números abaixo dos quadrados representam a identificação das amostras mutadas. Fonte: desenvolvido pela autora.

5.2 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES ANALISADOS

5.2.1 Padronização da RTqPCR

5.2.1.1 Análise da especificidade dos iniciadores

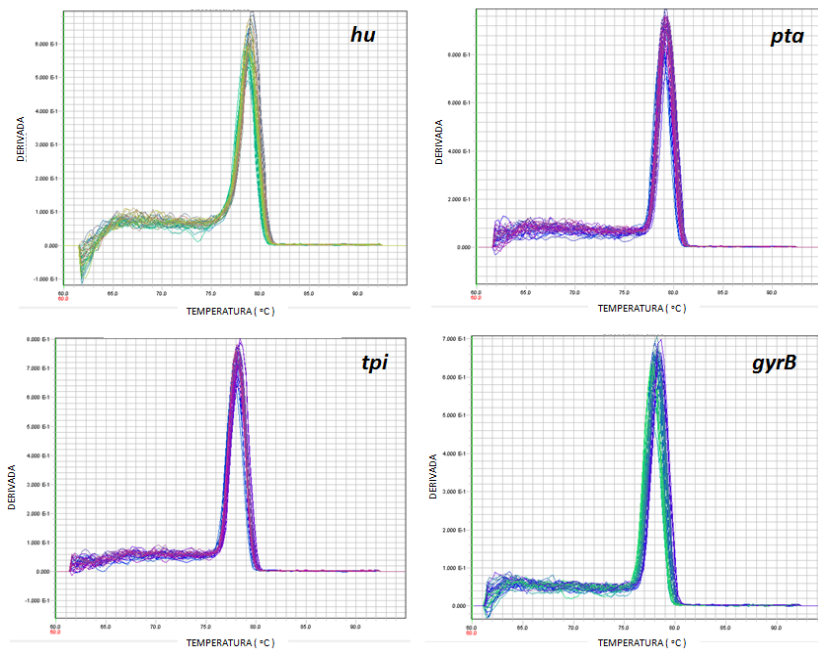
As curvas de dissociação para todos os genes utilizados no estudo apresentaram pico único (Figura 12) e temperaturas de dissociação (T_M) específicas para cada *amplicon*, indicando ausência de dímeros e/ou produtos inespecíficos (Tabela 05). Este resultado, dessa forma, garantiu que a amplificação ocorreu somente para os produtos de interesse, assegurando a especificidade da reação de qPCR.

Tabela 05. Temperaturas de dissociação por *amplicon*.

	Iniciadores	T_M (°C)
Genes de referência	<i>hu</i>	79,1
	<i>pta</i>	79,0
	<i>tpi</i>	78,2
	<i>gyrB</i>	78,0
Genes alvos	<i>graSR</i>	79,2
	<i>vraSR</i>	78,6
	<i>walKR</i>	77,8
	<i>rpoB</i>	78,1

Fonte: desenvolvido pela autora.

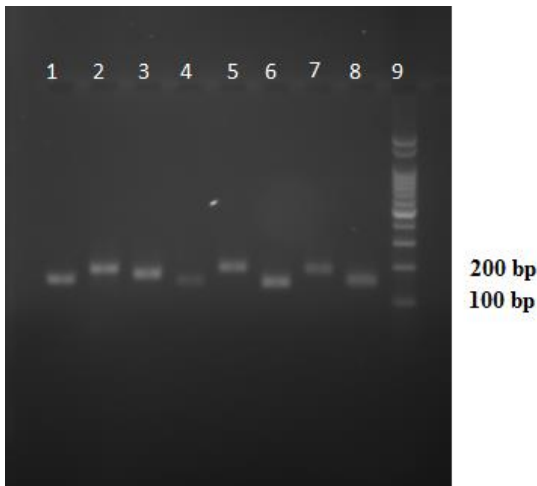
Figura 12. Curvas de dissociação para os amplicons dos genes de referência *hu*, *pta*, *tpi* e *gyrB*.



Fonte: desenvolvido pela autora.

A fim de confirmar a especificidade e tamanho dos produtos gerados nas reações de qPCR, os mesmos foram submetidos à corrida eletroforética em gel de agarose 2,5% e comparados a um padrão de tamanho molecular de 100 pb. A análise do gel após visualização em transluminador permitiu a visualização de bandas únicas e produtos com tamanhos moleculares esperados: 161 pb para *hu*, 193 pb para *pta*, 173 pb para *tpi*, 153 pb para o gene *gyrB*, 196 pb para *graSR*, 149 pb para *vraSR*, 188 pb para *walKR* e 153 pb para *rpoB*. (Figura 13).

Figura 13. Produtos gerados em reação de RT-qPCR para todos os genes do estudo.



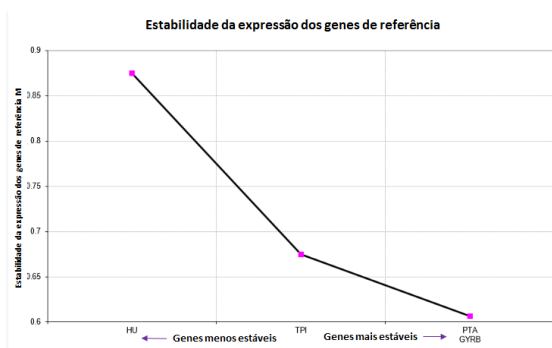
Legenda: Eletroforese em gel de agarose 2,5% dos produtos amplificados de todos os genes: 1 - *hu* (161 pb); 2 - *pta* (193 pb); 3 - *tpi* (173 pb); 4 - *gyrB* (153 pb); 5- *graSR* (196 pb); 6 - *vraSR* (149 pb); 7 - *walKR* (188 pb); 8 - *rpoB* (153 pb); 9 - padrão de tamanho molecular (100 pb). Fonte: desenvolvido pela autora.

5.2.1.2 Escolha dos genes normalizadores

No presente estudo, a análise da estabilidade dos genes foi, primeiramente, determinada pelo programa geNorm VBA – *Microsoft Excel*, conforme orientações dos autores (VANDESOMPELE; KUBISTA; PFAFFL, 2009). Os valores de *M-value* gerados permitiram classificar o gene *hu* como o menos estável nas condições experimentais utilizadas (Figura 14).

Este mesmo programa indicou, ainda, que a utilização de três genes de referência gerou a menor taxa de variação (aproximadamente 20%), sendo este o número ótimo de genes a ser utilizado para a normalização. Baseado nisso, para o presente estudo foram selecionados os genes de referência: *pta*, *tpi* e *gyrB*.

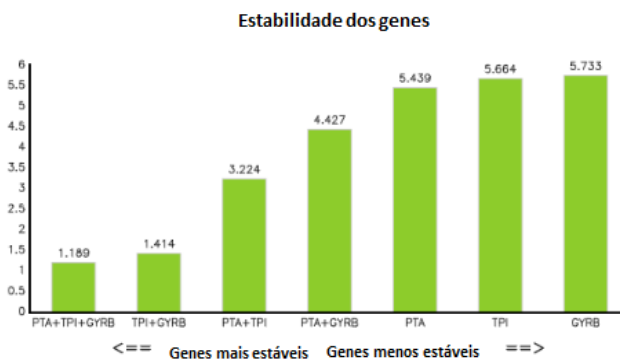
Figura 14. Gráfico de estabilidade da expressão dos genes de referência testados, gerado pelo programa geNorm.



Fonte: desenvolvido pela autora.

A fim de confirmar os dados gerados pelo programa geNorm e determinar a melhor combinação de genes para a normalização, foi utilizada, ainda, a ferramenta *online* RefFinder (Figura 15). Os resultados obtidos demonstraram que a média geométrica dos genes *pta*, *tpi* e *gyrB* apresentou maior estabilidade frente às demais combinações e dessa forma, esta foi considerada a melhor estratégia de normalização para as condições utilizadas neste experimento.

Figura 15. Gráfico de variação da estabilidade dos genes de referência, gerado pela ferramenta *online* RefFinder.



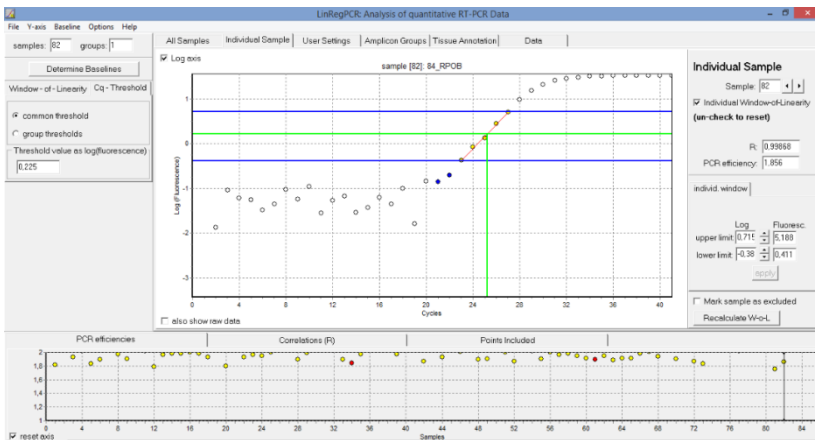
Fonte: desenvolvido pela autora.

5.2.1.3 Análise da eficiência da reação de qPCR

O programa LinRegPCR faz uso da análise de regressão linear dos dados brutos de fluorescência da fase exponencial da qPCR de cada amostra para calcular a eficiência individual dos *amplicons*, o que, além de proporcionar uma medida mais confiável do declive da curva, também fornece o coeficiente de correlação como medida para a qualidade do ajuste (RAMAKERS et al., 2003) (Figura 16).

Embora a eficiência por *amplicon* seja assumida como constante, amostras individuais têm eficiências ligeiramente variáveis e, portanto, recomenda-se que seja utilizada a média das eficiências de todas as amostras por grupo de *amplicon*. Por esta razão, foi utilizado o programa LinRegPCR, por meio do qual foi possível estabelecer a média das eficiências por *amplicon* para o cálculo da expressão relativa dos genes de interesse (Tabela 06).

Figura 16. Determinação da eficiência por amostra, pelo programa LinRegPCR.



Legenda: O gráfico inferior mostra o intervalo de eficiência variando de 1,0 a 2,0. Cada ponto amarelo representa a eficiência das amostras individuais submetidas a reação de qPCR. Fonte: desenvolvido pela autora.

As médias das eficiências para cada par de iniciadores ficaram no intervalo ideal de 1,8 e 2,0, sendo os valores de correlação (R^2) todos superiores a 0,995 (Tabela 06). Uma vez que o estudo apresentou médias de eficiência comparáveis entre os *amplicons*, foi adotado, então, o

método de Cq comparativo para cálculo da expressão relativa dos genes alvos.

Tabela 06. Eficiência dos iniciadores da reação de qPCR.

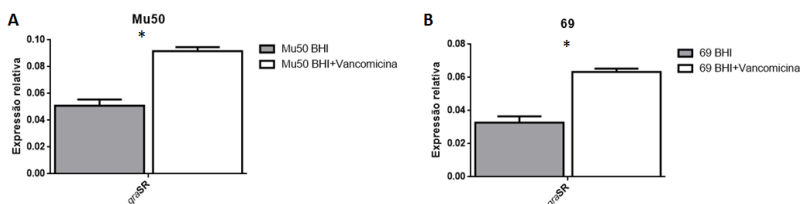
	Iniciadores	Eficiência	R ²
Genes de referência	<i>hu</i>	1,869950	0,997324
	<i>pta</i>	1,905431	0,997719
	<i>tpi</i>	1,881054	0,997811
Genes alvos	<i>gyrB</i>	1,917301	0,997089
	<i>graSR</i>	1,870047	0,996669
	<i>vraSR</i>	1,964228	0,996806
	<i>walkR</i>	1,944021	0,997845
	<i>rpoB</i>	1,947242	0,998824

Fonte: desenvolvido pela autora.

5.2.2 Avaliação da expressão gênica nos isolados

Os valores de expressão relativa dos genes *walkR* e *vraSR* não apresentaram diferença estatística ($p > 0,05$) entre as amostras analisadas e a cepa de *S. aureus* ATCC 25293 (VSSA). Da mesma forma, diferenças na expressão de isolados crescidos na presença e ausência de vancomicina também não ocorreram para os genes citados. O gene *graSR* teve sua expressão aumentada somente nas amostras 69 ($p = 0,018$) e Mu50 (VISA) ($p = 0,019$) quando submetidas a crescimento em caldo BHI enriquecido com vancomicina na concentração de $2\mu\text{g/mL}$ (Figura 17).

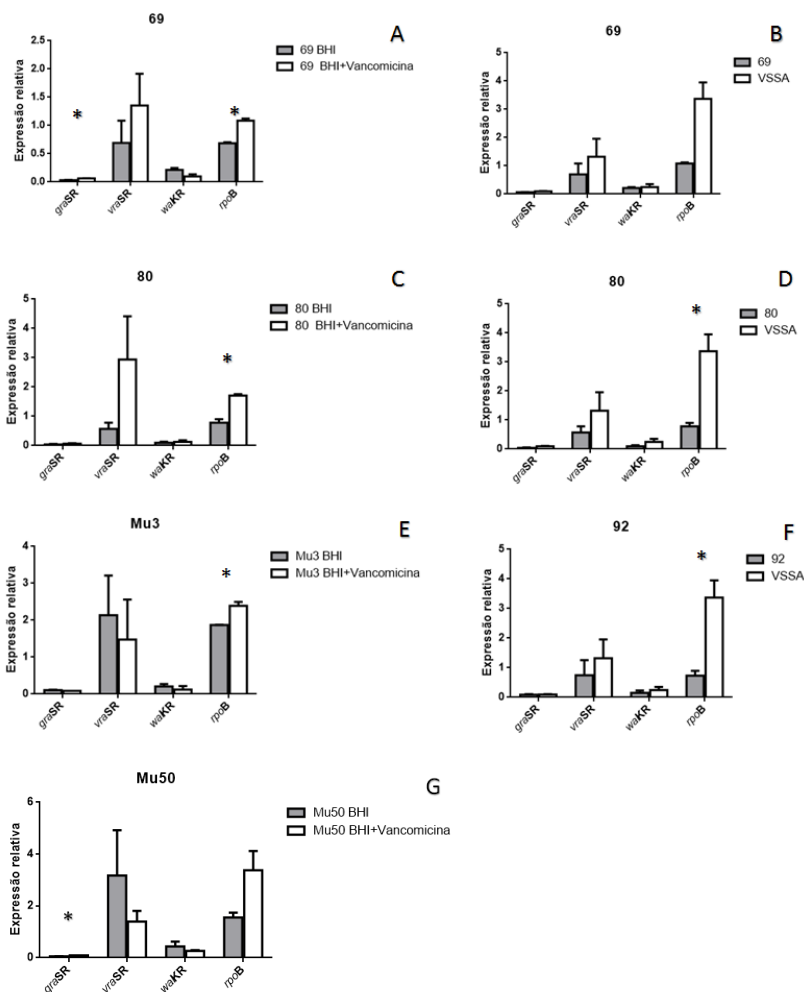
Figura 17. Gráfico da expressão relativa do gene *graSR* nas amostras 69 e Mu50.



Legenda: (A) Expressão relativa do gene *graSR* na amostra Mu50 crescida em caldo BHI contendo $2\mu\text{g/mL}$ de vancomicina; (B) Expressão relativa do gene *graSR* na amostra 69 crescida em caldo BHI contendo $2\mu\text{g/mL}$ de vancomicina. Os gráficos representam a média das duplicatas biológicas. As barras representam o erro relativo. Diferenças estatísticas entre as amostras estão indicadas pelo asterisco ($p \leq 0,05$). Fonte: desenvolvido pela autora.

Diferença estatística na expressão do gene *rpoB* ocorreu para as amostras 80 ($p=0,019$) e 92 ($p=0,048$) quando comparadas à cepa VSSA, em condições livres de vancomicina. Curiosamente, este gene teve sua expressão aumentada nos isolados clínicos 69 ($p=0,011$) e 80 ($p=0,019$) quando estes foram expostos ao antimicrobiano na concentração de $2\mu\text{g/mL}$, o mesmo ocorrendo com a cepa de referência Mu3 (hVISA) ($p=0,040$) (Figura 18).

Figura 18. Gráfico da expressão relativa dos genes *graSR*, *vraSR*, *walkR* e *rpoB* nas amostras 69, 80, 92, Mu3 e Mu50.



Legenda: (A) Expressão relativa dos genes na amostra 69 crescida em caldo BHI contendo 2 μ g/mL de vancomicina; (B) Expressão relativa dos genes na amostra 69 comparada a cepa VSSA em condições livres de vancomicina; (C) Expressão relativa dos genes na amostra 80 crescida em caldo BHI contendo 2 μ g/mL; (D) Expressão relativa dos genes na amostra 80 comparada a cepa VSSA em condições livres de vancomicina; (E) Expressão relativa dos genes na amostra Mu3 crescida em caldo BHI contendo 2 μ g/mL; (F) Expressão relativa dos genes

na amostra 92 comparada a cepa VSSA em condições livres de vancomicina; (G) Expressão relativa dos genes na amostra Mu50 crescida em caldo BHI contendo $2\mu\text{g/mL}$. Os gráficos representam a média das duplicatas biológicas. As barras representam o erro relativo. Diferenças estatísticas entre as amostras estão indicadas pelo asterisco ($p \leq 0,05$). Fonte: desenvolvido pela autora.

6 DISCUSSÃO

Staphylococcus aureus tem uma grande habilidade para se adaptar a diferentes condições ambientais e uma incrível capacidade de tornar-se rapidamente resistente a quase todos os antimicrobianos a que é exposto. A expressão de fenótipos de resistência pode ser fortemente influenciada pela origem genética dos isolados e por fatores como mecanismos de estresse e perturbações do envelope celular, danos ao DNA ou defeitos nas vias metabólicas bacterianas. A resistência clinicamente relevante é construída em múltiplos passos, cada um dos quais contribuindo para o processo de tolerância à antibioticoterapia (MCCALLUM; BERGER-BÄCHI; SENN, 2010).

Embora, inúmeros trabalhos em todo mundo tenham buscado esclarecimentos a respeito dos mecanismos moleculares da resistência endógena à vancomicina (HOWDEN et al., 2010a), no Brasil, poucos avaliam o papel de genes candidatos no fenótipo hVISA em amostras clínicas de *S. aureus*. Neste estudo, foi avaliado o papel de mutações pontuais e alterações da expressão dos genes codificadores dos sistemas reguladores de dois componentes *graSR*, *vraSR* e *walKR*, além do gene *rpoB*, cujas implicações na redução de suscetibilidade à vancomicina vêm sendo demonstradas na literatura científica atual (HAFER et al., 2012; HIRAMATSU et al., 2014; ROCH et al., 2014).

Mutações nos genes reguladores *graSR* têm sido associadas ao desenvolvimento dos fenótipos hVISA/VISA (CUI et al., 2005; DODDANGOUDAR et al., 2011; MEEHL et al., 2007; NEOH et al., 2008) e podem justificar alterações na parede celular compartilhadas por bactérias com resistência endógena à vancomicina. Nós investigamos substituições de aminoácidos decorrentes de mutações pontuais nos genes *graS* e seu regulador de resposta *graR* em isolados clínicos de hVISA obtidos de diferentes hospitais do estado de Santa Catarina (Figura 07). Do total de amostras sequenciadas, duas (10 e 43) apresentaram mutações em ambos os genes e uma apresentou-se mutada somente em *graS* (SI13). A mutação *graS* T224I foi a mais prevalente, seguida pela L26F, que foram comuns às amostras 43 e SI13 (Figura 07 e Tabela 04) e também descritas em isolados VISA obtidos em estudo realizado na Coreia (YOO et al., 2013). Esse estudo buscou investigar a prevalência e padrão de mutações em 87 amostras VISA isoladas em hospitais coreanos, sendo que o padrão de mutação mais prevalente englobou 23 amostras VISA *agr* tipo I, nas quais foram encontradas concomitantemente as mutações L26F e T224I em *graS* e D148Q, em *graR*. Curiosamente, padrão de mutação idêntico em *graSR* foi descrito em isolados hVISA *agr* tipo I,

obtidos por indução *in vitro* com glicopeptídeos e beta lactâmicos, em estudo realizado por Roch e colaboradores (2014), onde foi também verificada a mutação *graS* I59L. Entretanto, a descrição dessas mesmas mutações em pequeno número de bactérias VSSA, nos dois estudos, colocou em xeque o papel dessas substituições na redução de suscetibilidade à vancomicina, sugerindo que estudos funcionais desses mutantes e sua relação com o locus *agr* precisam ainda ser realizados. Ademais, as mutações L26I e T224I, encontradas na amostra 10 de nosso estudo (Figura 07), foram compatíveis às mutações encontradas na cepa ATCC 25923 (VSSA) (número de acesso no GenBank CP009361.1) (TREANGEN et al., 2014) por comparação pela ferramenta *BioEdit*, podendo indicar a não participação das mesmas no desenvolvimento do fenótipo hVISA. Apesar disso, a mutação *graR* D148Q já foi, em trabalhos anteriores (DODDANGOUDAR et al., 2011, 2012; HOWDEN et al., 2010b; NEOH et al., 2008), descrita como mutação missense (não sinônima) característica de amostras com redução de suscetibilidade, especialmente naquelas com altos valores de CIM para vancomicina (DODDANGOUDAR et al., 2011). Esta mutação foi detectada em duas de nossas amostras (10 e 43) (Tabela 03) que, por análise de PFGE (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*) (realizada em estudo prévio) não apresentaram relação epidemiológica entre si, estando classificadas em diferentes grupos clonais (SILVEIRA et al., 2015). Embora estudos detalhados sobre o mecanismo de ativação do SRDC GraSR sejam ainda necessários, a substituição D148Q, descrita no regulador de resposta pode, de fato, estar relacionada ao desenvolvimento do fenótipo de resistência endógena à vancomicina. Considerando, porém, que as duas amostras mutadas em nosso estudo, além da SI4, apresentaram os menores valores de CIM para vancomicina (1,0 µg/mL), quando comparadas aos demais isolados (2,0 µg/mL) (SILVEIRA et al., 2014), é possível que esta mutação não esteja necessariamente vinculada somente a altos valores de CIM (Tabela 07).

A mutação *graR* N197S, na qual um aa serina é substituído pelo aa asparagina no códon 197, não foi encontrada em nosso estudo e, embora tenha o seu papel desconhecido, pode afetar características funcionais do gene *graR*, estando mais fortemente associada à transformação do fenótipo hVISA em VISA (CUI et al., 2005; HOWDEN et al., 2010a; NEOH et al., 2008). Um estudo desenvolvido por Neoh e colaboradores (2008) mostrou que a introdução desta mutação em isolados hVISA promoveu sua conversão para o fenótipo VISA. O mesmo não foi observado quando o gene *graR* mutado foi incorporado à cepa N315 (VSSA), indicando que a mutação pode ser efetiva somente

no meio fisiológico das células hVISA, onde enzimas importantes como a PBP2 ou os produtos dos genes *sgtB* e *murZ* estão mais abundantes, provavelmente devido à ativação de outros sistemas vinculados à síntese da parede celular (CUI et al., 2006a). Além disso, esta mutação já foi também estudada como possível indutora da resistência a outras classes antimicrobianas como, por exemplo, à linezolidina (HIRAMATSU et al., 2014).

Outra mutação, agora no gene sensor quinase, a *graS* T136I, foi considerada provável responsável pela transformação de VSSA em hVISA, conforme demonstrado por Howden e colaboradores (2008), além de outros pesquisadores (HAFER et al., 2012; MATSUO et al., 2011). A substituição *graS* S79F, é, também, outra importante candidata como responsável por essa transformação (HAFER et al., 2012; NEOH et al., 2008). Nenhuma dessas mutações, porém, foi detectada em nosso estudo, indicando que estas podem não ter sido essenciais ao desenvolvimento do fenótipo hVISA em nossas amostras. Além disso, conforme discutido por Neoh e colaboradores (2008), o efeito de uma mutação em *graR*, ainda que independente de mutações ocorridas em *graS*, por si só, pode promover alterações conformacionais da proteína GraR, cuja ativação ocorra sem o sinal de fosforilação proveniente de seu sensor de membrana.

As mutações *graR* V136I e S207G foram encontradas somente na amostra 10 de nosso estudo, valendo destacar que esta foi a amostra com maior número de mutações missenses e silenciosas apresentadas neste gene (Figura 08 e Apêndice A). Curiosamente, tais mutações demonstraram alto grau de correspondência às mutações verificadas na cepa ATCC 25293 (VSSA) (coincidentes em 100% das mutações silenciosas e missenses) e, provavelmente, não estão vinculadas ao fenótipo de resistência hVISA. Além disso, a mutação *graR* V136I foi igualmente relatada em isolados VSSA coreanos (YOO et al., 2013) e seu papel na resistência permanece questionável.

A amostra 10, como foi possível observar, apresentou padrão mutacional bem peculiar, e conforme resultado prévio da análise PFGE, demonstrou nenhum grau de similaridade com as demais amostras do estudo (SILVEIRA et al., 2015). Em trabalho realizado por Silveira e colaboradores (2014), esta amostra, juntamente com a 54, foram as únicas a demonstrar D-teste positivo e a análise de PCR multiplex permitiu a detecção do gene *ermA* para ambas (SILVEIRA et al., 2014). Embora a clindamicina não tenha seu mecanismo de ação vinculado à síntese da parede celular, foi, assim como a vancomicina e a eritromicina, isolada a partir de fontes bacterianas pertencentes ao gênero *Streptomyces*. O

regulador GraSR pertence ao grupo de SRDC tipo-BceRS (SRDC de *Bacillus subtilis*) e é bastante abundante em bactérias Gram positivas (JORDAN; HUTCHINGS; MASCHER, 2008). Uma vez já demonstrado seu importante papel na autoimunidade e defesa contra bacteriocinas, além da sua modulação na resistência a peptídeos catiônicos (CHEUNG et al., 2014; MCCALLUM; BERGER-BÄCHI; SENN, 2010; MEEHL et al., 2007; MUZAMAL et al., 2014), o papel dessas mutações pode estar, de alguma forma, vinculado à resistência induzível por outros antimicrobianos, como as lincosaminas, por exemplo. A ausência de dados adicionais de sequenciamento e de padrões mutacionais vinculados neste mecanismo, além da falta de dados clínicos impede, entretanto, uma avaliação mais profunda.

O SRDC *VraSR* é conhecido por ser um importante estimulador da expressão de enzimas envolvidas na biossíntese do peptidoglicano, o que explica a sua forte relação com os fenótipos hVISA e VISA (MCCALLUM; BERGER-BÄCHI; SENN, 2010). Embora seu operon esteja frequentemente mutado nestes isolados (HIRAMATSU et al., 2014), em nosso estudo, este foi o gene com menor número de mutações dentre as amostras analisadas (Tabela 04). Sua importância, entretanto, já foi estabelecida em estudos anteriores onde foi demonstrado que o bloqueio da sinalização do sensor quinase *VraS* impede o desenvolvimento da resistência aos glicopeptídeos e restaura, completa ou parcialmente, a redução de suscetibilidade a estes antimicrobianos (GALBUSERA et al., 2011). Somado a isso, a relação da ativação de *VraSR* com mutações pontuais em *vraS* parece estar bem caracterizada (CUI et al., 2006b). A principal mutação missense descrita nesse gene foi a *vraS* I5N, na qual um aa isoleucina foi substituído pelo aa asparagina no códon 5 (DODDANGOUDAR et al., 2012; KURODA et al., 2003). Conforme demonstrado por Kuroda e colaboradores (2003), a incorporação desta mutação em Mu50 (VISA) e Mu3 (hVISA) ativou o gene *vraS* destas cepas ativando, por consequência, seu regulador de resposta *VraR*. A ativação de *VraR* eleva a expressão de genes codificadores das enzimas *murZ*, *pbp2*, *sgtB*, *tarA*, *fntA* e *lcpC*, que, em conjunto, favorecem a biossíntese da parede celular em *S. aureus* (KURODA et al., 2003). Além disso, a introdução experimental desta mutação, bem como da mutação *vraS* S329L em isolados sensíveis levou a conversão das mesmas para o fenótipo hVISA, em estudo posterior realizado por Katayama e colaboradores (2009). A mutação *vraS* I5N, no entanto, não foi encontrada em nossas amostras, corroborando dados de outros estudos (DODDANGOUDAR et al., 2011), onde esta substituição não foi também visualizada em amostras VISA. A ausência desta

mutação, sugerida como importante para o desenvolvimento de hVISA (CUI et al., 2006a; KATO et al., 2010), indica que esta pode não ser essencial para a perda de suscetibilidade à vancomicina, ou ainda, que necessita estar associada a outras mutações regulatórias. Segundo Neoh e colaboradores (2008), mutações adicionais, como *vraS* M1K e *graR* D148Q, podem estar associadas com o aumento da resistência à vancomicina, sugerindo que mutações em *vraS*, seguidas por mutações em *graR* são importantes para o desenvolvimento dos fenótipos hVISA e VISA (DODDANGOUDAR et al., 2012).

Nenhuma mutação foi encontrada em *vraS* em nosso estudo, ademais, substituições em *vraR* foram detectadas em apenas um isolado, dentre os oito analisados (Figura 11). A mutação *vraR* E59D foi detectada na amostra 43, que curiosamente, apresentou um alto grau de concordância com o padrão mais prevalente de mutações em isolados VISA obtidos em estudo desenvolvido por Yoo e colaboradores (2013), no qual esta mutação esteve presente. Em tal estudo, esta substituição ocorreu em 36,3% de amostras VSSA pertencentes ao grupo *agr* tipo I e em 92,7% de amostras VISA, igualmente *agr* tipo I, sugerindo que a mutação pode estar associada com a emergência de fenótipos VISA, ainda que tenha sido também demonstrada em bactérias suscetíveis (YOO et al., 2013).

Poucas mutações bem caracterizadas no gene *vraR* foram descritas em isolados VISA até o momento. Considerando que o conjunto de eventos regulados por *VraR* mostra-se bastante extenso, a julgar pela quantidade de genes possivelmente regulados por este sistema, acredita-se que vias adicionais de resposta geradas por outros sistemas SRDC como *GraSR* e *WalKR* possam contribuir para o estabelecimento da resistência endógena aos glicopeptídeos (GALBUSERA et al., 2011). Além disso, mutações em genes importantes do mesmo operon, como *vraT* (ou *yvqF*), podem interferir na atividade deste sistema (BOYLE-VAVRA et al., 2013; GARDETE et al., 2006; QURESHI; YIN; BOYLE-VAVRA, 2014) e não tiveram suas sequências avaliadas no presente estudo. Isso, em parte, pode explicar o motivo pelo qual o fenótipo hVISA de nossas amostras persistiu ainda que na ausência de mutações nos genes *vraSR*.

Outras mutações regulatórias ocorrem no SRDC *WalKR*, que é um importante regulador do metabolismo da parede celular e está, supostamente, vinculado à expressão de autolisinas (JANSEN et al., 2007; SHOJI et al., 2011). Sua importância como regulador em células bacterianas já foi bem estabelecida (DUBRAC et al., 2008) e seu papel no desenvolvimento dos fenótipos hVISA e VISA vem sendo

demonstrado em inúmeros trabalhos (HAFER et al., 2012; HOWDEN et al., 2011; MWANGI et al., 2007; SHOJI et al., 2011). Mutações no gene *walKR* podem resultar em significativa redução da atividade autolítica e consequente espessamento da parede celular, bem como conduzir a co-resistência à vancomicina e daptomicina (HOWDEN et al., 2010a, 2011). Ademais, conforme relatado por Howden e colaboradores (2011), mutações neste gene podem, ainda, implicar na redução da expressão do gene *agr*, atenuando fatores de virulência, além de reduzir a formação de biofilme, características já demonstradas por isolados VISA (HOWDEN et al., 2010a).

Em estudo realizado por Shoji e colaboradores (2011), no qual foi utilizada uma coleção internacional de cepas VISA, foram encontradas mutações no gene *walK* em 61,5% das amostras clínicas isoladas dos diferentes países, incluindo Brasil. A partir da análise de sequenciamento de 39 isolados clínicos foi possível observar as mutações *walK* R222K e A468T como as mais prevalentes entre as amostras, ocorrendo concomitantemente em todos os isolados brasileiros com redução de suscetibilidade à vancomicina analisadas neste estudo. As mesmas substituições foram, ainda, demonstradas em isolados VISA provenientes da Tailândia, EUA e Omã, conforme publicado em estudo realizado por Watanabe e colaboradores (2012) (dados também demonstrados por Hiramatsu e colaboradores, 2014). Em nosso trabalho, dois isolados hVISA apresentaram a mutação *walK* A468T (10 e 43) e somente uma amostra apresentou a substituição R222K (43) (Figura 09). Nenhuma mutação foi encontrada no gene *walR*, corroborando dados encontrados por Shoji e colaboradores (2011), o que pode demonstrar um papel secundário deste gene na evolução da resistência. A substituição A117V no gene *walK*, presente como mutação única na amostra SI13, não foi descrita em nenhum trabalho anterior e possivelmente não está vinculada ao fenótipo de resistência hVISA.

O gene *rpoB* codifica a subunidade beta da holoenzima RNA polimerase, que responde pela transcrição gênica de todo conteúdo celular. Embora não seja um gene regulador, mutações na sua sequência podem mudar drasticamente o perfil transcricional da célula, mais que qualquer outro gene com função reguladora (SAITO et al., 2014). Por este motivo, mutações neste gene são chamadas “mutações regulatórias”, que promovem a resistência por alteração indireta na fisiologia da célula (MATSUO; CUI; KIM, 2013; MATSUO et al., 2011).

Hiramatsu e colaboradores (2014) demonstraram que as mutações mais prevalentes no fenótipo VISA ocorrem no gene *rpoB*. Além dele, mutações únicas em genes codificadores de outras

subunidades como *rpoC*, *rpoD* (*sigA*) e *rpoA* foram encontradas em 45 isolados convertidos ao fenótipo VISA (MATSUO; CUI; KIM, 2013). Sendo assim, uma mudança estrutural na holoenzima RNA polimerase, por si só, parece aumentar a resistência à vancomicina por meio de alterações do metabolismo e fisiologia celular (HIRAMATSU et al., 2014).

Mutações no gene *rpoB* estão, portanto, associadas à redução de suscetibilidade à vancomicina (HIRAMATSU et al., 2014; SAITO et al., 2014) e sua importância já foi demonstrada, inclusive, no fenômeno de resistência a outras categorias de antimicrobianos, como daptomicina, rifampicina e linezolida (CUI et al., 2006b, 2010; HIRAMATSU et al., 2014; WATANABE et al., 2011). Segundo Hiramatsu e colaboradores (2014), dependendo do local e tipo de substituição aminoacídica, mutações nesse gene podem gerar uma variedade de alterações fenotípicas, indicando que múltiplos fenótipos celulares controlados por reguladores independentes podem ser alterados por uma única mutação em *rpoB*. Cui e colaboradores (2006b), por exemplo, demonstraram que a introdução da mutação *rpoB* A621E em bactérias suscetíveis confere heterorresistência não somente à vancomicina, mas também à daptomicina. Já a mutação *rpoB* S746F aumenta a suscetibilidade à linezolida ao mesmo tempo que diminui a suscetibilidade à vancomicina (MATSUO et al., 2011). Além disso, a mutação *rpoB* H481Y, fortemente associada aos fenótipos hVISA e VISA, pode propiciar o surgimento de bactérias altamente resistentes também à rifampicina (HIRAMATSU et al., 2014; WATANABE et al., 2011), enquanto a *rpoB* Q468K promove a resistência à daptomicina e rifampicina (MATSUO et al., 2011).

Vale destacar, ainda, que a importante participação do gene *rpoB* em fenótipos como hMRSA (AIBA et al., 2013) e *slow*VISA (*s*VISA) (SAITO et al., 2014), ampliam ainda mais a lista de fenótipos possíveis por mutações neste gene.

Um estudo realizado por Watanabe e colaboradores (2011) demonstrou que 71% das cepas VISA, provenientes de diferentes regiões do mundo, apresentaram mutações no gene *rpoB*, sendo que 95,6% de mutantes MRSA com resistência à rifampicina demonstraram, também, redução de suscetibilidade à vancomicina. Ainda neste mesmo estudo, a mutação *rpoB* H481N, que em alguns casos esteve associada a mutação S529L, foi detectada em dez das 38 cepas VISA obtidas de diferentes países, incluindo Brasil (dados também demonstrados por Hiramatsu e colaboradores, 2014). A associação da substituição H481N também com a resistência à rifampicina foi, ainda, demonstrada em estudos provenientes da China, Rússia, Espanha e África do Sul, confirmando

possível o efeito pleiotrópico desta mutação (BARANOVICH et al., 2009; SHANG et al., 2015; VAN RENSBURG; WHITELAW; ELISHA, 2012; VILLAR et al., 2011).

Em nosso estudo, mutações no gene *rpoB* foram detectadas em 50% das amostras analisadas (Tabela 04). A mutação H481N esteve presente em três de nossos isolados (43, 69, SI4) de modo que, em dois deles, esta foi a única mutação encontrada dentre os quatro genes avaliados (Figura 10). Embora a contribuição desta mutação para o fenômeno não esteja efetivamente comprovada, sua presença, já demonstrada em elevado número de isolados clínicos com fenótipo VISA, indica que esta pode exercer um papel importante na resistência à vancomicina. Adicionalmente, a ausência de testes de suscetibilidade antimicrobiana à rifampicina para os nossos isolados nos impede de avaliar o possível papel desta mutação na resistência a este antimicrobiano. Ademais, esta mutação, isoladamente, não pareceu influenciar a atividade da daptomicina que demonstrou-se sensível em 100% de nossas amostras (SILVEIRA et al., 2014).

As mutações *rpoB* V731A e Y737F, encontradas no isolado 10 (Figura 10), não parecem ter grande influência sobre a heterorresistência à vancomicina, uma vez que já foram descritas em bactérias VSSA. Apesar disso, este não é o primeiro relato desta mutação em isolados clínicos com redução de suscetibilidade à vancomicina (HIRAMATSU et al., 2014; WATANABE et al., 2011), demonstrando que estudos adicionais são necessários para comprovação do papel destas mutações no fenótipo hVISA.

Resumidamente, das 13 mutações relatadas em nosso estudo (com exceção das mutações exclusivas da amostra 10 em *graS*), nove já foram descritas em outros trabalhos e sugeridas como possíveis responsáveis pelo desenvolvimento dos fenótipos hVISA e VISA (DODDANGOUDAR et al., 2011, 2012; HAFER et al., 2012; HIRAMATSU et al., 2014; HOWDEN et al., 2010b; NEOH et al., 2008; ROCH et al., 2014; WATANABE et al., 2011; YOO et al., 2013) (Tabela 07).

Dos três isolados mais mutados (10, 43 e SI13), dois pertenceram ao mesmo grupo clonal (43 e SI13), por análise de PFGE (SILVEIRA et al., 2015), embora não tenha sido verificada relação epidemiológica entre eles. As três amostras com maior número de mutações foram as únicas caracterizadas no cassete cromossômico *SCCmec* tipo III. As amostras 36, 80 e SI11, que apresentaram mutações em nenhum dos genes, pertenceram ao grupo *SCCmec* II. A amostra SI4 foi classificada no grupo *SCCmec* I e II e apresentou mutações pontuais somente para o gene *rpoB*.

A amostra 69, cuja mutação foi igualmente exclusiva para este gene, foi classificada no cassete cromossômico *SCCmec* tipo II, bem como os isolados 54 e 92, cujos dados de sequenciamento permanecem indisponíveis para análise (SILVEIRA et al., 2015). A relação entre as mutações encontradas e os tipos de cassete *SCCmec* não estão bem estabelecidas. Considerando, porém, que estes são os tipos hospitalares mais predominantes em hospitais de Santa Catarina (SILVEIRA et al., 2015), é compreensível que as maiores taxas de hVISA ocorram entre eles, sugerindo que as subpopulações resistentes surjam como parte da população normal de MRSA presente em nossas instituições de saúde.

Tabela 07. Comparação das mutações encontradas no presente estudo com as descritas na literatura.

Gene	Amostra	SCCmec*	CIM* (µg/mL)	Substituição aa	Fenótipo em outros estudos	Estudos
<i>graS</i>	10	III	1,0	L26I	VSSA	YOO et al., 2013; ROCH et al., 2014
	43 SI13	III III	1,0 2,0	L26F	VISA/ hVISA/ VSSA	YOO et al., 2013; ROCH et al., 2014
	43	III	1,0	I59L	VISA/ hVISA	YOO et al., 2013; ROCH et al., 2014
	10 43 SI13	III III III	1,0 1,0 2,0	T224I	VISA/ hVISA/ VSSA	YOO et al., 2013; ROCH et al., 2014
<i>graR</i>	10	III	1,0	V136I	VSSA	YOO et al., 2013
	10 43	III III	1,0 1,0	D148Q	VISA/ hVISA/ VSSA	NEOH et al., 2008; HOWDEN et al., 2010b; DODDANGOUDAR et al., 2011; DODDANGOUDAR et al., 2012; YOO et al., 2013; ROCH et al., 2014
	10	III	1,0	S207G	-	N.D.
<i>vraR</i>	43	III	1,0	E59D	VISA/ VSSA	YOO et al., 2013; ROCH et al., 2014
<i>walK</i>	SI13	III	2,0	A117V	-	N.D.
	43	III	1,0	R222K	VISA	SHOJI et al., 2011; HIRAMATSU et al., 2014;

	10 43	III III	1,0 1,0	A468T	VISA	SHOJI et al., 2011; HIRAMATSU et al., 2014
<i>rpoB</i>	43 69 SI4	III II I e II	1,0 2,0 1,0	H481N	VISA/ hVISA	CUI et al., 2010; WATANABE et al., 2011; HAFER et al., 2012; HIRAMATSU et al., 2014
	10	III	1,0	V731A	VISA	HIRAMATSU et al., 2014
	10	III	1,0	Y737F	VISA	WATANABE et al., 2011; HIRAMATSU et al., 2014

Legenda: Colunas marcadas com o símbolo “*” apresentam dados obtidos em estudo realizado por Silveira e colaboradores (2014). N.D. Mutação não descrita na literatura. Fonte: desenvolvido pela autora.

Importante considerar que no fenótipo hVISA, mutações presentes nas subpopulações com CIM mais elevados não são idealmente detectadas por sequenciamento, uma vez que outras versões polimórficas do mesmo gene ocorrem em número muito maior na população analisada, conduzindo a um resultado não representativo das alterações genéticas das células de interessante. Metodologias alternativas como *Single cell genomic* podem ser melhor aplicadas, uma vez que sequenciam o genoma de uma única célula para identificar mutações em genes envolvidos com o fenótipo de resistência. Sendo assim, os genomas amplificados das células únicas podem ser, então, sequenciados e comparados às sequências de isolados livres da resistência (OWENS, 2012).

Apesar disso, a ausência de mutações em alguns de nossos isolados é compreensível pois, considerando que a síntese da parede celular está sob o controle de inúmeros genes reguladores, mutações em diferentes genes podem estar envolvidas com metabolismo e construção da parede celular em células hVISA. Genes como *cmpK*, *msrR*, *gtaB*, *rpoC*, *pbp4*, *tagO*, *tagA*, *pykA*, *trpC*, por exemplo, podem ter influência sobre a redução da suscetibilidade à vancomicina (HIRAMATSU et al., 2014; MATSUO; CUI; KIM, 2013) e não tiveram suas sequências avaliadas neste estudo. Além disso, levando em conta a diversidade genética de nossos isolados, cujas coletas ocorreram em diferentes momentos e locais de Santa Catarina (SILVEIRA et al., 2014), a ausência de mutações em alguns deles pode indicar que mecanismos distintos tenham sido utilizados para a expressão da heterorresistência. Vale destacar, ainda, que outros autores, como Shoji e colaboradores (2011), não detectaram mutações nos genes *graSR* e *vraSR* de amostras VISA experimentais, confirmando que mecanismos distintos podem realmente ocorrer entre diferentes isolados.

Importante lembrar também que a evolução aos fenótipos hVISA e VISA ocorre por uma série de mutações únicas, cada uma fornecendo um impacto adicional sobre o acúmulo da resistência (MWANGI et al., 2007; SHOJI et al., 2011). Posto que em alguns casos a ausência de mutações não fornece uma explicação completa (HOWDEN et al., 2008a), em outros, uma única mutação pode ser responsável por induzir a resistência, embora não no mesmo nível de uma bactéria na qual mutações múltiplas se acumularam (HOWDEN et al., 2011).

Ademais, mutações regulatórias presentes em dois ou mais genes reguladores podem ser requeridas para a conversão do fenótipo VSSA a hVISA, exigindo, para isso, a colaboração entre diferentes genes de modo que a resistência seja promovida, sem elevar demais o custo biológico da célula bacteriana (HIRAMATSU et al., 2014). Em nosso estudo, o isolado

43 foi a amostra cujas mutações ocorreram no maior número de genes, embora a relação das mutações com o grau de resistência não tenha sido bem estabelecida.

Por fim, substituições únicas resultantes de mutações pontuais em pelo menos um de 20 genes possíveis, confirmam ainda mais a complexidade do mecanismo de resistência endógena à vancomicina em *S. aureus* (MATSUO et al., 2011). Embora estudos indiquem que os genes regulatórios *graSR*, *vraSR*, *walkR* e *rpoB* estejam mais frequentemente implicados neste fenótipo (HAFER et al., 2012; SHOJI et al., 2011), mutações possíveis nos genes citados continuam altamente variáveis (HOWDEN; PELEG; STINEAR, 2013).

Uma variedade de abordagens experimentais como a hibridização de cDNA (KURODA; KUWAHARA-ARAI; HIRAMATSU, 2000), análise de microarranjo (*Microarray analyses*) (CUI et al., 2005; HOWDEN et al., 2008b; KURODA et al., 2003; MCALEESE et al., 2006) ou PCR quantitativa precedida de transcrição reversa (RT-qPCR) (CAFISO et al., 2012b), tem sido utilizada no sentido de determinar o perfil de alterações transcricionais de bactérias com suscetibilidade reduzida à vancomicina. A RT-qPCR é uma ferramenta sensível que pode ser aplicada para quantificação de transcritos de RNA de amostras biológicas (LEWIS; RICE, 2015). Neste estudo, a RT-qPCR foi padronizada com sucesso para a avaliação da expressão de quatro genes envolvidos na regulação da síntese da parede celular bacteriana, com a utilização de três genes de referência. Especialmente antes do estabelecimento de normas para publicação de dados referentes a qPCR (BUSTIN et al., 2009), um elevado número de trabalhos com *S. aureus* normalizou seus dados utilizando um único gene de referência sendo, em sua maioria, os genes *gyrB* ou 16SrRNA (VALIHRACH; DEMNEROVA, 2012). Conforme demonstrado por Valihrach e colaboradores (2012), o uso isolado destes genes deve ser desencorajado uma vez que podem propiciar uma alta taxa de erro no processo de normalização, em especial o 16srRNA, cuja variabilidade de expressão é suficientemente alta para interferir nos resultados de quantificação relativa dos genes alvos. Este mesmo estudo relatou que para as condições experimentais utilizadas, o melhor método de normalização consistiu do uso da média geométrica dos genes *tpi*, *pta* e *hu*. Conforme sugerido por Bustin e colaboradores (2009) nosso estudo avaliou a estabilidade de expressão de quatro possíveis genes de referência, demonstrando que, embora não na mesma combinação, os genes *gyrB*, *tpi*, *pta* e *hu* apresentaram-se relativamente estáveis frente a diferentes condições

experimentais, podendo ser utilizados em associação para normalização segura de dados de qPCR em isolados de *S.aureus*.

Embora isolados VISA com diferentes origens genéticas tenham, frequentemente, apresentado os mesmos genes como variavelmente expressos nos diversos laboratórios, dados de diferentes estudos demonstram que a aquisição dos fenótipos hVISA e VISA é, provavelmente, um processo de múltiplos caminhos, mesmo entre isolados estreitamente relacionados (HOWDEN et al., 2010a).

Entre os genes geralmente superexpressos em amostras com redução de suscetibilidade à vancomicina, estão os codificadores do SRDC GraSR (CUI et al., 2005; HOWDEN et al., 2010a). No presente estudo, entretanto, o aumento da expressão neste gene não foi verificado em nenhuma dos isolados hVISA, quando estes foram comparadas à cepa padrão suscetível. Nossos resultados corroboraram os dados encontrados por Cafiso e colaboradores (2012b), onde diferenças significativas na expressão de *graSR* não foram demonstradas para isolados hVISA, em condições livres do antimicrobiano (CAFISO et al., 2012b). Ainda neste mesmo estudo, a adição de vancomicina no meio de crescimento não resultou em alterações do padrão transcricional destas amostras. Embora o mesmo tenha ocorrido para a maioria de nossos isolados, as amostras 69 e a cepa padrão Mu50 (VISA) quando expostas a concentrações sub-inibitórias de vancomicina, tiveram sua expressão aumentada, demonstrando a possível modulação da resistência exercida pelo antimicrobiano.

O gene *vraSR* já foi identificado como superexpresso em amostras VISA por ensaios de hibridização de cDNA (KURODA; KUWAHARA-ARAI; HIRAMATSU, 2000) e, ainda, por análises de microarranjo (KURODA et al., 2003; MCCALLUM et al., 2006). Estudos adicionais confirmaram a supra regulação deste gene e sua participação no sinal de “estímulo da parede celular” em isolados com redução de suscetibilidade à vancomicina (HOWDEN et al., 2008b; MCALEESE et al., 2006), embora poucos trabalhos tenham aplicado o método de RT-qPCR para análise de expressão deste sistema.

Em nosso trabalho, a superexpressão de *vraSR* em isolados hVISA não foi demonstrada, uma vez que diferenças estatísticas não ocorreram em nenhuma das condições testadas. Embora se saiba da importante relação deste sistema com a síntese anormal de peptidoglicano gerada pelo sinal de “estímulo da parede celular”, já foi demonstrado que os fenótipos hVISA e VISA podem ser desenvolvidos, ainda na ausência deste sinal (HOWDEN et al., 2008b). Tal fato, possivelmente, pode explicar a inexistência de alterações significativas neste gene

demonstrada em nosso estudo, já que mutações importantes e modificação do padrão de expressão não foram encontradas aqui.

A redução da atividade autolítica, mediada pelo SRDC *walKR*, é outro importante fator comum aos fenótipos hVISA e VISA, embora não seja demonstrada para todos eles (HOWDEN et al., 2010a).

Jansen e colaboradores (2007), reportaram que *walKR* foi altamente suprarregulado devido a inserção de mutação em seu promotor nos isolados clínicos de VISA, sugerindo que o aumento da resistência à vancomicina tenha sido mediado pela ativação deste sistema. Em estudo recente, ao contrário, Delaune e colaboradores (2012) relataram que a depleção de *walKR* pode aumentar o espessamento da parede celular em *S. aureus*, embora outro estudo tenha demonstrado que uma deleção neste mesmo gene não provocou alterações significativas da expressão de *walKR* em nenhum dos mutantes analisados (SHOJI et al., 2011).

Cafiso e colaboradores (2012), por análise de RT-qPCR, observaram que o gene *walK* foi significativamente expresso em isolados clínicos de hVISA, bem como na cepa padrão Mu3 (hVISA) quando comparadas a bactérias sensíveis. Ao contrário, diferenças significativas não foram encontradas para a Mu50 (VISA) e outra amostra hVISA analisada no mesmo estudo. Ademais, somente o gene *walKR* teve uma redução significativa da sua expressão em Mu50 quando exposta a concentrações sub inibitórias de vancomicina, demonstrando que a redução da atividade autolítica pode estar vinculada à baixa expressão deste gene (CAFISO et al., 2012b).

Em nosso estudo, diferenças na transcrição em *walKR* não foram encontradas concordando, em parte, com os resultados apresentados por Cafiso e colaboradores (2012). A ausência de alterações na expressão do gene *walKR* em nossas amostras podem indicar que o desenvolvimento do fenótipo ou mesmo a provável redução da atividade autolítica (não comprovada em nossos isolados) não esteja necessariamente vinculada a modificações transcricionais deste gene, conforme já demonstrado por outros autores (HOWDEN et al., 2010a).

Vale lembrar, ainda, que os ácidos teicóicos exercem um importante papel no bloqueio da degradação do peptidoglicano por enzimas autolíticas e que a própria vancomicina pode bloquear a atividade de hidrolases durante o processo de aquisição da resistência (SIERADZKI; TOMASZ, 2003).

Em nosso estudo, o gene com maior número de alterações da transcrição foi o *rpoB* (Figura 18). Embora diferenças estatísticas não tenham ocorrido para a maior parte das nossas amostras, nós observamos um aumento da expressão deste gene nos isolados 69, 80, 92 e na cepa de

referência Mu3 (hVISA), quando estas foram expostas à vancomicina no meio de crescimento. Somente no isolado 69 este gene encontrou-se mutado no códon 481, conforme anteriormente exposto (Figura 09). Curiosamente, este gene esteve naturalmente mais expresso na amostra sensível que em nossos isolados hVISA, embora diferença significativa tenha ocorrido em somente dois deles (80 e 92). A análise de expressão do gene *rpoB* tem sido pouco descrita na literatura científica e para estudos de RT-qPCR ele foi, algumas vezes, utilizado para a normalização de dados, possivelmente devido a sua pouca variabilidade frente a diferentes condições de expressão. Em nosso estudo, entretanto, alterações no padrão de expressão ocorreram para algumas de nossas amostras cujo fenótipo de resistência pode estar vinculado ao aumento de transcritos de outros genes cujas funções metabólicas tenham alterado o padrão de resposta da célula à vancomicina.

De modo geral, padrões transcricionais divergentes são observados em diferentes isolados hVISA, mesmo naqueles cujos sinais de “estímulo da parede celular” estejam ativados (HOWDEN et al., 2010a). O padrão transcricional observado em nossos isolados, possivelmente, não teve relação com as mutações encontradas em cada gene analisado, uma vez que modificações da expressão gênica estiveram presentes somente em pequeno número de amostras, nas quais mutações pontuais não foram observadas. Considerando ainda que alterações genômicas não foram proporcionalmente relacionadas a alterações da transcrição dos genes analisados, ensaios para avaliação de modificações traducionais, como o *Western Blot*, ou fisiológicas, como a clonagem de genes mutados em bactérias sensíveis para posterior observação de mudanças no padrão de expressão da resistência, seriam abordagens relevantes para a elucidação dos mecanismos envolvidos no fenótipo hVISA de nossas amostras.

Somado a isso, a presença de mutações em regiões promotoras, apesar de não analisadas neste estudo, podem nos dar informações importantes quanto ao seu papel frente aos perfis de expressão encontrados nos isolados hVISA. Ademais, considerando que os genes analisados em nosso trabalho representam genes reguladores, a expressão de outros genes por eles regulados pode, ainda, nos oferecer respostas adicionais sobre a sua função regulatória na redução da suscetibilidade à vancomicina em *S. aureus*.

A redução de suscetibilidade à vancomicina é, portanto, um complexo processo que envolve uma série de alterações em genes reguladores. Os efeitos destas alterações são bastante abrangentes, levando a mudanças globais significativas da transcrição, que

potencialmente modificam o metabolismo celular e, além de atenuar o potencial de virulência, podem afetar a capacidade do sistema imune de combater a infecção gerada por bactérias resistentes (HOWDEN; PELEG; STINEAR, 2013).

Embora muitas questões permaneçam sem resposta, nosso estudo forneceu uma importante visão de alterações genômicas e transcriptômicas vinculadas ao desenvolvimento dos fenótipos hVISA que ocorreram naturalmente em hospitais de Santa Catarina. Posto que o mecanismo não pode ser aplicado a todos os isolados com redução de suscetibilidade, espera-se que os resultados fisiológicos destas alterações sejam semelhantes em todos eles, isto é, o aumento da síntese de peptidoglicano e o espessamento da parede celular.

A compreensão dos determinantes genéticos da resistência endógena à vancomicina, portanto, permanece um desafio para o laboratório, uma vez demonstrada a variedade de alterações possíveis e o caráter multifatorial da redução de suscetibilidade em *S. aureus*.

Sendo assim, outros trabalhos são necessários para identificação dos determinantes moleculares da resistência endógena e do momento no qual essas alterações ocorrem. Estudos adicionais com maior número de isolados somados a uma avaliação cuidadosa do impacto de múltiplas alterações moleculares podem conduzir a evidências que auxiliem a compreensão dos fatores genéticos envolvidos neste fenômeno, levando a identificação de marcadores consistentes da resistência e ao desenvolvimento de métodos de detecção molecular, que facilitem a rápida identificação laboratorial e a determinação dos impactos clínicos e epidemiológicos com maior confiabilidade.

7 CONCLUSÃO

Entre as amostras analisadas, 62,5% apresentaram mutações em pelo menos um dos quatros genes avaliados.

As mutações mais prevalentes foram a *graS* T224I e *rpoB* H481N, seguidas pelas mutações *graR* D148Q e *walk* A468T.

Mutações importantes como *walk* R222K e *vraR* E59D foram observadas com menor frequência, ocorrendo em apenas um isolado.

Não foram encontradas mutações nos genes *walR* e *vraS*.

A padronização da técnica de RT-qPCR foi realizada com sucesso, permitindo avaliar o nível de expressão dos genes propostos para este estudo.

Alterações da expressão em *graSR* foram detectadas em somente duas amostras, após a exposição das mesmas a concentrações sub-inibitórias de vancomicina.

Alterações da expressão dos genes em condições livres de vancomicina foram raras, ocorrendo apenas em dois isolados para o gene *rpoB*.

Alterações na transcrição do gene *rpoB* foram observadas em quatro isolados quando estes foram expostos a crescimento em meio de cultura enriquecido com vancomicina.

Alteração na expressão dos genes *walkR* e *vraSR* não foram encontradas.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Não foi verificada alteração mutacional única responsável pelo desenvolvimento da heterorresistência em nossas amostras. Em 37,5% delas, mutações nos genes avaliados não foram observadas, sugerindo que outro mecanismo molecular possa estar envolvido na resistência destes isolados ou que mutações sequenciais em genes variados possam ser necessárias para a obtenção do fenótipo hVISA. Apesar disso, as mutações *graR* D148Q e *rpoB* H481N, encontradas em pequeno número de nossas amostras, estão mais fortemente relacionadas ao mecanismo de resistência endógeno à vancomicina em isolados heterorresistentes.

Da mesma forma, poucas amostras apresentaram alteração do padrão transcricional dos genes avaliados, sendo os genes *graSR* e *rpoB* mais expressos naquelas em que houve exposição prévia a concentrações sub-inibitórias de vancomicina.

9 PERSPECTIVAS

Clonar os genes mutados em cepas eletrocompetentes de *S. aureus* sensíveis à vancomicina para verificar a consequente expressão do fenótipo hVISA, com posterior confirmação por método PAP-AUC (trabalho já iniciado no decorrer deste estudo).

Analisar o sequenciamento de outros genes possivelmente vinculados a resistência endógena à vancomicina.

Analisar o sequenciamento das regiões promotoras dos genes *graSR*, *vraSR*, *walKR* e *rpoB*.

Realizar análise estatística multifatorial para avaliar o papel de alterações sequenciais em diferentes genes do mesmo isolado para o desenvolvimento do fenótipo hVISA.

Avaliar a presença de espessamento da parede celular em nossas amostras por meio do uso de microscopia eletrônica de transmissão.

Realizar ensaios de *Western Blot* para verificação de alterações do perfil traducional dos genes *graSR*, *vraSR*, *walKR* e *rpoB*.

REFERÊNCIAS

ADAM, H. J. et al. Detection and Characterization of Heterogeneous Vancomycin- Intermediate Staphylococcus aureus Isolates in Canada: Results from the Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program , 1995 – 2006. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 2, p. 945–949, 2010.

AIBA, Y. et al. Mutation of RNA Polymerase β -Subunit Gene Promotes Heterogeneous-to-Homogeneous Conversion of β -Lactam Resistance. v. 57, n. 10, p. 4861–4871, 2013.

ALAM, T. et al. Dissecting Vancomycin-Intermediate Resistance in Staphylococcus aureus Using Genome-Wide Association. **Genome Biology and Evolution**, v. 6, n. 5, p. 1174–1185, 2014.

ANDERSEN, C. L.; LEDET-JENSEN, J.; ORNTOFT, T. Normalization of real-time quantitative RT-PCR data: a mode-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Research**, v. 64, p. 5245–5250, 2004.

ANDRADE-BAIOCCHI, S. et al. Endocarditis due to glycopeptide-intermediate Staphylococcus aureus: case report and strain characterization. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 45, p. 149–152, 2003.

ARCHER, G. L. Staphylococcus aureus: A Well-Armed Pathogen. **Clinical Infectious Diseases**, v. 26, p. 1179–1181, 1998.

BAE, I. et al. Heterogeneous Vancomycin-Intermediate Susceptibility Phenotype in Bloodstream Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Isolates from an International Cohort of Patients with Infective Endocarditis: Prevalence , Genotype , and Clinical Significance. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 200, p. 1355–1366, 2009.

BAIRD-PARKER, A. C. Classification and identification of staphylococci and their resistance to physical agents. In: COHEN, J. O. (Ed.). . **The Staphylococci**. Nova Iorque: Wiley, 1972. p. 1–20.

BARANOVICH, T. et al. Molecular characterization and susceptibility of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* isolates from hospitals and the community in Vladivostok, Russia. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 16, n. 6, p. 575–582, 2009.

BELCHEVA, A.; GOLEMI-KOTRA, D. A Close-up View of the *VraSR* Two-component System-A mediator of *Staphylococcus aureus* response to cell wall damage. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 18, p. 12354–12364, 2008.

BOYLE-VAVRA, S. et al. Reversion of the Glycopeptide Resistance Phenotype in *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 2, p. 272–277, 2000.

BOYLE-VAVRA, S. et al. *VraT/YvqF* Is Required for Methicillin Resistance and Activation of the *VraSR* Regulon in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 1, p. 83–95, 2013.

BRAISSANT, O. et al. Microbial growth and isothermal microcalorimetry: Growth models and their application to microcalorimetric data. **Thermochimica Acta**, v. 555, p. 64–71, 2013.

BRCST. **Comitê Brasileiro de Testes de Sensibilidade aos Antimicrobianos**. Disponível em: <<http://brcast.org.br/>>. Acesso em: 14 fev. 2016.

BUSTIN, S. A. et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–622, 2009.

CAFISO, V. et al. A Novel delta-Hemolysis Screening Method for Detecting Heteroresistant Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus* and Vancomycin-Intermediate *S. aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 5, p. 1742–1744, 2012a.

CAFISO, V. et al. Modulating activity of vancomycin and daptomycin on the expression of autolysis cell-wall turnover and membrane charge genes in hVISA and VISA strains. **PLoS ONE**, v. 7, n. 1, p. e29573, 2012b.

CAMPANILE, F. et al. Heteroresistance to glycopeptides in Italian methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates.

International Journal of Antimicrobial Agents, v. 36, n. 5, p. 415–419, 2010.

CASAPAO, A. M. et al. Clinical Outcomes in Patients with Heterogeneous Vancomycin- Intermediate *Staphylococcus aureus* Bloodstream Infection. v. 57, n. 9, p. 4252–4259, 2013.

CASAPAO, A. M. et al. Evaluation of Vancomycin Population Susceptibility Analysis Profile as a Predictor of Outcomes for Patients with Infective Endocarditis Due to Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 8, p. 4636–4641, 2014.

CÁZARES-DOMÍNGUEZ, V. et al. Vancomycin Tolerant, Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Reveals the Effects of Vancomycin on Cell Wall Thickening. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. e0118791, 2015.

CETINKAYA, Y.; FALK, P.; MAYHALL, C. G. Vancomycin-Resistant Enterococci. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 4, p. 686–707, 2000.

CHANG, S. et al. Infection with Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Containing the *vanA* Resistance Gene. **The New England Journal of Medicine**, v. 348, p. 1342–1347, 2003.

CHANG, S. et al. Detection of heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* isolates using a combination of δ -hemolysis assay and Etest. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 81, n. 4, p. 246–250, 2015.

CHARLES, P. G. P. et al. Clinical Features Associated with Bacteremia Due to Heterogeneous *Staphylococcus aureus*. v. 38, 2004a.

CHARLES, P. G. P. et al. Clinical Features Associated with Bacteremia Due to Heterogeneous Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, p. 448–451, 2004b.

CHEN, H. et al. The incidence of heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* correlated with increase of

vancomycin MIC. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 71, p. 301–303, 2011.

CHEUNG, A. L. et al. Site-Specific Mutation of the Sensor Kinase GraS in *Staphylococcus aureus* Alters the Adaptive Response to Distinct Cationic. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 12, p. 5336–5345, 2014.

CLSI. **Clinical Laboratory Standards Institute. M07-A10 - Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. Wayne: CLSI, 2015.

CUI, L. et al. Contribution of a Thickened Cell Wall and Its Glutamine Nonamidated Component to the Vancomycin Resistance Expressed by *Staphylococcus aureus* Mu50. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 9, p. 2276–2285, 2000.

CUI, L. et al. Cell Wall Thickening Is a Common Feature of Vancomycin Resistance in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 5–14, 2003.

CUI, L. et al. DNA Microarray-Based Identification of Genes Associated with Glycopeptide Resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 8, p. 3404–3413, 2005.

CUI, L. et al. Novel Mechanism of Antibiotic Resistance Originating in Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 2, p. 428–438, 2006a.

CUI, L. et al. Correlation between Reduced Daptomycin Susceptibility and Vancomycin Resistance in Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 3, p. 1079–1082, 2006b.

CUI, L. et al. Contribution of *vraSR* and *graSR* Point Mutations to Vancomycin Resistance in Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 3, p. 1231–1234, 2009.

CUI, L. et al. An RpoB Mutation Confers Dual Heteroresistance to Daptomycin and Vancomycin in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial**

Agents and Chemotherapy, v. 54, n. 12, p. 5222–5233, 2010.

DENGLER, V. et al. Induction kinetics of the *Staphylococcus aureus* cell wall stress stimulon in response to different cell wall active antibiotics. **BMC Microbiology**, v. 11, n. 16, 2011.

DEURENBERG, R. H.; STOBBERINGH, E. E. The evolution of *Staphylococcus aureus*. **Infection , Genetics and Evolution**, v. 8, p. 747–763, 2008.

DEVI, Y. et al. Challenges in the Laboratory Diagnosis and Clinical Management of Heteroresistant Vancomycin *Staphylococcus aureus* (hVISA). **Clinical Microbiology : Open Access**, v. 4, n. 4, p. 1–9, 2015.

DODDANGOUDAR, V. C. et al. CMI Tracking changes in the *vraSR* and *graSR* two component regulatory systems during the development and loss of vancomycin non-susceptibility in a clinical isolate. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 8, p. 1268–1272, 2011.

DODDANGOUDAR, V. C. et al. Role of stop codons in development and loss of vancomycin non-susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, p. 2101–2106, 2012.

DUBRAC, S. et al. Micro Review A matter of life and death : cell wall homeostasis and the WalkR (YycGF) essential signal transduction pathway. v. 70, n. October, p. 1307–1322, 2008.

ENA, J. et al. The epidemiology of intravenous vancomycin usage in a university hospital. A 10-year study. **Journal of the American Medical Association**, v. 269, n. 5, p. 598–602, 1993.

ENTENZA, J. M. et al. Rapid Detection of *Staphylococcus aureus* Strains with Reduced Susceptibility to Vancomycin by Isothermal Microcalorimetry. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 180–186, 2014.

EUCAST. **European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - Tabelas de pontos de corte para interpretação de CIMs e diâmetro de halos**. Disponível em: <<http://brcast.org.br/documentos/>>.

Acesso em: 12 dez. 2015.

EUZEBY, J. P. **List of Prokaryotic names with standing in nomenclature**. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/m/mycobacterium.html>>. Acesso em: 5 fev. 2016.

FALORD, M. et al. Investigation of the *Staphylococcus aureus* GraSR Regulon Reveals Novel Links to Virulence, Stress Response and Cell Wall Signal Transduction Pathways. **PLoS ONE**, v. 6, n. 7, p. e21323, 2011.

FONG, R. K. C. et al. Clinical features and treatment outcomes of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) and heteroresistant vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (hVISA) in a tertiary care institution in Singapore. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 28, p. 983–987, 2009.

FOWLER, V. G. et al. Daptomycin versus Standard Therapy for Bacteremia and Endocarditis Caused by *Staphylococcus aureus*. **The New England Journal of Medicine**, v. 355, n. 7, p. 653–665, 2006.

GALBUSERA, E. et al. Site-Specific Mutation of *Staphylococcus aureus* VraS Reveals a Crucial Role for the VraR-VraS Sensor in the Emergence of Glycopeptide Resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 3, p. 1008–1020, 2011.

GALES, A. C. et al. Antimicrobial Susceptibility of Gram-Positive Bacteria Isolated in Brazilian Hospitals Participating in the SENTRY Program (2005–2008). **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 13, p. 90–98, 2009.

GARDETE, S. et al. Role of VraSR in Antibiotic Resistance and Antibiotic-Induced Stress Response in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 10, p. 3424–3434, 2006.

GARDETE, S. et al. Genetic pathway in acquisition and loss of vancomycin resistance in a methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strain of clonal type USA300. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 2,

2012.

GARDETE, S.; TOMASZ, A. Mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. v. 124, n. 7, 2014.

GEISEL, R. et al. Emergence, Mechanism, and Clinical Implications of Reduced Glycopeptide Susceptibility in *Staphylococcus aureus*. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 20, p. 685–697, 2001.

GIESBRECHT, P. et al. Staphylococcal Cell Wall: Morphogenesis and Fatal Variations in the Presence of Penicillin. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 4, p. 1371–1414, 1998.

GOMES, D. M.; WARD, K. E.; LAPLANTE, K. L. Clinical Implications of Vancomycin Heteroresistant and Intermediately Susceptible *Staphylococcus aureus*. **Pharmacotherapy**, v. 35, n. 4, p. 424–432, 2015.

HAFER, C. et al. Contribution of Selected Gene Mutations to Resistance in Clinical Isolates of Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 11, p. 5845–5851, 2012.

HAL, S. J. VAN; LODISE, T. P.; PATERSON, D. L. The Clinical Significance of Vancomycin Minimum Inhibitory Concentration in *Staphylococcus aureus* Infections: A Systematic Review and Meta-analysis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 54, n. 6, p. 755–771, 2012.

HANAKI, H. et al. Activated cell-wall synthesis is associated with vancomycin resistance in methicillin-resistant. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 42, p. 199–209, 1998.

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

HARAGA, I. et al. Emergence of vancomycin resistance during therapy against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a burn patient - Importance of low-level resistance to vancomycin. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 6, n. 4, p. 302–308, 2002.

HERBERT, S. et al. Molecular Basis of Resistance to Muramidase and Cationic Antimicrobial Peptide Activity of Lysozyme in Staphylococci. **PLoS Pathogens**, v. 3, n. 7, p. e102, 2007.

HIRAMATSU, K. et al. Dissemination in Japanese hospitals of strains of Staphylococcus aureus heterogeneously resistant to vancomycin. **The Lancet**, v. 350, p. 1670–1673, 1997a.

HIRAMATSU, K. et al. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 40, p. 135–146, 1997b.

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

HIRAMATSU, K. et al. Vancomycin-intermediate resistance in Staphylococcus aureus. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 2, p. 213–224, 2014.

HIRAMATSU, K.; CUI, L.; KUWAHARA-ARAI, K. Has vancomycin-resistant Staphylococcus aureus started going it alone? **The Lancet**, v. 364, p. 565–566, 2004.

HOLMES, N. E.; JOHNSON, P. D. R.; HOWDEN, B. P. Relationship between Vancomycin-Resistant Staphylococcus aureus, Vancomycin-Intermediate S. aureus, High Vancomycin MIC, and. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 8, p. 2548–2552, 2012.

HORNE, K. C. et al. Prospective Comparison of the Clinical Impacts of Heterogeneous Staphylococcus aureus (MRSA) and Vancomycin-Susceptible MRSA. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 8, p. 3447–3452, 2009.

HOWDEN, B. P. et al. Isolates with Low-Level Vancomycin Resistance Associated with Persistent Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Bacteremia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 9, p. 3039–3047, 2006.

HOWDEN, B. P. et al. Genomic Analysis Reveals a Point Mutation in the Two-Component Sensor Gene *graS* That Leads to Intermediate

Vancomycin Resistance in Clinical *Staphylococcus aureus*.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 52, n. 10, p. 3755–3762, 2008a.

HOWDEN, B. P. et al. Different bacterial gene expression patterns and attenuated host immune responses are associated with the evolution of low-level vancomycin resistance during persistent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia. **BMC Microbiology**, v. 8, n. 39, 2008b.

HOWDEN, B. P. et al. Reduced Vancomycin Susceptibility in *Staphylococcus aureus*, Including Vancomycin-Intermediate and Heterogeneous Vancomycin-Intermediate Strains: Resistance Mechanisms, Laboratory Detection, and Clinical Implications. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 1, p. 99–139, 2010a.

HOWDEN, B. P. et al. Complete Genome Sequence of *Staphylococcus aureus* Strain JKD6008, an ST239 Clone of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* with. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 21, p. 5848–5849, 2010b.

HOWDEN, B. P. et al. Evolution of Multidrug Resistance during *Staphylococcus aureus* Infection Involves Mutation of the Essential Two Component Regulator WalKR. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 11, p. e1002359, 2011.

HOWDEN, B. P.; PELEG, A. Y.; STINEAR, T. P. The evolution of vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) and heterogeneous-VISA. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 21, p. 575–582, 2013.

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

HUANG, S. et al. Prevalence of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) and heterogeneous VISA among methicillin-resistant *S. aureus* with high vancomycin minimal inhibitory concentrations in Taiwan: A multicenter surveillance study, 2012–2013. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. S1684, p. 1–

7, 2015.

HUANG, Y. T. et al. Comparative bactericidal activities of daptomycin, glycopeptides, linezolid and tigecycline against blood isolates of Gram-positive bacteria in Taiwan. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, n. 2, p. 124–129, 2008.

HUBERT, S. K. et al. Glycopeptide-Intermediate Staphylococcus aureus: Evaluation of a Novel Screening Method and Results of a Survey of Selected U.S. Hospitals. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 11, p. 3590–3593, 1999.

HUGGETT, J. et al. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. **Genes and Immunity**, v. 6, p. 279–284, 2005.

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

JANSEN, A. et al. Role of insertion elements and yycFG in the development of decreased susceptibility to vancomycin in Staphylococcus aureus. v. 297, p. 205–215, 2007.

JORDAN, S.; HUTCHINGS, M. I.; MASCHER, T. Cell envelope stress response in Gram-positive bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 32, p. 107–146, 2008.

KALIL, A. C. et al. Association Between Vancomycin Minimum Inhibitory Concentration and Mortality Among Patients With Staphylococcus aureus Bloodstream Infections - A Systematic Review and Meta-analysis. **Journal of American Medical Association**, v. 312, n. 15, p. 1552–1564, 2014.

KATAYAMA, Y. et al. Selection of Heterogeneous Vancomycin-Intermediate Staphylococcus aureus by Imipenem □. v. 53, n. 8, p. 3190–3196, 2009.

KATO, Y. et al. Genetic changes associated with glycopeptide resistance in Staphylococcus aureus: predominance of amino acid

substitutions in YvqF/VraSR. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, p. 37–45, 2010.

KURODA, M. et al. Two-component system VraSR positively modulates the regulation of cell-wall biosynthesis pathway in *Staphylococcus aureus*. **Molecular Microbiology**, v. 49, n. 3, p. 807–821, 2003.

KURODA, M.; KUWAHARA-ARAI, K.; HIRAMATSU, K. Identification of the Up- and Down-Regulated Genes in Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains Mu3 and Mu50 by cDNA Differential Hybridization Method. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 269, p. 485–490, 2000.

LEONARD, S. N. et al. Evaluation of the Etest GRD for the detection of *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to glycopeptides. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, p. 489–492, 2009.

LEWIS, A. M.; RICE, K. C. Quantitative real-time PCR (qPCR) workflow for analyzing *Staphylococcus aureus* gene expression. **Methods in Molecular Biology**, v. 1373, p. 143–154, 2015.

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

LIU, C.; CHAMBERS, H. F. *Staphylococcus aureus* with Heterogeneous Resistance to Vancomycin: Epidemiology, Clinical Significance, and Critical Assessment of Diagnostic Methods. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 10, p. 3040–3045, 2003.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2-delta-delta-CT Method. **Methods**, v. 25, p. 402–408, 2001.

LOIR, Y. LE; BARON, F.; GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. **Genetics and Molecular Research**, v. 2, n. 1, p. 63–76, 2003.

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

LOWY, F. D. Antimicrobial resistance : the example of Staphylococcus aureus. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 111, n. 9, p. 1265–1273, 2003.

LUTZ, L.; BARTH, A. L. Susceptibility of Staphylococcus aureus isolates to vancomycin at a university hospital in southern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 244–246, 2006.

MADIGAN, M. et al. **Microbiologia de Brock**. 12. ed. [2010].

MAINARDI, J. L. et al. Decreased teicoplanin susceptibility of methicillin-resistant strains of Staphylococcus aureus. **J.Infect.Dis.**, v. 171, n. 6, p. 1646–1650, 1995.

MANFREDINI, C.; PICOLI, S. U.; BECKER, A. P. Comparação de métodos na determinação de sensibilidade à vancomicina em Staphylococcus aureus resistente à metilina. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 2, p. 141–145, 2011.

MAOR, Y. et al. Prevalence and Characteristics of Heteroresistant Vancomycin-Intermediate Staphylococcus aureus Bacteremia in a Tertiary Care Center. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 5, p. 1511–1514, 2007.

MAOR, Y. et al. Clinical features of heteroresistant vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* bacteremia versus those of methicillin-resistant *S. aureus* bacteremia. **The Journal of infectious diseases**, v. 199, n. 5, p. 619–24, 2009.

MARLOWE, E. M. et al. Practical Strategies for Detecting and Confirming Vancomycin-Intermediate Staphylococcus aureus: a Tertiary-Care Hospital Laboratory 's Experience. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 7, p. 2637–2639, 2001.

MARQUES, J. B. et al. Detection of Staphylococcus aureus with an intermediate profile to vancomycin (VISA) isolate from Santa Maria, RS. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 277–279, 2013.

MATHER, C. A. et al. Rapid Detection of Vancomycin Intermediate Staphylococcus aureus (VISA) by Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF). **Journal of Clinical Microbiology**, 2016.

MATSUO, M. et al. Mutation of RNA Polymerase β Subunit (rpoB) Promotes hVISA-to-VISA Phenotypic Conversion of Strain Mu3. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 9, p. 4188–4195, 2011.

MATSUO, M.; CUI, L.; KIM, J. Comprehensive Identification of Mutations Responsible for Heterogeneous Vancomycin-Intermediate Staphylococcus aureus (hVISA) -to-VISA Conversion in Laboratory-Generated VISA Strains Derived from hVISA Clinical Strain Mu3. v. 57, n. 12, p. 5843–5853, 2013.

MAVROS, M. N. et al. Impact of vancomycin minimum inhibitory concentration on clinical outcomes of patients with vancomycin-susceptible Staphylococcus aureus infections: a meta-analysis and meta-regression. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 40, p. 496–509, 2012.

MCALEESE, F. et al. Overexpression of Genes of the Cell Wall Stimulon in Clinical Isolates of Staphylococcus aureus Exhibiting Vancomycin-Intermediate-S. aureus -Type Resistance to Vancomycin. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 3, p. 1120–1133, 2006.

MCCALLUM, N. et al. Strain dependence of the cell wall-damage induced stimulon in Staphylococcus aureus. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1760, p. 1475–1481, 2006.

MCCALLUM, N.; BERGER-BÄCHI, B.; SENN, M. M. Regulation of antibiotic resistance in Staphylococcus aureus. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 300, p. 118–129, 2010.

MEEHL, M. et al. Interaction of the GraRS Two-Component System with the VraFG ABC Transporter To Support Vancomycin-Intermediate Resistance in Staphylococcus aureus. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 8, p. 2679–2689, 2007.

MELO, G. B. et al. ANALYSIS OF THE GENETIC DIVERSITY OF

VANCOMYCIN-RESISTANT STAPHYLOCOCCUS AUREUS.

Brazilian Journal of Microbiology, v. 36, p. 126–130, 2005.

MUZAMAL, U. et al. Diversity of two-component systems: insights into the signal transduction mechanism by the *Staphylococcus aureus* two-component system GraSR. **F1000 Research**, v. 3, n. 252, 2014.

MWANGI, M. M. et al. Tracking the in vivo evolution of multidrug resistance in *Staphylococcus aureus* by whole-genome sequencing. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 22, p. 9451–9456, 2007.

NEOH, H. et al. Mutated Response Regulator graR Is Responsible for Phenotypic Conversion of *Staphylococcus aureus* from Heterogeneous Vancomycin-Intermediate Resistance to Vancomycin-Intermediate Resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 1, p. 45–53, 2008.

OLIVEIRA, G. A. et al. Isolation in Brazil of Nosocomial *Staphylococcus aureus* with Reduced Susceptibility to Vancomycin. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 22, n. 7, p. 443–448, 2001.

OWENS, B. The single life. **Nature**, v. 491, p. 27–29, 2012.

PAIVA, R. M. et al. Vancomycin MIC for Methicillin-Resistant Coagulase-Negative *Staphylococcus* Isolates: Evaluation of the Broth Microdilution and Etest Methods. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 12, p. 4652–4654, 2010.

PARK, K. et al. Comparison of the clinical features, bacterial genotypes and outcomes of patients with bacteraemia due to heteroresistant vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* and vancomycin-susceptible *S. aureus*. n. April, p. 1843–1849, 2012.

PEREIRA, P. M. et al. Fluorescence Ratio Imaging Microscopy Shows Decreased Access of Vancomycin to Cell Wall Synthetic Sites in Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 10, p. 3627–3633, 2007.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification

in real-time RT – PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 9, p. 16–21, 2001.

PFAFFL, M. W. Quantification strategies in real-time PCR. In: BUSTIN, S. A. (Ed.). **A-Z of quantitative PCR**. La Jolla: International University Line, 2004. p. 87–112.

PIÉRARD, D. et al. Recherche de *Staphylococcus aureus* à sensibilité diminuée à la vancomycine dans un hôpital Belge. **Pathologie Biologie**, v. 52, n. 8, p. 486–488, 2004.

POOTOOLAL, J.; NEU, J.; WRIGHT, G. D. Glycopeptide Antibiotic Resistance. **Annual Reviews of Pharmacology and Toxicology**, v. 42, p. 381–408, 2002.

PRAKASH, V.; LEWIS II, 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, n. 12, p. 4528, 2008.

QURESHI, N. K.; YIN, S.; BOYLE-VAVRA, S. The Role of the *Staphylococcal* *Vra*TSR Regulatory System on Vancomycin Resistance and *vanA* Operon Expression in Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, p. e85873, 2014.

RAMAKERS, C. et al. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**, v. 339, p. 62–66, 2003.

RENZONI, A. et al. Exploring innate glycopeptide resistance mechanisms in *Staphylococcus aureus*. **Trends in Microbiology**, v. 18, n. 2, p. 55–56, 2011.

REVERDY, M. E. et al. Incidence of *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to glycopeptides in two French hospitals. 2001.

REYNOLDS, P. E. Structure, Biochemistry and Mechanism of Action of Glycopeptide Antibiotics. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 8, n. 11, p. 943–950, 1989a.

ROCH, M. et al. Exposure of *Staphylococcus aureus* to sub-inhibitory

concentrations of beta-lactam antibiotics induces h-VISA. n. June, 2014.

ROGERS, H. J.; PERKINS, H. R.; WARD, J. B. **Microbial Cell Walls and Membranes**. London-New York: Chapman and Hall, 1980.

ROSSI, F.; ANDREAZZI, D. B. **Resistência Bacteriana - Interpretando o Antibiograma**. São Paulo: Atheneu, 2006.

RUIJTER, J. M. et al. Amplification efficiency : linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 6, p. e45, 2009.

SADER, H. S.; RHOMBERG, P. R.; JONES, R. N. Nine-Hospital Study Comparing Broth Microdilution and Etest Method Results for Vancomycin and Daptomycin against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 7, p. 3162–3165, 2009.

SAITO, M. et al. “Slow VISA”, a Novel Phenotype of Vancomycin Resistance , Found In Vitro in Heterogeneous Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 9, p. 5024–5035, 2014.

SAKOULAS, G. et al. Relationship of MIC and Bactericidal Activity to Efficacy of Vancomycin for Treatment of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Bacteremia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 6, p. 2398–2402, 2004.

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

SASS, P.; BIERBAUM, G. Native graS mutation supports the susceptibility of *Staphylococcus aureus* strain SG511 to antimicrobial peptides. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 299, p. 313–322, 2009.

SATOLA, S. W. et al. Comparison of Detection Methods for Heteroresistant Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus*, with the Population Analysis Profile Method as the Reference Method. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 177–183, 2011.

SHANG, W. et al. Comparative Fitness and Determinants for the Characteristic Drug Resistance of ST239-MRSAIII-t030 and ST239-MRSA-III-t037 Strains Isolated in China. **Microbial Drug Resistance**, v. 0, n. 0, p. 1–8, 2015.

SHOJI, M. et al. walK and clpP Mutations Confer Reduced Vancomycin Susceptibility in Staphylococcus aureus □. v. 55, n. 8, p. 3870–3881, 2011.

SIERADZKI, K.; PINHO, M. G.; TOMASZ, A. Inactivated pbp 4 in Highly Glycopeptide-resistant Laboratory Mutants of Staphylococcus aureus. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 27, p. 18942–18946, 1999.

SIERADZKI, K.; TOMASZ, A. Inhibition of Cell Wall Turnover and Autolysis by Vancomycin in a Highly Vancomycin-Resistant Mutant of Staphylococcus aureus. **Journal of Bacteriology**, v. 179, n. 8, p. 2557–2566, 1997.

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. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 24, p. 7103–7110, 2003.

SIEVERT, D. M. et al. Vancomycin-Resistant Staphylococcus aureus in the United States, 2002–2006. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, p. 668–674, 2008.

SILVEIRA, A. C. DE O. **Caracterização fenotípica e genotípica de Staphylococcus aureus com hetero-resistência à vancomicina (hVISA) em isolados de Santa Catarina.** [s.l.] Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, 2014.

SILVEIRA, A. C. O. et al. Is prediffusion test an alternative to improve accuracy in screening hVISA strains and to detect susceptibility to glycopeptides/lipopeptides? **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, 2014.

SILVEIRA, A. C. O. et al. Molecular epidemiology of heteroresistant vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus in Brazil. **Brazilian**

Journal of Infectious Diseases, v. 19, n. 5, p. 466–472, 2015.

SILVER, N. et al. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. **BMC Molecular Biology**, v. 7, n. 1, p. 33, 2006.

SINGH, A. et al. Increasing Trend of Heterogeneous Vancomycin Intermediate Staphylococcus aureus in a Tertiary Care Center of Northern India. **Microbial Drug Resistance**, v. 21, n. 5, p. 545–550, 2015.

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

SRINIVASAN, A.; DICK, J. D.; PERL, T. M. Vancomycin resistance in Staphylococci. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 3, p. 430–438, 2002.

STEINKRAUS, G.; WHITE, R.; FRIEDRICH, L. Vancomycin MIC creep in non-vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus (VISA), vancomycin-susceptible clinical methicillin-resistant S. aureus (MRSA) blood isolates from 2001–05. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, p. 788–794, 2007.

SWENSON, J. M. et al. Accuracy of Commercial and Reference Susceptibility Testing Methods for Detecting Vancomycin-Intermediate Staphylococcus aureus □. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 7, p. 2013–2017, 2009.

TAKATA, T. et al. Presence of both heterogeneous vancomycin-intermediate resistance and β -lactam antibiotic-induced vancomycin resistance phenotypes is associated with the outcome in methicillin-resistant Staphylococcus aureus bloodstream infection. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 45, p. 203–212, 2013.

TAVARES, W. **Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Antiinfeciosos**. 3. ed. São Paulo: [2001].

TENOVER, F. C. et al. Characterization of Staphylococci with Reduced Susceptibilities to Vancomycin and Other Glycopeptides. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 4, p. 1020–1027, 1998.

TENOVER, F. C.; BIDDLE, J. W.; LANCASTER, M. V. Increasing Resistance to Vancomycin and Other Glycopeptides in *Staphylococcus aureus*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 2, p. 327–332, 2001.

TENOVER, F. C.; MOELLERING, R. C. The Rationale for Revising the Clinical and Laboratory Standards Institute Vancomycin Minimal Inhibitory Concentration Interpretive Criteria for *Staphylococcus aureus*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 44, p. 1208–1215, 2007.

TREANGEN, T. J. et al. Complete Genome Sequence of the Quality Control Strain *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 25923. **Genome Announcements**, v. 2, n. 6, p. e01110–14, 2014.

VALIHRACH, L.; DEMNEROVA, K. Impact of normalization method on experimental outcome using RT-qPCR in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 90, n. 3, p. 214–216, 2012.

VAN HAL, S. J. et al. Performance of Various Testing Methodologies for Detection of Heteroresistant Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus* in Bloodstream Isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 4, p. 1489–1494, 2011.

VAN HAL, S. J.; PATERSON, D. L. Systematic Review and Meta-Analysis of the Significance of Heterogeneous Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus* Isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 1, p. 405–410, 2011.

VAN RENSBURG, M. J. J.; WHITELAW, A. C.; ELISHA, B. G. Genetic basis of rifampicin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* suggests clonal expansion in hospitals in Cape Town, South Africa. **BMC Microbiology**, v. 12, n. 46, 2012.

VANDESOMPELE, J.; KUBISTA, M.; PFAFFL, M. W. Reference Gene Validation Software for Improved Normalization. n. November 2015, 2009.

VEGA, F. et al. Aislamiento de *Staphylococcus aureus* hetero-resistente

a vancomicina en Hospital Clínico Regional de Concepción, Chile. **Revista Chilena de Infectología**, v. 32, n. 5, p. 588–590, 2015.

VILLAR, M. et al. Epidemiological and molecular aspects of rifampicin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from wounds, blood and respiratory samples. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, p. 997–1000, 2011.

VOSS, A. et al. A multi-center blinded study on the efficiency of phenotypic screening methods to detect glycopeptide intermediately susceptible *Staphylococcus aureus* (GISA) and heterogeneous GISA (h-GISA). **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 6, n. 9, 2007.

WALSH, T. R. et al. Evaluation of Current Methods for Detection of *Staphylococci* with Reduced Susceptibility to Glycopeptides. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 7, p. 2439–2444, 2001.

WATANABE, Y. et al. Impact of *rpoB* Mutations on Reduced Vancomycin Susceptibility in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 7, p. 2680–2684, 2011.

WEIGEL, L. M. Genetic Analysis of a High-Level Vancomycin-Resistant Isolate of *Staphylococcus aureus*. **Science**, v. 302, n. 5650, p. 1569–1571, 2003.

WINN JR, W. et al. **Koneman Diagnóstico Microbiológico - Texto e Atlas Colorido**. 6ª edição ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

WONG, S. S. Y. et al. Bacteremia Caused by *Staphylococci* with Inducible Vancomycin Heteroresistance. **Clinical Infectious Diseases**, v. 29, p. 760–767, 1999.

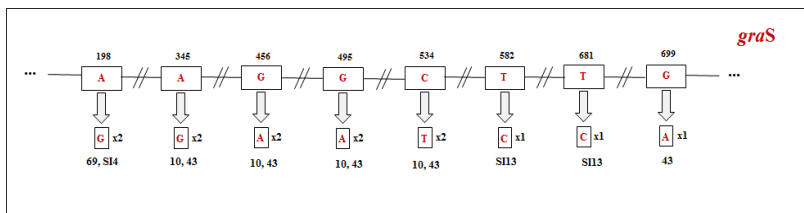
WONGTHONG, S. et al. Performance of vancomycin and teicoplanin disk diffusion test in isogenic vancomycin non-susceptible *Staphylococcus aureus*. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 9, n. 2, p. 157–164, 2015.

WOOTTON, M. et al. A modified population analysis profile (PAP) method to detect hetero-resistance to vancomycin in *Staphylococcus aureus* in a UK hospital. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 47, p. 399–403, 2001.

- WOOTTON, M. et al. A Multicenter Study Evaluating the Current Strategies for Isolating *Staphylococcus aureus* Strains with Reduced Susceptibility to Glycopeptides □. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 329–332, 2007.
- YOO, J. IL et al. Prevalence of Amino Acid Changes in the *yvqF*, *vraSR*, *graSR*, and *tcaRAB* Genes from Vancomycin Intermediate Resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 160–165, 2013.
- YUSOF, A. et al. Evaluation of a New Etest Vancomycin-Teicoplanin Strip for Detection of Glycopeptide-Intermediate *Staphylococcus aureus* (GISA), in Particular, Heterogeneous GISA. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 9, p. 3042–3047, 2008.
- ZHANG, S. et al. Systematic Review and Meta-Analysis of the Epidemiology of Vancomycin-Intermediate and Heterogeneous Vancomycin- Intermediate *Staphylococcus aureus* Isolates. **PLoS ONE**, v. 10, n. 8, p. e0136082, 2015.

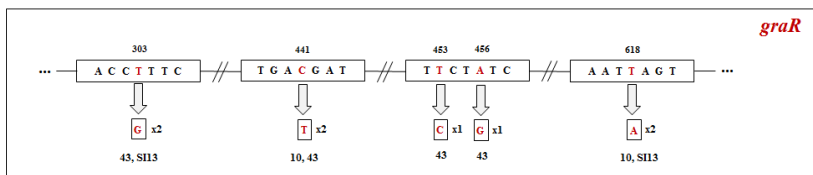
APÊNDICE A

Mutações silenciosas no gene *graS*.

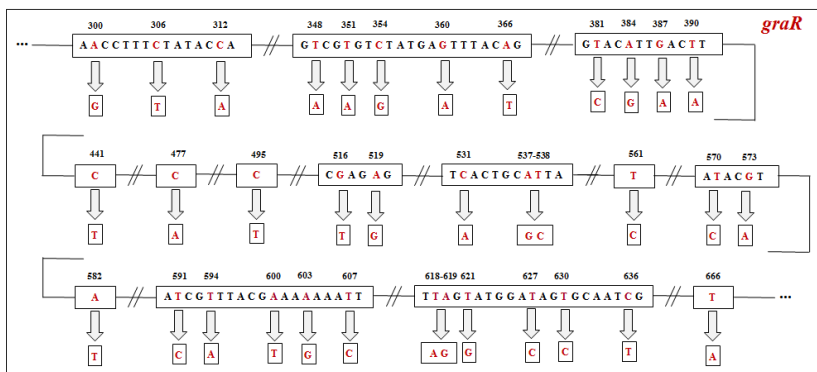


Legenda: Cada quadrado representa um nucleotídeo. A seta representa a substituição. Números acima dos quadrados representam a posição do nucleotídeo no gene. Números à direita dos quadrados representam a quantidade de isolados mutados. Números abaixo dos quadrados representam a identificação das amostras mutadas. Fonte: desenvolvido pela autora.

Mutações silenciosas no gene *graR*.

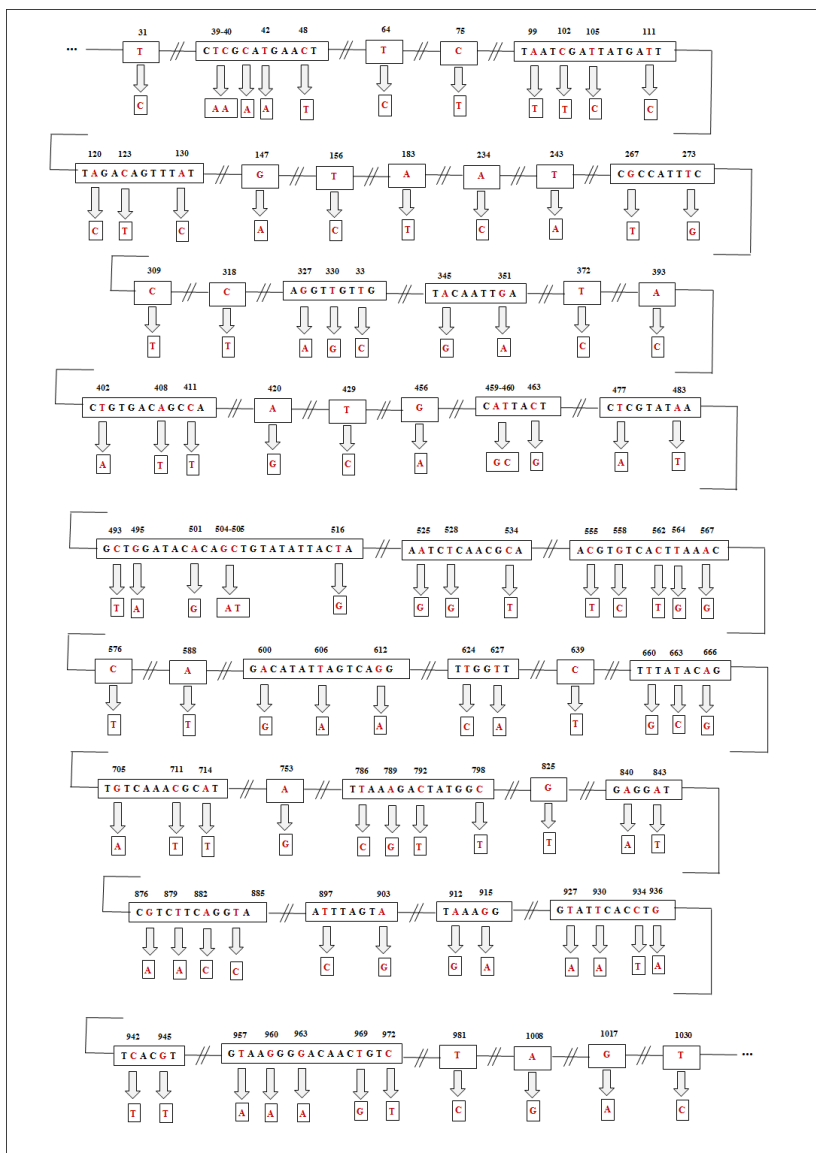


Legenda: Cada retângulo representa uma sequência de nucleotídeos. Cada quadrado representa um nucleotídeo. Letras em vermelho representam os nucleotídeos mutados. A seta representa a substituição. Números acima dos retângulos representam a posição do nucleotídeo substituído no gene. Números à direita dos quadrados representam a quantidade de isolados mutados. Números abaixo dos quadrados representam a identificação das amostras mutadas. Fonte: desenvolvido pela autora.

Mutações silenciosas da amostra 10, no gene *graR*

Legenda: Cada retângulo representa uma sequência de nucleotídeos. Cada quadrado representa um nucleotídeo. Letras em vermelho representam os nucleotídeos mutados. A seta representa a substituição. Números acima dos retângulos representam a posição do nucleotídeo substituído no gene. Números à direita dos quadrados representam a quantidade de isolados mutados. Números abaixo dos quadrados representam a identificação das amostras mutadas. Fonte: desenvolvido pela autora.

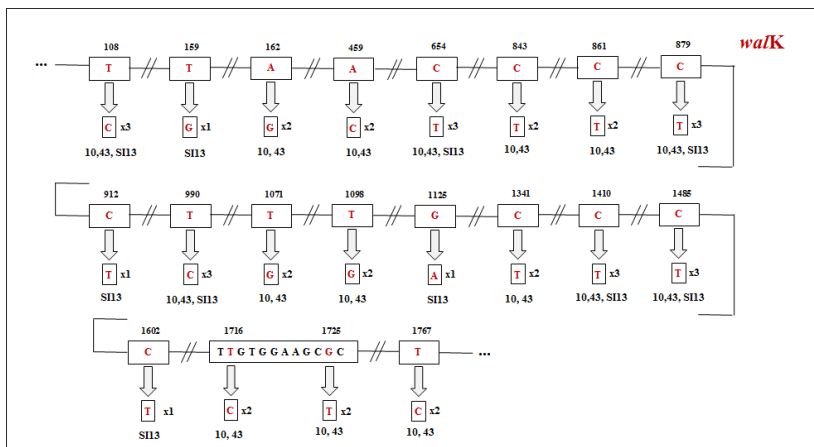
Mutações silenciosas da amostra 10, no gene *gras*.



Legenda: Cada retângulo representa uma sequência de nucleotídeos. Cada quadrado representa um nucleotídeo. Letras em vermelho representam os

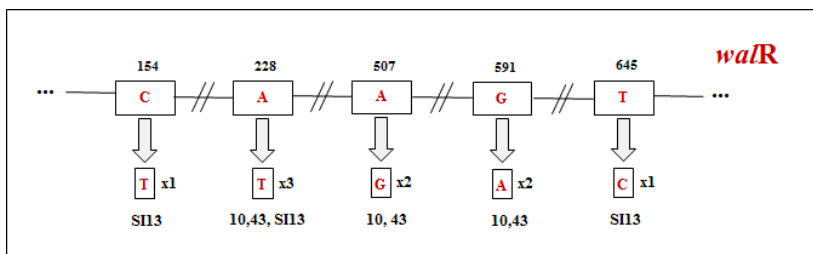
nucleotídeos mutados. A seta representa a substituição. Números acima dos retângulos representam a posição do nucleotídeo substituído no gene. Números à direita dos quadrados representam a quantidade de isolados mutados. Números abaixo dos quadrados representam a identificação das amostras mutadas. Fonte: desenvolvido pela autora.

Mutações silenciosas no gene *walK*.



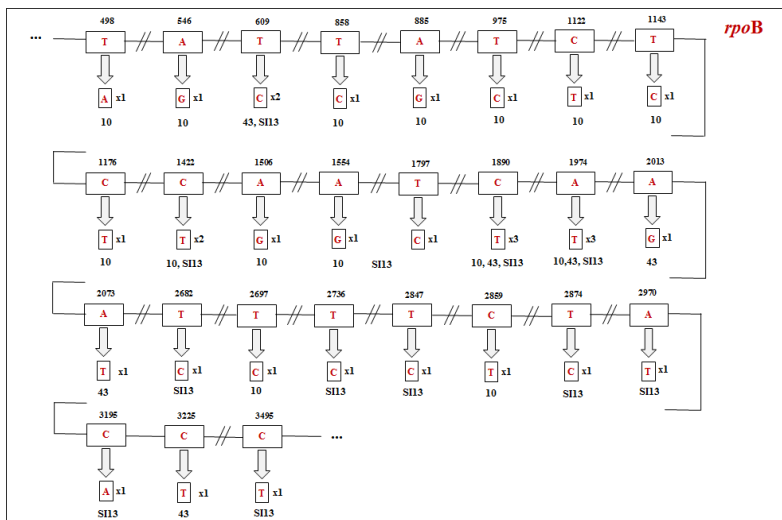
Legenda: Cada retângulo representa uma sequência de nucleotídeos. Cada quadrado representa um nucleotídeo. Letras em vermelho representam os nucleotídeos mutados. A seta representa a substituição. Números acima dos retângulos representam a posição do nucleotídeo substituído no gene. Números à direita dos quadrados representam a quantidade de isolados mutados. Números abaixo dos quadrados representam a identificação das amostras mutadas. Fonte: desenvolvido pela autora.

Mutações silenciosas em *walR*.



Legenda: Cada quadrado representa um nucleotídeo. A seta representa a substituição. Números acima dos quadrados representam a posição do nucleotídeo no gene. Números à direita dos quadrados representam a quantidade de isolados mutados. Números abaixo dos quadrados representam a identificação das amostras mutadas. Fonte: desenvolvido pela autora.

Mutações silenciosas no gene *rpoB*



Legenda: Cada quadrado representa um nucleotídeo. A seta representa a substituição. Números acima dos quadrados representam a posição do nucleotídeo no gene. Números à direita dos quadrados representam a quantidade de isolados mutados. Números abaixo dos quadrados representam a identificação das amostras mutadas. Fonte: desenvolvido pela autora.