

Diana Alejandra Estigarribia Cabrera

ANÁLISE DE BIOMARCADORES PROTEICOS PARA ESTUDOS DE IDENTIFICAÇÃO, RESISTÊNCIA E VARIABILIDADE EM *Staphylococcus* spp. RESISTENTES À METICILINA (MRS) E *Enterococcus* RESISTENTES À VANCOMICINA (VRE).

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito final para a obtenção do Grau de mestre em Biotecnologia e Biociências

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Thaís Cristine Marques Sincero

Florianópolis
2017

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

Cabrera, Diana Alejandra
Análise de biomarcadores proteicos para estudos
de identificação, resistência e variabilidade em
Staphylococcus spp. resistentes à meticilina (MRS) e
Enterococcus resistentes à vancomicina (VRE). /
Diana Alejandra Cabrera ; orientadora, Thais
Cristine Marques Sincero - SC, 2017.
119 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde,
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e
Biociências, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

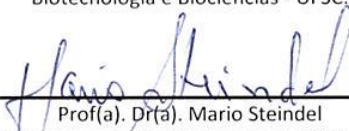
1. Biotecnologia e Biociências. 2. MALDI-TOF/MS
. 3. MRS. 4. VRE. 5. IRAS. I. Marques Sincero ,
Thais Cristine . II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
e Biociências. III. Título.

“Análise de biomarcadores proteicos para estudos de identificação, resistência e variabilidade em Staphylococcus spp. Resistentes à meticilina (MRS) e Enterococcus resistentes à vancomicina (VRE)”

Por

Diana Alejandra Estigarribia Cabrera

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (07/PPGBTC/2017) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências - UFSC.



Prof(a). Dr(a). Mario Steindel

Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências

Banca examinadora:



Dr(a) Thais Cristine Marques Sincero (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador(a)



Dr(a) Alessandro Conrado de Oliveira Silveira (Universidade Regional de Blumenau)



Dr(a) Karin Silva Caumo (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Fabienne Antunes Ferreira (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 20 de março de 2017.

AGRADECIMENTOS

À Jesus, meu amigo, por meio Dele posso ter pleno acesso ao Pai e sentir o amor de Deus me sustentando a cada dia.

À querida Prof^ª. Dr^ª. Thaís Sincero pela oportunidade, por ter me aceitado como aluna do seu grupo de pesquisa sem me conhecer, pela orientação, por tantos conhecimentos compartilhados, pela confiança, pela paciência, por ter me apoiado e ensinado a aprender dos erros de uma forma tão motivadora, por ser uma mulher compreensiva, inteligente e da paz, por sempre me dar um olhar de esperança e palavras de luta. Obrigada pela amizade e por ser um exemplo de profissionalismo para todos nós.

Ao Prof. Dr. Estaban Ferro Bertolotto e à Prof^ª. Dr^ª Juana Ortellado de Canese pela carta de recomendação, foi uma honra ter recebido de dois grandes professores.

À Prof^ª. Dr^ª Juana Ortellado de Canese que desde a graduação me motivou a crescer na área acadêmica e procurar bolsas acadêmicas para aprender mais da Microbiologia, foi por meio dela que me animei a sair do país.

Ao Prof. Dr. Alessandro Silveira e à Clarice Iomara por ter cedido as cepas-controle de MRSA e as cepas-controle de hVISA utilizadas no nosso trabalho.

À Aline Sereia e à Patricia Cunha, pela oportunidade de trabalhar juntas no projeto HAIMP, pelos conhecimentos compartilhados, pela paciência, pela confiança e pela ajuda nas análises moleculares.

Ao Prof. Dr. Glauber Wagner pela disposição desde o primeiro momento que solicitamos sua colaboração, pela ajuda contínua com os programas de bioinformática, por compartilhar tantos conhecimentos de proteômica, pela paciência, por ser um profissional tão dedicado e que ama o que faz, isso é inspirador, pela calma em momentos de desespero e pela confiança.

Ao Prof. Dr. Hercules Moura, pela disponibilidade no CDC-EUA.

Ao Prof. Dr. Hugo López, da Universidade de Vigo-Espanha, por me ajudar com o *software* Mass-Up, pela disponibilidade e pela paciência.

Ao Prof. Dr. Hernán Terenzi pela paciência e parceria para que fosse viável a realização das análises no CEBIME.

À Martina Blank pela disposição, pela paciência e ajuda contínua com o MALDI-TOF/MS e os *softwares*, pelas risadas, por responder aos e-mails e WhatsApp de perguntas e por dar sempre o seu melhor.

À empresa Neopropecta pelo auxílio na realização das análises moleculares, pelos equipamentos e reagentes.

Aos membros da banca examinadora por terem aceitado o convite duas vezes.

Às meninas do laboratório MIMA, Ariella, Dani, Cae, Paulinha e a querida Suellen que me ajudaram bastante a me adaptar e aprender o esquema do laboratório. Obrigada meninas pela parceria e pelos ensinamentos!

A todos os meus amigos do Paraguai e do Brasil, ao PG da Trindade, as meninas de "Es difícil ser modelo", pelas mensagens de apoio, pelas risadas, pelos passeios e pela torcida de sempre.

À Angela, pela amizade, por ser essa pessoa que me ajudou a superar as dificuldades do início de mestrado e do final de mestrado, pela boa predisposição para me ensinar e compartilhar os conhecimentos. Grata para sempre!

À Néia, à loira, minha amiga e rommie, pelo apoio contínuo, sem as suas orações e parceria do dia a dia nada teria sido tão alegre e as forças não teriam sido renovadas. Você foi essencial!

À TODA minha família que amo tanto, por serem do jeitinho que eles são, animados, solidários e prestativos. A minha querida mãe pelo apoio diário com mensagens, pelo amor e altruísmo que só ela sente por mim. Ao meu pai pela confiança, por viajar tantas vezes ao Brasil para me ajudar. Ao meu cunhado Miguel e minhas irmãs Yelcy e Noelia, por me salvar tantas vezes. Amo vocês!

À UFSC e ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências pela oportunidade.

À OEA pela bolsa de mestrado.

RESUMO

Nas últimas décadas, a disseminação de bactérias patogênicas e resistentes, tornou-se uma preocupação a nível mundial. As metodologias fenotípicas e moleculares tradicionais são laboriosas, requerem muito treinamento técnico e possuem altos custos. O sistema MALDI-TOF/MS, metodologia emergente da espectrometria de massas aplicada à microbiologia, é utilizado na rotina como método de identificação por inoculação direta de bactérias e mostrou-se promissor na determinação precoce da relação epidemiológica de isolados. Os *Staphylococcus* spp. resistentes à meticilina (MRS) e *Enterococcus* resistentes à vancomicina (VRE) são importantes patógenos oportunistas que causam Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS). Assim sendo, o nosso trabalho tem como objetivo analisar biomarcadores proteicos para estudos de identificação, resistência e variabilidade de isolados de MRS e VRE. Os isolados são provenientes do Hospital Universitário (HU/UFSC, Florianópolis/SC, Brasil), coletados entre abril de 2015 e março de 2016 de pacientes, profissionais da saúde, e ambiente hospitalar de cinco alas do hospital: Emergência (EMG), Unidade de Terapia Intensiva (UTI), Centro Cirúrgico (CCR), Clínica Médica I (CMI) e Clínica Cirúrgica I (CRI). Das 1.759 amostras coletadas, foram isolados 17 VRE e 72 MRS. Desses, catorze foram identificados como *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) e quinze como *E. faecium* resistentes à vancomicina. Nossos resultados apontam que o protocolo de MALDI-TOF validado neste trabalho para análises microbiológicas mostrou poder discriminatório para identificação dos isolados a nível de gênero, tanto para VRE quanto para MRS, analisando-se proteínas na faixa de 2.000 a 20.000 Da. Para *Staphylococcus* spp., os biomarcadores proteicos identificados permitiram uma análise robusta para identificação das espécies, mas não mostraram poder discriminatório suficiente para análises de marcadores de resistência à oxacilina e vancomicina ou de variabilidade e clonalidade. Para a identificação dos *Staphylococcus* coagulase negativa (SCoN) foram encontrados

quatro picos exclusivos para *S. sciuri* resistentes à oxacilina (MRSCi), quatro para *S. haemolyticus* resistentes à oxacilina (MRSH) e dezessete para *S. warneri* resistentes à oxacilina (MRSW). Na tentativa de diferenciar MRSA dos MSSA, foram obtidos nove picos com especificidade e sensibilidade consideráveis, mas somente dois, m/z 2302 \pm 2 Da e 3073 \pm 2 Da possuem valores relevantes da área sob a curva (AUC) para futuras pesquisas. No caso do VRE, o pico m/z 4430 \pm 3 Da foi comum para todas as amostras, entretanto não foi possível identificar picos comuns para identificação das espécies nem para estudos de prospecção de resistência bacteriana. Finalmente, apesar de bem estabelecido para identificação bacteriana, nossos dados sugerem cautela na interpretação dos resultados de MALDI-TOF/MS para estudos de resistência e variabilidade até que modelos computacionais estejam bem validados.

Palavras-chave: MALDI-TOF/MS; *Staphylococcus* spp. resistentes à metilina (MRS); *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina (MRSA); *Enterococcus* resistentes à vancomicina (VRE); Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS).

ABSTRACT

Within the last decade, the characterization of pathogenic and resistant bacteria has become a worldwide concern. The conventional microbiology and molecular biology methods are time-consuming, require technical skills training and are costly. Matrix-assisted laser-desorption-ionization-time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS), an emerging methodology of mass spectrometry applied to microbiology, is a method routinely used for bacterial identification using a whole cell of bacteria and has shown promise in the prompt determination of epidemiological relatedness of clinical isolates. Methicillin-resistant *Staphylococcus* spp. (MRS) and vancomycin-resistant Enterococci (VRE) are important opportunistic pathogens that cause Healthcare-associated Infections (HAI). The aim of this study was to analyze protein biomarkers for bacterial identification, resistance and variability of MRS and VRE isolates compared to standard strains and control strains. The isolates were collected from the University Hospital (HU/UFSC, Florianópolis/SC, Brazil), between April 2015 and March 2016 from patients, health workers and the hospital environment of five hospital units: Emergency Department (ED), Intensive Care Unit (ICU), Surgical Center (SC), Medical Clinical Unit (MCU) and Surgical Clinical Unit (SCU). From the 1,759 samples that were obtained, 17 VRE and 72 MRS were isolated. Among them, fourteen were identified as methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and seventeen as vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. Here we show that the MALDI-TOF protocol validated in the study conditions for microbiological analysis showed discriminatory power for the identification of the isolates at the genus level, for both VRE and MRS, analyzing proteins in the range of 2,000 to 20,000 Da. The identified protein biomarkers to *Staphylococcus* spp. allowed a robust analysis for species identification. However, they did not show sufficient discriminatory power for analyzes of oxacillin and vancomycin resistance markers or of variability and clonality. For the identification of coagulase-negative staphylococci (CoNS), four

unique peaks were found for methicillin-resistant *S. sciuri* (MRSCi), four for methicillin-resistant *S. haemolyticus* (MRSH) and seventeen for methicillin-resistant *S. warneri* (MRSW). In an attempt to differentiate MRSA from MSSA, nine peaks with considerable specificity and sensitivity were obtained, but only two, m/z 2302 \pm 2 and 3073 \pm 2 have relevant area under the curve (AUC) values for future research. In the case of VRE, the peak m/z 4430 \pm 3 was common for all samples; however it was not possible to identify common peaks for identification of the species or for prospective studies of bacterial resistance. Finally, although well established for bacterial identification, our data suggest caution in the interpretation of MALDI-TOF/MS results for studies of resistance and variability until computational models are well validated.

Keywords: MALDI-TOF MS; Methicillin-resistant *Staphylococcus* spp. (MRS); Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA); Vancomycin-resistant Enterococci (VRE); Healthcare-associated Infections (HAI).

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: TRANSMISSÃO DE <i>STAPHYLOCOCCUS</i> SPP. RESISTENTES AOS ANTIBIÓTICOS.	38
FIGURA 2: DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS COLETADAS ENTRE ABRIL DE 2015 E MARÇO DE 2016 POR ALAS DO HU/UFSC. N=1.745	44
FIGURA 3: FLUXOGRAMA DE ATIVIDADES DESENVOLVIDAS NO ESTUDO.	45
FIGURA 4: ESQUEMA DA TÉCNICA DE MALDI-TOF/MS PARA ANÁLISE MICROBIANA UTILIZANDO O MÉTODO DIRETO.	50
FIGURA 5: REPRESENTAÇÃO DO PROCESSO DE SOBREPOSIÇÃO DE ESPECTROS NO PROGRAMA MASS-UP.	52
FIGURA 6: DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DOS ISOLADOS DE MRS E VRE IDENTIFICADOS.	56
FIGURA 7: DENDOGRAMA RESULTANTE DA ANÁLISE DE AGRUPAMENTO HIERÁRQUICO ENTRE AS CEPAS-PADRÃO DE DIFERENTES ESPÉCIES POR MALDI-TOF.	64
FIGURA 8: ANÁLISE DE COMPONENTE PRINCIPAL (PCA) DAS CEPAS-PADRÃO E CEPAS-CONTROLE DE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> RESISTENTES À METICILINA	67
FIGURA 9: DENDOGRAMA DE 33 ISOLADOS MRS IDENTIFICADOS PELO SEQUENCIAMENTO 16S rRNA.	69
FIGURA 10: DENDOGRAMA DOS ISOLADOS DE MRS COM ESPÉCIE DESCONHECIDA.	72
FIGURA 11: ESPECTRO REPRESENTATIVO DO PICO M/Z 6888±3 EM MSSA, MRSA E hVISA.	73
FIGURA 12: DENDOGRAMA RESULTANTE DA ANÁLISE DE AGRUPAMENTO HIERÁRQUICO ENTRE AS CEPAS-CONTROLE DE MRSA E hVISA POR MALDI-TOF.	75
FIGURA 13: DENDOGRAMA DA ANÁLISE DE AGRUPAMENTO DOS ESPECTROS DAS CEPAS E ISOLADOS DE <i>S. AUREUS</i> E REPRESENTAÇÃO EM GEL VIRTUAL DAS AMOSTRAS MRSA.	80
FIGURA 14: DENDOGRAMA DE CEPAS-CONTROLE DE MRSA E ISOLADOS MRSA COM O PROGRAMA CLINPROTOOLS.	83
FIGURA 15: CURVAS COR DOS NOVE PICOS CANDIDATOS A BIOMARCADORES DE RESISTÊNCIA.	86

FIGURA 16: ESPECTROS DE MASSAS E DENDOGRAMA OBTIDOS PARA O GÊNERO *ENTEROCOCCUS* SPP. 88

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: CEPAS-PADRÃO E CEPAS-CONTROLE UTILIZADAS NO ESTUDO.....	42
TABELA 2: INTERPRETAÇÃO DO TESTE DE SENSIBILIDADE À CEFOXITINA SEGUNDO O <i>CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE</i> (2016).....	46
TABELA 3: ISOLADOS HOSPITALARES DE MRS IDENTIFICADOS (N=72).....	58
TABELA 4: ISOLADOS HOSPITALARES DE VRE OBTIDOS NESTE ESTUDO (N=17).....	62
TABELA 5: IDENTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES PROTEICOS DESCRITOS POR SAUGET ET AL. (2017) NAS CEPAS-CONTROLE DE MRSA E NOS ISOLADOS HOSPITALARES MRSA 1-9.....	78

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1: ANÁLISES ESTATÍSTICAS DO PROGRAMA CLINPROTOOLS DOS 20 PICOS DE INTERESSE DAS CEPAS-PADRÃO.	66
QUADRO 2: PICOS COMUNS AOS AGRUPAMENTOS POR ESPÉCIE DE <i>SCON</i> E DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL E TEMPORAL DOS ISOLADOS.	70
QUADRO 3: BIOMARCADORES PROTEICOS ENCONTRADOS NOS PRINCIPAIS COMPLEXOS CLONAIIS DE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> . ..	77
QUADRO 4: ANÁLISES ESTATÍSTICAS DO PROGRAMA CLINPROTOOLS DOS NOVE PICOS DE INTERESSE PARA DIFERENCIAR ISOLADOS DE <i>S. AUREUS</i> SENSÍVEIS E RESISTENTES À METICILINA.	84
QUADRO 5: PESQUISA DOS POTENCIAIS BIOMARCADORES DE RESISTÊNCIA NOS ISOLADOS.	85

LISTA DE LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AUC – do inglês *area under the ROC curve*.
- Ave - área/intensidade do pico para a classe.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
- ATCC – do inglês *American Type Culture Collection*.
- BHI - do inglês *Brain Heart Infusion*.
- CC - complexo clonal, do inglês *clonal complex*.
- CCR - Centro Cirúrgico.
- CCIH - Comissão de Controle de Infecção Hospitalar.
- ccr - do inglês *Cassete Chromosome Recombinases*.
- CDC – do inglês *Centers of Disease Control and Prevention*.
- CEB - do inglês *Hungarian/Brazilian Endemic Clone*.
- CHCA - ácido α -ciano-4-hidroxi-cinâmico.
- CIM - concentração inibitória mínima.
- CLSI - do inglês *Clinical and Laboratory Standards*. Institute
- CEBIME - Laboratório Central de Biologia Molecular Estrutural.
- CMI - Clínica médica I.
- COR - Característica de Operação do Receptor.
- Cq - Ciclo de quantificação.
- CRI - Clínica cirúrgica I.
- CV - coeficiente de variação.
- DNA - ácido desoxirribonucleico.
- DNase - teste da desoxirribonuclease.
- ECDC - Centro Europeu de Prevenção e Controle de Doenças.
- EMG – Emergência.
- EMRSA-15 – do inglês *Epidemic MRSA-15*.
- EMRSA-16 – do inglês *Epidemic MRSA-16*.
- HAIMP- do inglês *Healthcare Associated Infections Microbiome Project*.
- HU/UFSC - Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago da Universidade Federal de Santa Catarina.
- hVISA - *S. aureus* com heterorresistência intermediária à vancomicina.
- IRAS - Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde.
- MALDI-TOF/MS-do inglês *Matrix Associated Laser Desorption - Ionization - Time of Flight*.

MDR - multidroga-resistência.

MIMA - Laboratório de Microbiologia Molecular Aplicada.

MLVA – do inglês *Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis*.

MLST - tipagem de sequências multilocus, do inglês *Multilocus sequence typing*.

MRS - *Staphylococcus* spp. resistentes à meticilina, do inglês *Methicillin-resistant Staphylococcus spp.*

MRSA/ORSA - *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina/oxacilina.

MRSC - *Staphylococcus capitis* resistentes à meticilina.

MRSCi - *Staphylococcus sciuri* resistentes à meticilina.

MRSE - *Staphylococcus epidermidis* resistentes à meticilina.

MRSH - *Staphylococcus haemolyticus* resistentes à meticilina.

MRSS - *Staphylococcus saprophyticus* resistentes à meticilina.

MSSA - *S. aureus* sensível à meticilina.

MSSCi - *Staphylococcus sciuri* sensível à meticilina.

Mu 3 - *Staphylococcus aureus* ATCC 700.698.

Mu 50 - *Staphylococcus aureus* ATCC 700.699.

NCBI – do inglês *National Center for Biotechnology Information*.

NYJ – do inglês *New York/Japan*.

OMS - Organização Mundial da Saúde.

OS-MRSA- *Staphylococcus aureus* sensível à oxacilina que possuem o gene *mecA*, do inglês *oxacillin-susceptible mecA-positive S.aureus*.

OXA - oxacilina.

PAD - valor de p do teste de Anderson-Darling.

PC – do inglês *Pediatric Clone*.

PBP - proteína ligadora de penicilina, do inglês *Penicillin binding protein*.

PCA - análise de componentes principais.

PCR – do inglês *Polymerase Chain Reaction*.

PFGE - do inglês *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*.

PTTA - valor de p do teste ANOVA.

PWKW - valor p de Wilcoxon/Kruskal/Wallis.

qPCR - PCR em tempo real, PCR quantitativa.

R – refere-se às replicatas.

rep-PCR - do inglês *Repetitive element sequence-based Polymerase Chain Reaction*.

RFLP - do inglês *Restriction Fragment Length Polymorphism*.

rRNA - do inglês *Ribosomal ribonucleic acid*.

SCC*mec* - do inglês *Staphylococcal Cassette Chromosome mec*.

SCoN - *Staphylococcus* coagulase negativa.

SD -- do inglês *standard deviation*.

spa - do inglês *Staphylococcal protein A*.

ST - tipo de sequência, do inglês *sequence type*.

SVM – modelo matemático, do inglês *Support Vector Machines*.

TSB – meio líquido, do inglês *Trypticase Soy Broth*.

VISA - *S. aureus* com resistência intermediária à vancomicina.

VNTR – do inglês *Multiple-locus variable-number tandem-repeat*.

VRE - Enterococo resistente à vancomicina, do inglês *Vancomycin-resistant Enterococci*.

VRSA - *S.aureus* resistente à vancomicina.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	21
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
2.1	O GÊNERO <i>STAPHYLOCOCCUS</i>	25
2.1.1	CARACTERÍSTICAS GERAIS	25
2.1.2	PRINCIPAIS ASPECTOS DA RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS	27
2.2	O GÊNERO <i>ENTEROCOCCUS</i>	30
2.2.1	CARACTERÍSTICAS GERAIS	30
2.2.2	PRINCIPAIS ASPECTOS DA RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS	31
2.3	INFECÇÕES RELACIONADAS À ASSISTÊNCIA À SAÚDE (IRAS)	32
2.4	TIPAGEM BACTERIANA	35
2.5	EPIDEMIOLOGIA	38
	OBJETIVOS	41
2.6	OBJETIVO GERAL	41
2.7	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
3	METODOLOGIA	42
3.1	CEPAS E ISOLADOS BACTERIANOS	42
3.1.1	CEPAS-PADRÃO E CEPAS-CONTROLE	42
3.1.2	ISOLADOS HOSPITALARES	42
3.2	FLUXOGRAMA DO ESTUDO	45
3.3	TRIAGEM DE <i>STAPHYLOCOCCUS</i> SPP RESISTENTES À METICILINA	45
3.4	TRIAGEM E IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA PRESUNTIVA DE <i>ENTEROCOCCUS</i> RESISTENTE À VANCOMICINA	46
3.5	MÉTODOS GENOTÍPICOS	47
3.5.1	EXTRAÇÃO DE DNA	47
3.5.2	SEQUENCIAMENTO	47
3.5.3	DETECÇÃO DO GENE <i>MECA</i> , <i>VANA</i> E <i>VANB</i>	48
3.6	PADRONIZAÇÃO DA METODOLOGIA DE MALDI-TOF/MS PARA ANÁLISE DAS CEPAS DE MRS E VRE	49
3.6.1	PREPARO DAS AMOSTRAS	49
3.6.2	AQUISIÇÃO DOS ESPECTROS E ANÁLISE DE DADOS	50
3.6.3	ANÁLISE DOS DADOS	52
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55

4.1 IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DAS AMOSTRAS	55
4.1.1 <i>STAPHYLOCOCCUS</i> SPP. RESISTENTES À METICILINA (MRS)	56
4.1.2 <i>ENTEROCOCCUS</i> SPP. RESISTENTES À VANCOMICINA (VRE)	61
4.2 MALDI-TOF/MS.....	63
4.2.1 MALDI-TOF PARA IDENTIFICAÇÃO INTERESPECÍFICA	63
4.2.2 MALDI-TOF PARA IDENTIFICAÇÃO INTRAESPECÍFICA	67
4.2.3 MALDI-TOF PARA ESTUDOS DE VARIABILIDADE.....	74
4.2.4 MALDI-TOF PARA ANÁLISE DE MARCADORES DE RESISTÊNCIA 79	
4.2.5 MALDI-TOF PARA ANÁLISE GLOBAL DAS CEPAS E ISOLADOS DE <i>ENTEROCOCCUS</i> SPP RESISTENTES À VANCOMICINA (VRE)	87
5 CONCLUSÕES	91
6 LIMITAÇÕES DO ESTUDO E PERSPECTIVAS	93
REFERÊNCIAS	95

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

As Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) ou Infecções Hospitalares, são reconhecidas pelas autoridades nacionais e internacionais, como um problema de saúde pública que necessita de programas eficientes de controle (ANVISA, 2013). No Brasil, a prevalência de cocos Gram-positivos multirresistentes aos antimicrobianos está aumentando (PADOVEZE; FORTALEZA, 2014); entretanto, países desenvolvidos como Estados Unidos e países da união europeia, estão mostrando uma redução nas taxas de bacteremias causadas por *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina/oxacilina (MRSA/ORSA) e nas percentagens de isolados invasivos de MRSA entre 2011 e 2014 (ECDC, 2015; WHO, 2016).

Dois dos principais gêneros envolvidos em IRAS, *Staphylococcus* resistentes à meticilina (MRS) e *Enterococcus* resistentes à vancomicina (VRE), são de grande importância epidemiológica. Nos últimos anos, estudos mostraram uma prevalência de MRSA de 6-10% e de VRE de 0,4-2,7% em ambiente hospitalar de países europeus e asiáticos (BALKHAIR et al., 2014; HEUDORF et al., 2014; HOGARDT et al., 2015). Além disso, estudos de vigilância realizados na China têm demonstrado uma alta taxa de resistência à oxacilina (75-85%) em isolados de *Staphylococcus coagulase negativos* (SCoN) (ZHANG et al., 2015). *Enterococcus* spp. resistente à vancomicina foi isolado pela primeira vez no Brasil em 1996, no estado de Paraná. Após isso foram descritos VRE multirresistentes em vários hospitais brasileiros, mas há poucos estudos sobre a prevalência de uma espécie específica e da descrição do tipo de gene de resistência presente por estado. Além disso não há relatos de *Enterococcus faecium* vanA positivos em Santa Catarina (DALLA COSTA et al., 1998; CAMARGO et al., 2004; RIBAS et al., 2007; CONCEIÇÃO et al., 2010; DA SILVA et al., 2012; CORREA et al., 2015; SACRAMENTO, 2015). Neste contexto, o uso de metodologias rápidas e simples para o diagnóstico, estudo e monitoramento

desses patógenos devem ser considerados, já que tem um impacto na sobrevivência do paciente.

A espectrometria de massas por ionização/desorção de laser assistida por matriz com detecção do tempo de voo - MALDI-TOF/MS, do inglês *Matrix Associated Laser Desorption - Ionization - Time of Flight*, metodologia emergente da espectrometria de massas aplicada à microbiologia, tem sido amplamente utilizado e estudado na área microbiológica nas últimas décadas por ser um método rápido, de baixo custo e confiável para a identificação bacteriana. Destaca-se entre as limitações da tecnologia emergente, o custo inicial para a compra do equipamento e o déficit de um sistema padronizado para avaliar a susceptibilidade aos antimicrobianos. Outras metodologias convencionais, como as bioquímicas ou imunológicas, requerem mais tempo e, frequentemente, são mais caras. Mesmo comparando com as técnicas moleculares, vemos que essas necessitam de mais treinamento e capacitação técnica e na maioria dos casos o custo é elevado (SINGHAL et al., 2015).

O sistema MALDI-TOF/MS consiste basicamente na vaporização e ionização de várias moléculas do material biológico por meio de um laser de nitrogênio que é colocado junto com uma matriz polimérica em uma placa. Logo, essas moléculas ionizadas são aspiradas pelo tubo de vácuo e direcionadas ao detector onde são gerados gráficos específicos dependendo da molécula e do tempo de chegada ao detector (PASTERNAK, 2012).

Para o diagnóstico microbiológico por MALDI-TOF/MS, pode ser utilizado um protocolo de inoculação direta da colônia bacteriana, no qual o microrganismo é inoculado diretamente na placa sem etapas prévias de extração de proteínas, e comparação dos espectros obtidos com uma base de dados de referência, está estabelecido como um método robusto que vem sendo cada vez mais aplicado na rotina dos laboratórios de microbiologia (ANGELETTI, 2016; EIGNER et al., 2009). Porém, até onde temos conhecimento, todas as bases de dados de referência são comercializadas em sistemas fechados. No entanto, os perfis proteicos obtidos no MALDI-TOF/MS são, usualmente, muito mais complexos, em termos de quantidade de picos, do que é necessário para a identificação bacteriana

(CASTAÑO et al., 2016). Nesse contexto, já foi demonstrado em várias espécies bacterianas, incluindo *Staphylococcus* spp. e *Enterococcus* spp., que os espectros gerados poderiam ser utilizados para estabelecer agrupamentos hierárquicos de interesse epidemiológico, pesquisar biomarcadores proteicos e monitorar surtos por bactérias resistentes aos antibióticos dentro dos hospitais, de uma forma rápida, sem adição de custos e facilmente escalonável para um número elevado de amostras (SPINALI et al., 2015).

Cada grupo de bactérias estudado apresenta problemas específicos nas técnicas atuais de caracterização:

- MRSA: busca de metodologias mais rápidas e baratas para análise da variabilidade de isolados em surtos hospitalares e rastreamento de cepas MRS, VISA e hVISA;

- MRSCoN: busca de metodologias mais precisas e mais rápidas para identificação das espécies;

- VRE: busca de metodologias mais precisas e mais rápidas para diferenciação das espécies.

Com isso em vista, o presente trabalho propõe a utilização de um sistema MALDI-TOF/MS aberto para avaliar características fenotípicas de isolados resistentes de *Staphylococcus* spp. e *Enterococcus faecium*, que poderiam auxiliar na identificação bacteriana, na pesquisa de marcadores de resistência e em estudos de agrupamentos hierárquicos e de variabilidade de isolados para estudos epidemiológicos. Objetivando a redução de custos globais para esse tipo de estudo, que geralmente utilizam metodologias baseadas na análise de ácidos nucleicos, e, considerando que a UFSC possui equipamento MALDI-TOF/MS de uso compartilhado, esperamos contribuir para o desenvolvimento de novos protocolos que permitam uma análise multifatorial de isolados de *Staphylococcus* spp. resistentes à meticilina (MRS) e VRE envolvidos em IRAS.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O gênero *Staphylococcus*

2.1.1 Características gerais

Os estafilococos, bactérias do gênero *Staphylococcus*, são cocos Gram-positivos agrupados aos pares ou em forma de tétrades. Pertencem à família *Staphylococcaceae*, sendo composto de 37 espécies, entre as quais, 17 subespécies podem ser isoladas de amostras biológicas humanas. São anaeróbios facultativos, imóveis, não formam esporos e incluem-se entre os microrganismos produtores de catalase. São classificados em dois grupos principais, coagulase positivo e coagulase negativo. Até a década de 80, o *Staphylococcus aureus* era considerado a única espécie coagulase positiva, sendo o resultado do teste da coagulase definitivo para a identificação dessa espécie (KONEMAN et al., 2008). Posteriormente, foram isoladas, a partir de infecções humanas e animais, as espécies *S. schleiferi*, *S. hyicus* e *S. intermedius*, que também são produtoras de coagulase. A diferenciação destes estafilococos baseia-se em outras propriedades fisiológicas e bioquímicas, como fermentação do manitol, endonuclease termoestável e teste da desoxirribonuclease (DNAse) que são testes adicionais utilizadas para a caracterização do microrganismo (SILVA et al., 2003; DAVIS et al., 2013). Além disso, pode ser realizado a detecção de genes por reação em cadeia da polimerase – PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*, que permite a diferenciação das espécies (BENITO et al., 2000).

Geralmente esse gênero faz parte da microbiota da pele humana e mucosas. A espécie de maior interesse médico, principalmente em ambiente nosocomial, é o *S. aureus*, que está frequentemente relacionado com diversas infecções em seres humanos, e podem ser amplamente classificados em dois grupos: infecções de pele e tecidos moles e infecções invasivas (KONEMAN et al., 2008). A maioria das infecções causadas pelo

gênero *Staphylococcus* afetam somente a pele ou o tecido subjacente, e incluem: foliculites, furúnculos, impetigo bolhoso e síndrome da pele escaldada estafilocócica (DRYDEN, 2010). Em um número menor de pessoas, no entanto, a infecção da pele pode levar a uma infecção mais grave e profunda como septicemia, endocardite, osteomielite, artrite, infecções pleuropulmonares e síndrome do choque tóxico (TONG et al., 2015).

As cepas de *Staphylococcus* spp. crescem em meios comuns, caldo ou ágar simples, pH 7, à temperatura ótima de 37°C. As colônias formadas em placa, após 18-24 horas de incubação, apresentam-se arredondadas, lisas e brilhantes. No caso dos *S. aureus*, a coloração das colônias varia desde o acinzentado até o amarelo-ouro, em que a pigmentação aumenta com o tempo de incubação prolongado, não chegando a ser formada nos casos de crescimento em condições anaeróbicas, ou na cultura em caldo. Essa espécie desenvolve-se também na presença de 7,5% de NaCl, meio seletivo, que estimula a produção de coagulase (KONEMAN et al., 2008). Em placas de ágar sangue, um halo de beta-hemólise desenvolve-se em torno das colônias formadas. Um meio importante para a identificação presuntiva de *S. aureus* é o ágar manitol salgado, seletivo e diferencial para esse gênero, uma vez que consegue fermentar o manitol produzindo ácido láctico, diminui o pH do meio e como resultado vira o indicador do meio, vermelho de fenol, de vermelho rosado a amarelo (SHARP; SEARCY, 2006).

Apesar de *S. aureus* ser a espécie mais estudada por serem mais incidentes e as infecções serem mais graves devido a suas características de virulência e resistência, outras espécies merecem destaque:

- *Staphylococcus haemolyticus* tem sido bastante estudado nas últimas décadas, devido ao aumento das infecções causadas por esta espécie, em pacientes imunocomprometidos e recém-nascidos (KORKIENKO et al., 2016).

- *Staphylococcus sciuri* vem sendo um alvo de estudos já que são transportados por vários animais domésticos, e possuem uma alta capacidade de transmissão de fatores de resistência aos antibióticos (NEMEGHAIRE et al., 2014).

- *Staphylococcus lugdunensis*, apesar de pertencer ao grupo de *Staphylococcus* coagulase negativos, possui

características únicas de virulência e susceptibilidade antimicrobiana, demonstrando patogenicidade comparável à do *Staphylococcus aureus* (SILVEIRA; D'ACEVEDO, 2010). Estudos anteriores indicam uma baixa prevalência de infecções por *S. lugdunensis* na clínica, no entanto, já foi demonstrado que o aprimoramento na identificação desse microrganismo mostra uma incidência aumentada (MCHARDY et al., 2017).

- *Staphylococcus epidermidis* tem o papel de destaque entre os estafilococos coagulase negativa, devido a vários fatores de virulência sendo considerado uma causa comum de infecções hospitalares (VON EIFF; PETERS; HEILMANN, 2002). Por causa da sua potencial capacidade de formação de biofilme e colonização em diferentes superfícies, também devido ao uso de dispositivos médicos invasivos como cateteres, em pacientes imunocomprometidos e hospitalizados, as infecções relacionadas a este microrganismo são considerados oportunistas (OTTO, 2009). Nas últimas décadas, a importância clínica e o surgimento de cepas de *S. epidermidis* resistentes à meticilina criaram muitos desafios no processo de tratamento (NAMVAR et al., 2014).

- *Staphylococcus pseudintermedius* foram notificados em infecções zoonóticas causando bacteremia, endocardite e infecção de feridas cirúrgicas relacionada a procedimentos invasivos, assim como, a capacidade de formar biofilme que corresponde a um dos fatores de virulência mais importantes em *S.aureus* e *S. epidermidis* (VAN HOOVELS et al., 2006; POMPILIO et al., 2015).

2.1.2 Principais aspectos da resistência aos antimicrobianos

A introdução da penicilina no início da década de 1940 melhorou dramaticamente o prognóstico de pacientes com infecção estafilocócica. No entanto, já em 1942, os estafilococos resistentes à penicilina foram reconhecidos, pela primeira vez em hospitais e, posteriormente, na comunidade. Os estafilococos passaram a desenvolver resistência a este antimicrobiano pela

produção de penicilinas. Esta enzima, predominantemente extracelular, sintetizada quando a bactéria é exposta a antibióticos beta-lactâmicos, hidrolisa o anel beta-lactâmico da penicilina, tornando-a inativa. No final dos anos 1960, mais de 80% dos isolados de estafilococos da comunidade e hospitalares eram resistentes à penicilina. Este padrão de resistência, primeiro emergente em hospitais e depois se espalhando para a comunidade, é um mecanismo de transmissão que vem sendo observado (LOWY, 2003).

A metilina, introduzida em 1959, foi a primeira das penicilinas semissintéticas resistente à ação das penicilinas. Porém, a sua introdução foi rapidamente seguida por relatos de isolados resistentes à metilina. Em 1961, houve relatos provenientes do Reino Unido de isolados de *S. aureus* que tinham adquirido resistência à metilina (MRSA), e isolados de MRSA foram logo relatados em outros países europeus e, posteriormente, do Japão, na Austrália e nos Estados Unidos (ENRIGHT et al., 2002).

Uma cepa sensível à metilina de *S. aureus* (MSSA) se torna resistente à metilina (MRSA) quando ocorre a aquisição do elemento genético móvel chamado de cassete cromossômico *mec* de *Staphylococcus* (*SCCmec*). O *SCCmec* corresponde a uma ilha genômica onde está contido o gene *mecA*, que codifica a proteína 2a de ligação à penicilina (PBP2a), que é muito conservado entre *S. aureus* e *S. epidermidis* resistentes à metilina (RODRIGUES et al., 2011). A proteína PBP2a é considerada o principal determinante da resistência a beta-lactamâmicos como a oxacilina, uma vez que possui ação transpeptidase alternativa permite a síntese da parede celular nos *Staphylococcus* spp. resistentes à metilina (MRS), a concentrações de beta-lactamâmicos na qual a síntese da parede celular seria inibida nos *Staphylococcus* spp. sensíveis (LIM; STRYNADKA, 2002).

O *SCCmec* é um grupo móvel de elementos de DNA de 21 a 67 kb integrado ao cromossomo das cepas MRS, próximo à origem de replicação. São classificadas em diferentes tipos com base na combinação de *mec* e *ccr*, em cinco classes segundo o *mec* e oito segundo o *ccr* (ITO et al., 2014). Até o momento foram identificados 12 tipos de elementos *SCCmec* (INDRÁKOVÁ et al., 2017; IWG-SCC, 2011). Dependendo do tipo

de SCC*mec* se observa um perfil diferente de resistência aos antimicrobianos (MARTINS et al., 2014). A tipagem do SCC*mec* é uma importante ferramenta epidemiológica, principalmente para *S. aureus*, sendo assim, infecções hospitalares ou nosocomiais por *S. aureus* resistentes à oxacilina (HA-MRSA) se associam ao SCC*mec* do tipo I, II e III, que se caracterizam por conferir resistência a várias classes de antibióticos (GOMEZ et al., 2014). Já os *S. aureus* resistentes à oxacilina adquiridos na comunidade (CA-MRSA), possuem, habitualmente, os tipos IV e V, com sensibilidade aumentada a antibióticos não beta-lactamâmicos (ASGHAR, 2014).

Em 2011, foi descrito o primeiro homólogo ao gene *mecA*, o gene *mecC* ou *mecA*_{ALGA251}, localizado num novo elemento genético móvel, que foi nomeado SCC*mec* tipo IX. Embora o gene *mecC* isolado de vacas leiteiras é 70% idêntico ao *mecA*, a detecção molecular do gene *mecC* baseado na amplificação do gene *mecA* não é possível, mostrando, assim, a dificuldade para o diagnóstico laboratorial e a necessidade de um *primer* específico para *mecC*. No entanto, possui uma susceptibilidade aos antimicrobianos equivalente e não modifica o tratamento das infecções (GARCÍA-ÁLVAREZ et al., 2011).

Atualmente, *S. aureus* resistentes à metilina que carregam o gene *mecC*, têm sido reportados em vários países da Europa, tanto em amostras de origem animal como humanas (KERSCHNER et al., 2014; PATERSON; HARRISON; HOLMES, 2014; MILHEIRIÇO; DE LENCASTRE; TOMASZ, 2017).

No final da década de 1990, os poucos clones multirresistentes e altamente epidêmicos de MRSA tinham-se tornado os agentes causadores mais frequentes de doença nos hospitais e na comunidade (DELEO; CHAMBERS, 2009). A descrição das linhagens de *S. aureus* baseia-se nos complexos clonais (CCs) identificados por tipagem por sequência de multilocus (MLST). Os principais clones de MRSA disseminados no mundo são: CC5, CC8, CC22, CC30, CC45 e CC398 (WERTHEIM et al., 2005; SHARMA-KUINKEL et al., 2015; HEIKINHEIMO et al., 2016)

Sendo assim, os glicopeptídeos, principalmente a vancomicina, tornaram-se a terapia mais utilizada para o tratamento de infecções graves por MRSA (LUNA, et al., 2010). Em 1997, foi relatado pela primeira vez no Japão um isolado de MRSA com sensibilidade reduzida à vancomicina. O isolado teve um valor aumentado da concentração inibitória mínima (CIM) para vancomicina, no intervalo de 3-8 µg/ml, e tornou-se conhecido como *S. aureus* com resistência intermediária à vancomicina (VISA) (HIRAMATSU et al., 1997). Existem diferenças na susceptibilidade à vancomicina entre os isolados resistentes de *S. aureus*. Sendo assim, o *S. aureus* resistente à vancomicina (VRSA), possui uma CIM ≥ 16 µg/ml e a resistência é mediada por plasmídeos que contém o gene *vanA* oriundo de *Enterococcus* resistente à vancomicina (VRE) (GARDETE; TOMASZ, 2014).

Diferentemente dos VISA e VRSA, os *S. aureus* com heteroresistência intermediária à vancomicina (hVISA), são normalmente, considerados sensíveis à vancomicina baseados nas metodologias tradicionais de determinação da CIM, mas possuem uma subpopulação com resistência intermediária. O mecanismo de resistência ocorre por uma série de mutações gênicas nos sistemas de controle da síntese da parede celular, que induz o espessamento da parede celular do *S. aureus*, dificultando assim, a chegada da vancomicina ao sítio de ação na membrana citoplasmática (HIRAMATSU, 2001; HOWDEN et al., 2010).

2.2 O gênero *Enterococcus*

2.2.1 Características gerais

As bactérias do gênero *Enterococcus* são classificadas como cocos Gram-positivos, de morfologia ovoide e podem arranjar-se aos pares ou em cadeias. São catalase negativa ou pseudonegativa, anaeróbias facultativas, crescem a temperaturas de 10°C a 45°C, em NaCl 6,5%, sais biliares 40%, pH 9,6 e podem resistir por até 30 minutos a 60°C (MANERO; BLANCH, 1999). *Enterococcus faecalis* são geralmente considerados catalase negativa, mas pode aparecer fracamente positivo sob algumas condições. A enzima responsável pela

atividade da catalase não foi demonstrada e tem, por razões pouco claras, muitas vezes sido atribuída a uma pseudocatalase (FRANKENBERG et al., 2002).

Geralmente o gênero *Enterococcus* habita o trato gastrointestinal, as espécies de maior importância clínica são *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*, mas já foram descritas 23 espécies (LEBRETON; WILLEMS; GILMORE, 2014).

2.2.2 Principais aspectos da resistência aos antimicrobianos

Embora as características de resistência aos antimicrobianos entre *E. faecalis* e *E. faecium* diferem em aspectos importantes, geralmente podem ser classificadas em resistência intrínseca, resistência adquirida e tolerância (MILLER, 2014).

Os enterococos são intrinsecamente resistentes a muitos agentes antimicrobianos normalmente utilizados na clínica (GOLD, 2001). Todos os enterococos exibem resistência à penicilina e ampicilina, bem como uma resistência de alto nível para a maioria das cefalosporinas e penicilinas semissintéticas, como resultado da expressão das proteínas ligadoras de penicilina (PBP) de baixa afinidade de ligação aos beta-lactâmicos (KRISTICH et al., 2011). Os enterococos também têm uma resistência nativa a concentrações clinicamente praticáveis de aminoglicosídeos, o que impede a sua utilização como agentes únicos (ARIAS; CONTRERAS; MURRAY, 2010).

Por sua vez, a resistência adquirida foi descrita para ampicilina, gentamicina e níveis elevados de vancomicina. O mecanismo de resistência de enterococos aos glicopeptídeos vancomicina e teicoplanina ocorre por meio de genes de resistência: *vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE*, *vanG*, *vanL*, *vanM* e *vanN* (CETINKAYA et al., 2000; MILLER; MUNITA; ARIAS, 2014). O precursor alterado é codificado por operons de resistência, que contém um desses genes citados acima, normalmente contidos em elementos genéticos móveis e, portanto, podem ser transferidas a outras bactérias. Certas

espécies de enterococos, possuem no cromossomo, genes que codificam a resistência aos glicopeptídeos (DEPARDIEU et al., 2007)

Os enterococos resistentes aos glicopeptídeos produzem precursores de peptidoglicano alterado onde os terminais D-Alanina-D-Alanina são modificados para D-Alanina-D-lactato ou D-Alanina-D-Serina. Assim, estas substituições reduzem a afinidade de ligação dos antibióticos, mas podem ainda servir como substratos para as enzimas biossintéticas da parede celular para permitir a construção de peptidoglicano funcionais, induzindo resistência da bactéria a droga (ARTHUR et al., 1992). Já tem sido relatada resistência a antimicrobianos alternativos para o tratamento de VRE com atividade contra *Enterococcus* spp. como linezolida (DE ALMEIDA et al., 2014).

2.3 Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS)

As Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde, também denominada infecção hospitalar ou nosocomial, são infecções adquiridas pelo paciente no hospital, na clínica ambulatorial ou qualquer ambiente de atenção clínica, durante o período de hospitalização ou após a alta, podendo ser relacionado com os fatores de risco da hospitalização e/ou outros procedimentos hospitalares, principalmente aqueles que comprometem a barreira protetora da pele. Considerando a morbidade, a mortalidade, o aumento da duração da estadia e o custo, as IRAS representam uma preocupação tanto para os profissionais de saúde, e instituições envolvidas, quanto para os pacientes (OLIVEIRA; DE PAULA, 2009; MEHTA et al., 2014).

A Organização Mundial da Saúde (OMS), reconhece as IRAS como um problema de saúde pública a nível mundial. Considerando que as condições clínicas dos pacientes que requerem hospitalização são graves e muitos, apresentam imunossupressão, assim como o aumento das bactérias multidroga resistentes nos hospitais, as IRAS passaram a ser um grave problema de saúde pública (PITTET et al., 2008). Um estudo feito pelo Centro Europeu de Prevenção e Controle de Doenças (ECDC), no período de 2011-2012 que envolveu 30 países europeus, mostrou que 6% de todos os pacientes internados devolveram IRAS (ECDC, 2013). No entanto, os

países em desenvolvimento possuem uma maior taxa de IRAS comparados com países desenvolvidos, associadas a fatores como à estrutura física inadequada e à falta de adesão dos profissionais da saúde às medidas de controle das IRAS (PADOVEZE; FORTALEZA, 2014).

Nesse contexto, o Brasil ainda não possui um sistema de gestão regular e continuamente alimentado de informações para se ter estimativas precisas da prevalência de IRAS no país; embora várias políticas e programas para o controle das IRAS tenham sido desenvolvidos a partir da Portaria 196/1983 do Ministério da Saúde. Esta portaria instituiu a obrigatoriedade da implementação de Comissões de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) nos hospitais brasileiros (NOGUEIRA-JUNIOR et al., 2014). Atualmente, o programa foi transferido para a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que estabelece os protocolos para o controle de infecções a nível nacional. Considerando a adesão e/ou implementação desses protocolos, o cenário brasileiro é heterogêneo devido às diferenças econômicas, políticas e culturais. Assim, visando a adoção das estratégias sugeridas pela ANVISA, torna-se necessário que os hospitais cumpram alguns requisitos básicos, como a acreditação da CCIH, implantação de laboratório de microbiologia e constante vigilância epidemiológica em cada unidade de saúde (ANVISA, 2004). Entretanto, dados da ANVISA mostram que 46% dos hospitais da região norte e 24% dos hospitais da região sul, não possuem o apoio de um laboratório de microbiologia (SANTOS, 2006).

A transmissão de microrganismos nos hospitais, sejam resistentes ou sensíveis aos antimicrobianos, pode ocorrer por meio dos pacientes, visitantes, profissionais de saúde e do ambiente hospitalar; e para tanto requer, basicamente, a presença do agente infeccioso, do hospedeiro e de um mecanismo de transferência (SIEGEL et al., 2007). A infecção nosocomial poderia ser causada por microrganismos adquiridos de uma outra pessoa (infecção cruzada), da própria microbiota da pele (infecção endógena) ou de objetos que foram contaminados (infecção ambiental) (WHITELAW et al., 2015).

Tradicionalmente, o controle das infecções nosocomiais baseava-se na prevenção de infecções cruzadas somente entre os pacientes. No entanto, os portadores nasais e anais de bactérias multidroga resistente (MDR), particularmente MRSA, VISA/hVISA e VRE, são considerados fatores de risco de infecção em vários grupos de pacientes. Esses portadores são fonte de contaminação não só para o próprio paciente, mas também para profissionais da saúde e acompanhantes que podem carrear esses microrganismos por toda a instituição (VAN RIJEN et al., 2008; MUTTERS et al., 2013).

No rastreio de MRSA nos hospitais, o uso de técnicas microbiológicas para detectar portadores nasais de MRSA sem evidência de infecção é considerado essencial para o sucesso do programa de controle. Já tem sido demonstrado que 17% dos contatos entre profissional da saúde e pacientes colonizados por MRSA resultaram na transmissão do MRSA do paciente para as luvas do profissional da saúde. Além disso, nesse estudo, de forma interessante as taxas de adesão à utilização de luvas foram 75% dos profissionais da saúde, exceto os médicos cuja adesão foi de apenas 27% (McBRYDE et al., 2004). Para o controle de MRSA é pertinente ter conhecimento dos níveis de colonização e infecção a nível nacional, regional e local, para delinear o processo de vigilância. Nos hospitais com MRSA endêmico ou durante surtos, o rastreio deveria ser realizado em todos os pacientes admitidos, e alguns hospitais realizam a descolonização dos pacientes e profissionais da saúde MRSA positivos (COOKSON et al., 2011). Entretanto não há evidências científicas da eficácia da descolonização, portanto, não deve ser indicada como processo de rotina (GURIEVA; BOOTSMA; BONTEN, 2012).

Ao contrário da colonização por MRSA, não existem estratégias de descolonização bem sucedida para VRE, uma vez que o reservatório poderia ser todo o trato gastrointestinal. Além disso, soma-se a falta de dados suficientes sobre a duração da colonização ou colonização recorrente de VRE. Entretanto, de um modo geral, no contexto da vigilância de VRE em populações de alto risco ou durante surtos, é recomendado a coleta do swab anal para a identificação dos pacientes colonizados, para posterior estratificação dos pacientes. No Brasil, a ANVISA adotou as mesmas recomendações do CDC (*Centers for Disease*

Control and Prevention), portanto, não é recomendada a descolonização de portadores de VRE (MUTTERS et al., 2013; CDC, 2013).

Adicionalmente, para conseguir quebrar a cadeia de transmissão, a adesão do profissional de saúde ao programa de controle de infecção hospitalar é fundamental. Já tem sido demonstrado que é possível controlar surtos, estabelecendo medidas simples, como a abordagem ativa do problema através de um retorno regular das informações para os profissionais, fomentando uma melhoria na implementação das medidas de prevenção como lavagem das mãos, utilização de álcool e outros desinfetantes (PINA et al., 2010). Uma das melhores formas de embasar as medidas de controle de infecção hospitalar, e posteriormente fornecer um *feedback* para as ações de controle adotadas, é a utilização de metodologias para rastreamento e tipagem dos microrganismos causadores de IRAS circulantes na instituição.

2.4 Tipagem bacteriana

Nas últimas décadas, os métodos fenotípicos de tipagem bacteriana foram progressivamente substituídos pelos métodos moleculares. Entre as categorias principais de genotipagem bacteriana, poderíamos citar: (1) Métodos baseados em padrões de bandas de DNA; (2) Métodos baseados em sequenciamento de DNA e (3) Métodos baseados na hibridação do DNA (LI; RAOULT; FOURNIE, 2009).

Para avaliação da clonalidade de isolados de *Staphylococcus* spp. vários métodos de tipagem já foram descritos, com diferentes capacidades discriminatórias (RODRIGUEZ et al., 2015). A eletroforese em gel de campo pulsado, conhecida como PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*), baseia-se na digestão do DNA bacteriano por enzimas de restrição (*SmaI* para *S.aureus*) e separação dos fragmentos por eletroforese em campo pulsado. Atualmente é o padrão ouro para avaliação de clonalidade, mas, além de ser uma técnica onerosa em todos os aspectos, deve ser

considerado que alterações mínimas no protocolo podem comprometer a reprodutibilidade do teste (TENOVER et al., 1995; MURCHAN et al., 2003). A tipagem de sequências multilocus, conhecida como MLST (*Multilocus Sequence Typing*), é uma técnica de sequenciamento de nucleotídeos, baseada na análise de polimorfismos de genes constitutivos, onde as diferentes variantes do gene da espécie bacteriana são atribuídas a um alelo distinto e esses alelos definem o perfil alélico ou tipo de sequência (ST) (MAIDEN et al., 1998). No MLST usualmente se utilizam sete genes constitutivos que geram um perfil alélico e são agrupados em complexos clonais (CC) pela sua semelhança com um perfil alélico central (SUZUKI et al., 2009; LARSEN et al., 2012). A PCR de elementos repetitivos (rep-PCR) baseia-se em padrões genômicos gerados por meio de iniciadores que hibridizam com sequências repetitivas situadas entre os genes e espalhadas no genoma bacteriano (OLIVE; BEAN, 1999; MANGA et al., 2015). E, finalmente, a tipagem *spa* que considera a quantidade e a classe de mutações na região repetitiva do gene *spa* (FRENAY et al., 1996; O'HARA et al., 2016), e a tipagem do cassete SCC*mec* (*Staphylococcal Cassette Chromosome mec*) (ITO et al., 2001; ITO et al., 2004). No estudo de Rodriguez et al. (2015), foram avaliados os quatro primeiros métodos de tipagem de *S. aureus* citados acima e mostraram um poder discriminatório comparável.

O primeiro estudo de subtipificação de patógenos nosocomiais, como MRSA, utilizando a espectrometria de massas de células intactas, foi no ano 2002, mas antes disso, no ano 2000, já tinha sido descrito a capacidade dos *fingerprints* para diferenciar cepas MRSA de cepas MSSA (EDWARDS-JONES et al., 2000; WALKER et al., 2002; JACKSON et al., 2005). Após os primeiros resultados, foram publicados outros estudos que compararam os resultados obtidos no MALDITOF/MS com os métodos de PFGE, MLST e tipagem do *spa* utilizando os principais complexos clonais detectados em vários hospitais do mundo, como CC5, CC8, CC22, CC30, CC45 e CC398. Através de perfis proteicos, foram observados agrupamentos hierárquicos comparáveis com as metodologias tradicionais, mas por meio de uma técnica mais rápida e de baixo custo em termos de reagentes (WOLTERS et al., 2011; ZHANG et al., 2015; SAUGET et al., 2017). A modificação na preparação

da amostra já tem sido descrita, como a extração de proteínas e alterações da matriz, e tem demonstrado um aumento do poder discriminatório dos perfis proteicos obtidos no MALDI-TOF/MS (UEDA et al., 2015). A combinação de ferramentas de bioinformática e MALDI-TOF/MS para os quatro complexos clonais principais de *S. aureus* também demonstrou ser uma abordagem confiável para tipagem bacteriana automatizada (CAMOEZ et al., 2016). Em contrapartida, no estudo de Lasch et al. (2014), se verificou o poder discriminatório insuficiente do MALDI-TOF/MS para diferenciar clones epidêmicos de *S. aureus* ao nível de complexos clonais distintos para acompanhar a disseminação de subgrupos bacterianos, como é possível com o MLST.

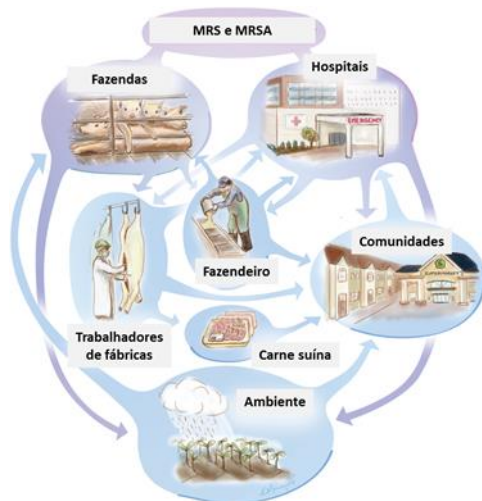
As técnicas de MLVA (*Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis*), MLST e PFGE são utilizadas comumente para a tipagem bacteriana do gênero *Enterococcus*. O MLVA baseia-se no número de cópias de unidades de repetição do *locus* VNTR (FROTHINGHAM, 1995). Werner, Klare e Witte (2007) compararam as três metodologias e obtiveram um índice discriminatório maior para PFGE, seguido de MLST e por último o MLVA. A utilidade do MALDI-TOF/MS para a diferenciação de clones epidêmicos de *E. faecium* e *E. faecalis*, assim como no caso dos *S. aureus*, mostra resultados contraditórios (GRIFFIN et al., 2012; LASCH et al., 2014; NOWAKIEWICZ et al., 2017). No entanto, o primeiro estudo de surto por VRE por comparação do MALDI-TOF/MS com o WGS (*whole genome sequencing*) demonstrou vantagens e a possibilidade de detectar surtos de forma rápida utilizando o MALDI-TOF/MS, embora se mostrem as limitações da técnica fenotípica para relacionar clones epidêmicos e se ressalta a importância de ter mais estudos com diferentes complexos clonais (SCHLEBUSCH et al., 2017). Devido a essas dificuldades, a recomendação é estudar o gênero *Enterococcus* de forma diferencial, ou seja, agrupados por espécie bacteriana, especialmente na procura de biomarcadores de resistência aos antibióticos (SANTOS et al. 2015; NOWAKIEWICZ et al., 2017).

As diretrizes desenvolvidas para o atual método padrão ouro, PFGE, podem ser adaptadas para a interpretação dos resultados de agrupamento hierárquico gerados a partir de espectros de massas do MALDI-TOF/MS. Sendo assim, com um número de picos de aproximadamente 100, entre três a cinco vezes mais que as bandas de DNA gerados no PFGE, se considera espécies relacionadas aquelas que possuem até quinze picos de diferença (SPINALI et al., 2015).

2.5 Epidemiologia

O estudo epidemiológico tornou-se indispensável para compreender a transmissão de microrganismos resistentes aos antimicrobianos. Na figura 1, se observa o rastreamento das origens da cepa de *S. aureus* CC398 de importância clínica e encontrada na microbiologia veterinária, mostrando que as cepas podem se espalhar a partir de fazenda de suínos, de operações industriais da carne suína, nas comunidades, no meio ambiente e nos hospitais, assim, num processo de retroalimentação de cepas clonais.

Figura 1: Transmissão de *Staphylococcus* spp. resistentes aos antibióticos.



Fonte: Adaptado de Smith (2015).

Da mesma forma, estudos tem descrito VRE de origem animal, onde a seleção das cepas resistentes ocorre pela administração de doses de antimicrobianos nos animais com a finalidade de melhorar a produtividade, assim como diminuir a mobilidade e a mortalidade (NILSSON, 2012). A transmissão de cepas resistentes à vancomicina, pode acontecer de forma bilateral de humanos e de animais, a partir de fazenda de suínos, conjuntamente com as cepas MRS e MRSA descritos na figura 1 (GETACHEW et al., 2013; HERMANOVSKÁ; BARDOŇ; ČERMÁK, 2016; NOWAKIEWICZ et al., 2017).

OBJETIVOS

2.6 Objetivo Geral

Avaliar biomarcadores proteicos para identificação fenotípica e avaliação de resistência e de variabilidade em isolados de *Staphylococcus* spp. resistentes à meticilina (MRS) e de *Enterococcus faecium* resistentes à vancomicina.

2.7 Objetivos Específicos

- Obter e identificar fenotipicamente e genotipicamente isolados de *Staphylococcus* spp. resistentes à meticilina (MRS) e de *Enterococcus faecium* resistentes à vancomicina em amostras coletadas de pacientes, de profissionais da área da saúde e do ambiente hospitalar;
- Padronizar um protocolo de MALDI-TOF para análise do perfil proteico dos isolados de MRS e de VRE;
- Analisar os perfis proteicos obtidos quanto a sua aplicabilidade para identificação bacteriana e para estudos de prospecção de resistência e de tipagem bacteriana;

3 METODOLOGIA

3.1 Cepas e isolados bacterianos

Durante as diversas etapas deste estudo foram utilizadas, conforme descrito abaixo, tanto cepas-padrão como cepas-controle para validação da metodologia e análise comparativa de resultados. Também foram utilizadas amostras bacterianas de MRS e VRE obtidos de pacientes, profissionais da saúde e ambiente hospitalar.

3.1.1 Cepas-padrão e cepas-controle

Foram testadas cepas-padrão (ATCC, American Type Culture Collection) de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Além disso, foram testadas cepas-controle de MRSA, cepas-controle de hVISA e cepa-controle de VISA, descritas na tabela 1.

Tabela 1: Cepas-padrão e cepas-controle utilizadas no estudo.

Nome	Correspondência	Descrição	SCCmec	ST	CC	Fonte ou Referência
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29.212	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	-	-	-	-	ATCC*
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25.922	<i>E. coli</i> ATCC 25922	-	-	-	-	ATCC*
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27.853	<i>Pae</i> ATCC 27853	-	-	-	-	ATCC*
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29.213	<i>Sau</i> ATCC 29213	MSSA, mecA negativo	-	-	-	ATCC*
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 700.698	Mu3	hVISA, mecA positivo	II	ST5	CC5	Al-Zahrani et al. (2011)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 700.699	Mu50	VISA, mecA positivo	II	ST5	CC5	Lee et al. (2014); Al-Zahrani et al. (2011)
hVISA 36	hVISA 1	hVISA, mecA positivo	II	-	-	Silveira et al. (2015b)
hVISA 43	hVISA 2	hVISA, mecA positivo	III	-	-	Silveira et al. (2015b)
hVISA 69	hVISA 3	hVISA, mecA positivo	II	-	-	Silveira et al. (2015b)
hVISA 74	hVISA 4	hVISA, mecA positivo	IVc	-	-	Silveira et al. (2015b)
hVISA 80	hVISA 5	hVISA, mecA positivo	II	-	-	Silveira et al. (2015b)
hVISA 94	hVISA 6	hVISA, mecA positivo	I	-	-	Silveira et al. (2015b)
hVISA 92	hVISA 7	hVISA, mecA positivo	II	-	-	Silveira et al. (2015b)
SI13 hVISA	SI13 hVISA	hVISA, mecA positivo	III	-	-	Silveira et al. (2015b)
Hungarian/Brazilian Endemic Clone	CEB	MRSA, mecA positivo	III	ST239	CC8	Caiaffa-Filho et al. (2013); Dabul; Camargo (2014)
Pandemic Clone/Epidemic MRSA-15	EMRSA-15	MRSA, mecA positivo	IV	ST22	CC22	Udo; Boswih; Al-sweh(2016); Ellington et al. (2010)
Pandemic Clone/Epidemic MRSA-16	EMRSA-16	MRSA, mecA positivo	II	ST36	CC30	Chung et al. (2004); Ellington et al. (2010)
USA100, New York/Japan	NYJ	MRSA, mecA positivo	II	ST5	CC5	Caboclo et al. (2012); King et al. (2016)
USA 800, Pediatric Clone	PC	MRSA, mecA positivo	IV	ST5	CC5	Caboclo et al. (2012); Teixeira et al. (2012)
USA 400	USA 400	MRSA, mecA positivo	IV	ST1	CC1	Caboclo et al. (2012); King et al. (2016)
USA 300	USA 300	MRSA, mecA positivo	IVa	ST8	CC8	Shore et al. (2011); King et al. (2016)
Oceania Southwest Pacific Clone	OSPC	MRSA, mecA positivo	IV	ST30	CC30	Rozenbaum et al.(2009)

O "SCCmec" corresponde a tipagem do cassete cromossômico estafilocócico, o "ST" é a sequência-tipo utilizando a técnica MLST e "CC" corresponde ao complexo clonal por MLST. Fonte: desenvolvido pela autora.

3.1.2 Isolados hospitalares

Para o isolamento das espécies de interesse (MRS e VRE), foram utilizadas amostras coletadas no projeto principal do

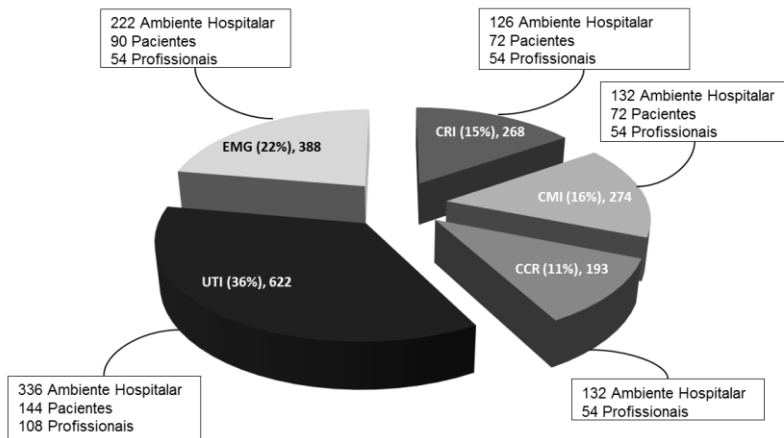
nosso grupo de pesquisa intitulado “*Healthcare Associated Infections Microbiome Project*” (HAIMP), o qual tem por objetivo o rastreamento, identificação e caracterização molecular de bactérias multirresistentes em ambiente hospitalar. O HAIMP vem sendo realizado no Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago (HU/UFSC) e possui aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFSC (CEP-UFSC) sob o número 32930514.0.0000.0121.

As análises do presente projeto foram realizadas no Laboratório de Microbiologia Molecular Aplicada (MIMA) do departamento de Análises Clínicas do Centro de Ciências da Saúde da UFSC (CCS-UFSC); no Laboratório Central de Biologia Molecular Estrutural (CEBIME), sede na UFSC da Rede Proteoma do Estado de Santa Catarina; no Laboratório de Bioinformática da UFSC (CCB-UFSC) e na empresa Neoprospecta Microbiome Technologies S/A, localizada no parque tecnológico e de inovação Sapiens Parque em Florianópolis, SC.

As amostras foram coletadas em cinco unidades hospitalares: Emergência (EMG), Unidade de Terapia Intensiva (UTI), Centro Cirúrgico (CCR), Clínica Médica I (CMI) e Clínica Cirúrgica I (CRI), durante doze meses consecutivos, entre abril de 2015 e março de 2016.

As coletas de amostras para este projeto foram obtidas através de um *swab* e transportadas em meio Amies. Os pontos de coleta foram pacientes, profissionais e ambiente hospitalar. Na figura 2, pode-se visualizar a distribuição das amostras coletadas no projeto HAIMP. Os sítios de coleta dos pacientes foram: *swab* retal, *swab* nasal e *swab* das mãos. Dos profissionais da saúde (médicos, enfermeiros ou técnicos de enfermagem) foram: *swab* das mãos, *swab* do jaleco e *swab* do celular. As amostras dos ambientes foram coletadas de superfícies de alto contato como: leito do paciente, banheiros, vestiários, sala de lanche, equipamentos de uso comum, recepção, sala de repouso médico e de enfermagem, sala de medicamentos e curativos, expurgo, consultório, prescrição e ambientes comuns do HU.

Figura 2: Distribuição das amostras coletadas entre abril de 2015 e março de 2016 por alas do HU/UFSC. N=1.745



Cada quadro representa a distribuição das amostras por ponto de coleta. As cinco unidades hospitalares correspondem a: Emergência (EMG), Unidade de Terapia Intensiva (UTI), Centro Cirúrgico (CCR), Clínica Médica I (CMI) e Clínica Cirúrgica I (CRI). Fonte: desenvolvido pela autora.

As amostras em meio Amies foram inoculadas em caldo infusão de cérebro e coração (BHI - *Brain Heart Infusion*) e incubadas por 12 a 18 horas a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$.

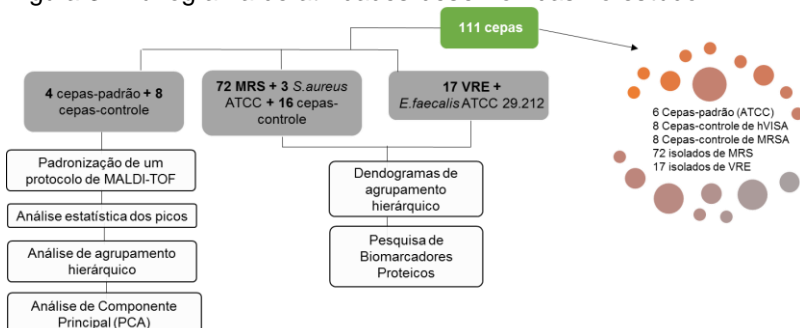
Ao longo de doze meses foram coletadas 1.745 amostras, sendo distribuídas nas cinco alas do HU/UFSC: UTI, EMG, CMI, CRI e CC. Além disso, foram recebidas 14 amostras identificadas fenotipicamente no Vitek2® de MRSA e VRE do laboratório de microbiologia do HU/UFSC (nove amostras de MRSA e cinco amostras de VRE).

Foram semeadas 1.745 amostras em ágar manitol salgado com $6\mu\text{g/mL}$ de oxacilina e ágar Bile-Esculina com $6\mu\text{g/mL}$ de vancomicina. Após o isolamento e os testes iniciais, as cepas foram mantidas a -20°C em caldo TSB (*Trypticase Soy Broth*) com 15% de glicerol no Laboratório de Microbiologia Molecular Aplicada (MIMA) para análises posteriores.

3.2 Fluxograma do estudo

Para a análise dos perfis proteicos foram utilizadas 111 cepas que correspondem a cepas-padrão, a cepas-controle e aos isolados hospitalares de MRS e VRE, listados na tabela 1 do item 3.1.1, na tabela 2 do item 4.1.1 e na tabela 3 do item 4.1.2. Na figura 3, pode-se visualizar a sequência de trabalho.

Figura 3: Fluxograma de atividades desenvolvidas no estudo.



Fonte: desenvolvido pela autora.

3.3 Triagem de *Staphylococcus* spp resistentes à meticilina

O repique e isolamento foram realizados por esgotamento em ágar manitol salgado com 6µg/mL de oxacilina para seleção presuntiva de MRS. As placas foram incubadas por 24 a 48 horas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$. São consideradas manitol positivas as colônias amarelas que viraram o indicador do meio, vermelho de fenol, para amarelo. As amostras manitol positivas foram analisadas pela coloração de Gram e pela reação de catalase com peróxido de hidrogênio 3%. As amostras que apresentaram coloração de Gram positivas, com agrupação em cachos de uvas e reação de catalase positiva correspondem ao gênero de interesse e, portanto, foram re-isoladas em ágar manitol salgado. A produção de coagulase foi avaliada por reação em tubo. As colônias foram incubadas em plasma de coelho (LaborClin, Brasil) a 37°C por até 24h. Se observou a formação de coágulo

inclinando-se o tubo suavemente a cada 30min por 4h (ou até o máximo de 24h). A coagulação do plasma foi sinal de positividade, ou seja, a produção da enzima coagulase pela bactéria.

Após o isolamento das bactérias foi realizada a triagem com a cefoxitina por disco-difusão, com a finalidade de prever a resistência à metilicina mediada pelo gene *mecA*, de acordo com a padronização do documento M2-A9, 2006 (ANVISA) e interpretação com as recomendações do “*Clinical and Laboratory Standards Institute*” (CLSI, 2016). Essa interpretação está demonstrada na tabela 4. O teste de sensibilidade à cefoxitina foi realizado no laboratório de Microbiologia do HU/UFSC, sob supervisão da Dr^a Mara Scheffer.

Em um tubo contendo 4-5mL de solução salina foi preparada uma suspensão bacteriana na escala 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) ajustando a turbidez com o equipamento DensiCHEK™ Plus (bioMérieux). Na suspensão ajustada mergulhou-se o *swab* estéril e inoculou-se na superfície seca da placa de ágar Müller-Hinton até que a sua distribuição fosse uniforme. O disco de cefoxitina 30µg foi colocado na superfície do ágar semeado e foi incubado por 18h a 37°C. Após esse período, realizou-se a leitura das placas (diâmetro dos halos de inibição) e interpretação dos resultados.

Tabela 2: Interpretação do teste de sensibilidade à cefoxitina segundo o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (2016).

Microrganismo	Cefoxitina 30µg	
	Halo de Inibição (mm)	Interpretação
<i>S. aureus</i> e <i>S. lugdunensis</i>	≤21	Resistentes à oxacilina
	≥22	Sensíveis à oxacilina
Estafilococos coagulase negativa	≤24	Resistentes à oxacilina
	≥25	Sensíveis à oxacilina

3.4 Triagem e Identificação fenotípica presuntiva de *Enterococcus* Resistente à Vancomicina

As colônias obtidas após isolamento em ágar Bile-Esculina com 6µg/mL de vancomicina foram analisadas pela coloração de Gram e semeadas em meio cromogênico CHROMagar™ VRE (Becton, Dickinson & Company). Foram consideradas positivas as colônias com coloração rosa que

correspondem a *Enterococcus faecium* e/ou *Enterococcus faecalis* resistentes à vancomicina.

3.5 Métodos Genotípicos

O método de identificação para determinação da espécie foi a técnica de sequenciamento baseado no marcador 16S rRNA e para confirmação da presença dos genes de resistência microbiana foi utilizada a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (PCR em tempo real, PCR quantitativa ou qPCR). Essas etapas foram realizadas na empresa Neopropecta, sob supervisão da doutoranda Aline Sereia e da mestranda Patricia Cunha.

3.5.1 Extração de DNA

A extração de DNA dos isolados bacterianos foi realizada utilizando-se a técnica de *beads* magnéticas, com um protocolo proprietário que está em segredo industrial (Neopropecta Microbiome Technologies, Florianópolis, SC, Brasil). O DNA foi quantificado utilizando-se o fluorímetro Qubit, com o kit dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen, Waltham, MA, EUA). Após quantificação o DNA foi diluído a 0,5ng/μl e armazenado a -20°C para as análises moleculares futuras.

3.5.2 Sequenciamento

Os isolados bacterianos foram identificados utilizando-se o sequenciamento de alto desempenho das regiões V3-V4 do gene 16S rRNA. O procedimento de preparo das bibliotecas seguiu protocolo proprietário, que está em segredo industrial (Neopropecta Microbiome Technologies, Florianópolis, SC, Brasil). Foi realizada a amplificação com os iniciadores específicos da região V3-V4 do gene rRNA 16S, 341F (5' CCTACGGGRSGCAGCAG 3'), e 806R (5' GGACTACHVGGGTWTCTAAT 3') (WHANG; QIAN, 2009; CAPORASO et al., 2012). As bibliotecas foram sequenciadas

utilizando-se o equipamento MiSeq *Sequencing System* (Illumina Inc. San Diego, CA, USA) e o kit V2, com 300 ciclos e sequenciamento *single-end*. As sequências foram analisadas por meio de um *pipeline* proprietário, que está em segredo industrial, intitulado Sentinel (Neopropecta Microbiome Technologies, Florianópolis, SC, Brasil). Resumidamente, todas as sequências de DNA resultantes do sequenciamento passaram, individualmente, por um filtro de qualidade, utilizando como base o somatório das probabilidades de erro de suas bases, permitindo no máximo 1% de erro acumulado. Posteriormente, foram removidas as sequências de DNA que correspondam aos adaptadores da tecnologia Illumina por meio de métodos biocomputacionais. As sequências que passaram pelos procedimentos iniciais e que tiveram 100% de identidade foram agrupadas em filotipos/*cluster* e foram utilizadas para identificação taxônomica, por comparação com banco de dados de sequências acuradas de 16S rRNA (NeoRef, Neopropecta).

3.5.3 Detecção do gene *mecA*, *vanA* e *vanB*

Os genes de resistência *mecA*, *vanA* e *vanB* foram identificados utilizando-se a técnica de PCR em tempo real (qPCR) com sondas de hidrólise e iniciadores específicos. As reações de qPCR foram realizadas em um volume final de 10µl contendo 1µl (0,5ng) de DNA e 9µl de Master Mix 1X (sondas marcadas: HEXTM e FAMTM; referência passiva: ROXTM; iniciadores *forward* e *reverse*). Um controle negativo e um controle positivo para cada gene de resistência foi incluído em cada ensaio de qPCR. As amostras e controles foram analisadas em triplicata técnica. As reações de qPCR foram realizadas no equipamento ABI 7500 *Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), com as seguintes condições de amplificação: 95°C por 10 minutos, seguido de 35 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos. De acordo com o *threshold* pré-estabelecido, foram consideradas positivas as amostras com $Cq \leq 33,0$. O protocolo citado é proprietário e está em segredo industrial (Neopropecta Microbiome Technologies, Florianópolis, SC, Brasil).

3.6 Padronização da metodologia de MALDI-TOF/MS para análise das cepas de MRS e VRE

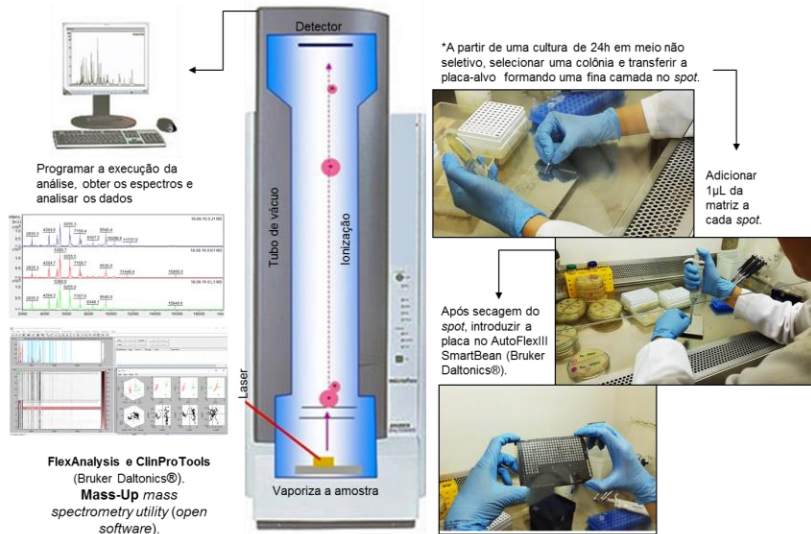
No processo de padronização da metodologia para *Staphylococcus* spp. e *Enterococcus* spp. foi utilizado primeiramente o protocolo descrito por Østergaard, Hansen e Møller (2015) visando a obtenção de espectros de massas na faixa de m/z 2.000-20.000 em modo positivo.

Os espectros foram obtidos com o equipamento AutoFlexIII SmartBean (Bruker Daltonics®). Foi feito a calibração interna do equipamento com um mix de calibrantes: *Protein Calibration Standard I* e *Peptide Calibration Standard II* (Bruker Daltonics®).

3.6.1 Preparo das amostras

As bactérias foram avaliadas pelo método de análise direta da colônia ou *whole cell* (ØSTERGAARD; HANSEN; MØLLER, 2015). As amostras foram inoculadas em ágar TSA (*Trypticase Soy Agar*) a 37°C por 18-24h. Como se demonstra na figura 4, uma quantidade pequena da colônia foi transferida até cobrir o *spot* da placa (MTP 384 Polished Stell TF Targets, Bruker Daltonics®). Foi acrescentado 1µL de solução de matriz [solução saturada de ácido α -ciano-4-hidroxi-cinâmico (CHCA) em acetonitrila 50% com ácido trifluoroacético 2,5%] e em seguida as amostras foram secas na capela de fluxo laminar. Para todas as amostras foram feitas de duas a três replicatas biológicas e três replicatas técnicas.

Figura 4: Esquema da técnica de MALDI-TOF/MS para análise microbiana utilizando o método direto.



Legenda: O símbolo "*" indica o primeiro passo. Fonte: desenvolvido pela autora.

3.6.2 Aquisição dos espectros e análise de dados

Após a primeira avaliação com as cepas-padrão e as cepas controle, os espectros foram obtidos utilizando uma modificação do protocolo supracitado descrito por Østergaard, Hansen e Møller (2015), a saber: os íons positivos obtiveram-se utilizando uma frequência do laser de 60Hz no modo linear com amplitude de massa de 2.000 a 20.000 Da e uma somatória de 240 disparos (*satisfactory shots*), divididos em 6 etapas de 40 disparos.

O espectro adquirido foi importado para o programa FlexAnalysis versão 3.4 (Bruker Daltonics®) para o seu pré-processamento: suavização ou *smoothing*, subtração da linha de base ou *baseline subtraction* e calibração interna do espectro de massas (WOLTERS et al., 2011). Além disso, os espectros foram exportados em formatos mzXML, CSV e FASTA para ter compatibilidade com outros programas.

O programa ClinProTools versão 3.0 (Bruker Daltonics®) foi utilizado para uma inspeção visual dos espectros, Análise de Componentes Principais (PCA), construção de um dendograma de similaridade (distância euclidiana) e para a apresentação visual dos espectros em forma de gel virtual ao longo desse trabalho.

O programa Mass-Up (LÓPEZ-FERNÁNDEZ et al., 2015) é um sistema aberto que integra múltiplas plataformas incluindo o *smoothing* e o *baseline substration* que foi feito no FlexAnalysis versão 3.4 (Bruker Daltonics®). Os espectros foram importados em formato mzXML e categorizados como *unlabeled*, logo depois foram realizados:

O pré-processamento dos espectros brutos para obter a lista de picos (i) *smoothing* (Savitzki Golay), (ii) *baseline correction* (TopHat) e (ii) *peak detection* (MALDIQuant).

O *Peak Matching* usando o algoritmo *forward*, que ajudou a reduzir as seis ou mais replicatas de cada amostra a um espectro consenso; com a finalidade de diminuir a variabilidade dos dados e permitir a comparação entre as amostras. Este passo foi realizado em duas condições: utilizando a lista de picos completa ou eliminando os picos com intensidade menor a 250. Esse tipo de filtro de intensidade é habitual para eliminar o ruído do equipamento. Na figura 5, pode-se visualizar o processo de *peak matching* no Mass-Up.

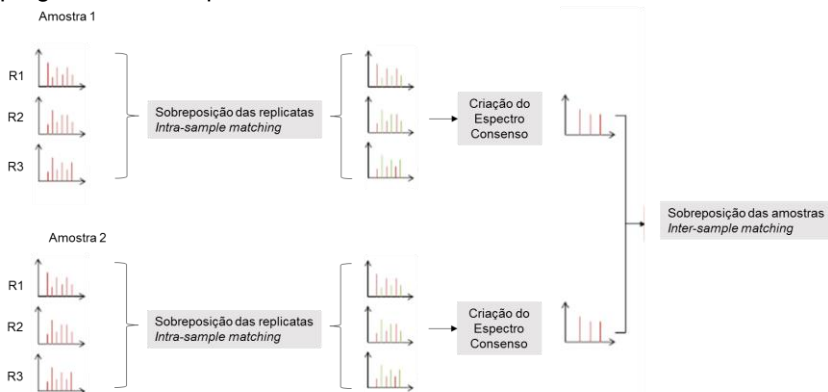
O *Intermatching Biomarker Discovery* foi utilizado para gerar tabelas comparativas de presença e ausência de picos entre isolados. Foi analisado manualmente para identificar picos que estão presentes na maioria dos isolados (*standard peaks*) e procurar picos que poderiam discriminar grupos entre os isolados (*marker peaks*) (ØSTERGAARD; HANSEN; MØLLER, 2015).

O *Hieralquical Clustering* foi utilizado para gerar dendogramas.

Nas etapas onde são analisadas um grande número de amostras, todos os dendogramas de agrupamento hierárquico foram realizados no programa Mass-Up. Assim podemos analisar um grande número de dados ao mesmo tempo, considerando todas as replicatas técnicas e biológicas, e contar com

plataformas para a detecção de picos com potencial biomarcador.

Figura 5: Representação do processo de sobreposição de espectros no programa Mass-Up.



Fonte: Adaptado de LÓPEZ-FERNÁNDEZ et al. (2015).

3.6.3 Análise dos dados

A partir da lista de picos obtidos no FlexAnalysis versão 3.4 (Bruker Daltonics®) em formato FASTA, foi feita uma comparação com as proteínas armazenadas na base de dados desenvolvida no laboratório de Bioinformática-MIP/CCB/UFSC pelo Prof Dr Glauber Wagner.

- Base de dados

Para o desenvolvimento da base de dados de proteínas foi utilizado um total de 949 proteínas para *S. aureus* ATCC 25.923 e 859 proteínas para *E. faecalis* ATCC 29.212 que foram depositadas no banco de dados do GenBank, NCBI – National Center for Biotechnology Information, até novembro/2016.

- Identificação de proteínas

Por meio de análises de bioinformática, com um *script in house*, foi removida a massa molecular da metionina do domínio N-terminal das proteínas (MOURA et al., 2008) que corresponde a 131.000 Da e a massa do próton adquirido, na etapa da vaporização do MALDI-TOF, que corresponde a 1 Da. Após isso,

foram comparados os picos observados (m/z menos 1Da) com as massas moleculares das proteínas considerando uma diferença de ± 3 Da e modificações pós-traducionais como a oxidação da metionina que eleva a massa em 16 Da (MOURA et al., 2015). Em seguida, a lista de possíveis proteínas para cada pico foi visualizada manualmente com o objetivo de curar os dados eliminando as proteínas parciais ou hipotéticas. Essa etapa foi feita com ajuda do bolsista Junior Souza do laboratório de Bioinformática-MIP/CCB/UFSC, sob supervisão do Prof Dr Glauber Wagner.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

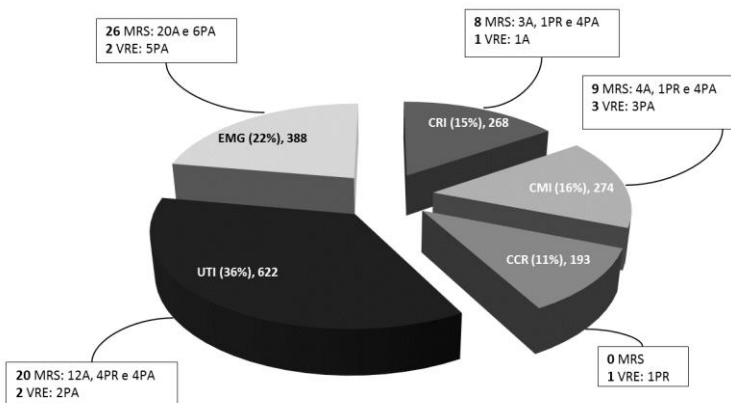
Nos hospitais, os reservatórios contínuos e dinâmicos de agentes infecciosos e resistentes do grupo dos cocos Gram positivos são representados pelos pacientes colonizados, profissionais da saúde e o ambiente hospitalar. *Staphylococcus* spp., principalmente *S. aureus*, e *Enterococcus* spp., têm se destacado como importantes patógenos oportunistas causadores de infecções nosocomiais devido a sua habilidade de adquirir e/ou transmitir genes de virulência e de resistência aos antimicrobianos e por sua alta capacidade de sobreviver nas superfícies por elevados períodos de tempo. Devido a essas características são capazes de disseminar e produzir surtos.

Tendo em vista a importância do conhecimento do papel do ambiente hospitalar, dos profissionais da saúde e dos pacientes em carrear e transmitir microrganismos resistentes associados a infecções, e a necessidade de desenvolvimento de métodos mais práticos e viáveis para diagnóstico microbiológico e estudos epidemiológicos, o presente projeto realizou a análise de perfis proteicos para tipagem de *Staphylococcus* spp. resistentes à meticilina (MRS) e de *Enterococcus* resistentes à vancomicina (VRE) no HU/UFSC.

4.1 Identificação fenotípica e genotípica das amostras

Na figura 6 pode-se observar a distribuição espacial das amostras de MRS e VRE identificados neste trabalho.

Figura 6: Distribuição espacial dos isolados de MRS e VRE identificados.



Legenda: A porcentagem do gráfico está em função do total de amostras coletadas em cada unidade hospitalar durante o trabalho (N total=1745). Cada quadrado representa a distribuição das amostras de MRS e VRE por pontos de coleta, sendo que A, PR e PA representam ambiente, profissionais da saúde e pacientes, respectivamente. As porcentagens nos quadros estão em função do $N_{MRS}=63$ e $N_{VRE}=12$. Fonte: desenvolvida pela autora.

4.1.1 *Staphylococcus* spp. resistentes à meticilina (MRS)

Na tabela 3 pode-se visualizar os isolados de MRS obtidos a partir da semeadura dos 1.745 swabs, com suas respectivas descrições, além dos nove isolados clínicos.

Foram obtidos 72 isolados de MRS, dentre os quais, 39 (54%) foram isoladas do ambiente hospitalar, 27 (37,5%) dos pacientes e 6 (8,5%) dos profissionais da saúde. Alguns trabalhos mostram que a taxa de sobrevivência de isolados MRSA, sob condições típicas do hospital, varia entre sete dias a mais de 12 meses, mostrando uma ligação entre a contaminação do ambiente hospitalar e o aumento das IRAS (OTTER; YEZLI; FRENCH, 2011; CHEMALY et al., 2014).

Dos 72 isolados, somente 42 foram submetidos à identificação por sequenciamento do gene 16S rRNA e à

detecção do gene *mecA*, devido às limitações financeiras do projeto. As 42 amostras foram escolhidas aleatoriamente, exceto pelas nove amostras isoladas de pacientes pelo setor de Microbiologia do Laboratório de Análises Clínicas do HU/UFSC que foram todas incluídas.

Tabela 3: Isolados hospitalares de MRS identificados (N=72)

Isolado Hospitalar	16S rRNA	mecA	Halo de colofitina (mm)	Coleta (mês/ano)	Unidade Hospitalar	Ponto de coleta	Sítio de Coleta
MRSA 1	<i>S. aureus</i>	Positivo	-	2015	UTI	Paciente	Secreção Traquetal
MRSA 2	<i>S. aureus</i>	Positivo	-	2015	UTI	Paciente	Secreção Traquetal
MRSA 3	<i>S. aureus</i>	Positivo	-	2015	UTI	Paciente	Secreção Traquetal
MRSA 4	<i>S. aureus</i>	Positivo	-	2016	Emergência	Paciente	Hemocultura
MRSA 5	<i>S. aureus</i>	Positivo	-	2016	UTI	Paciente	Secreção Traquetal
MRSA 6	<i>S. aureus</i>	Positivo	-	2016	Centro Cirúrgico	Paciente	Outros materiais
MRSA 7	<i>S. aureus</i>	Positivo	-	2016	Emergência	Paciente	Hemocultura
MRSA 8	<i>S. aureus</i>	Positivo	-	2016	Emergência	Paciente	Escarro
MRSA 9	<i>S. aureus</i>	Positivo	-	2015	Ambulatorio	Paciente	Secreção Traquetal
MSSA 10	<i>S. aureus</i>	Negativo	23	Abril, 2015	UTIB	Profissional	Celular
MRS 11	<i>S. epidermidis</i>	Positivo	6	Maio, 2015	CMi	Paciente	Mãos
MRSW 12	<i>S. warneri</i>	Positivo	6	Maio, 2015	UTB	Posto de Enfermagem	Bancada/Computador/Telefone
MRSW 13	<i>S. warneri</i>	Positivo	6	Junho, 2015	UTA	Profissional	Celular
MRSW 14	<i>S. warneri</i>	Positivo	18	Junho, 2015	UTA	Leito	Monitores
MRSW 15	<i>S. warneri</i>	Positivo	6	Junho, 2015	UTB	Profissional	Jaleco
MRSC 16	<i>S. capitis</i>	Positivo	6	Junho, 2015	UTB	Leito	Grades do Leito
MRS 17	<i>S. haemolyticus</i>	Positivo	16	Junho, 2015	EMG	Leito	Grades do Leito
MRSA 18	<i>S. aureus</i>	Positivo	6	Julho, 2015	CRi	Paciente	Nasal
MRS 19	<i>S. haemolyticus</i>	Positivo	6	Julho, 2015	CMi	Paciente	Swab Retal
MRS 20	<i>S. haemolyticus</i>	Positivo	6	Julho, 2015	CMi	Paciente	Nasal
MRSC 21	<i>S. capitis</i>	Positivo	6	Julho, 2015	CMi	Equipamentos de Uso Comum	Glicosímetro
MRS 22	<i>S. haemolyticus</i>	Positivo	6	Julho, 2015	UTB	Paciente	Nasal
MRS 23	<i>S. haemolyticus</i>	Positivo	6	Agosto, 2015	EMG	Leito	Grades do Leito
MRSA 24	<i>S. aureus</i>	Positivo	14	Agosto, 2015	EMG	Sala de Procedimentos Especiais	Jaleco
MSSG 25	<i>S. sciuri</i>	Negativo	19	Agosto, 2015	CRi	Profissional	Mãos
MRS 26	<i>S. haemolyticus</i>	Positivo	20	Setembro, 2015	CRi	Leito	Grades do Leito
MRS 27	<i>S. haemolyticus</i>	Positivo	6	Setembro, 2015	CMi	Sala de Repouso de Enfermagem	Camã/Mesa/Cadeiras
MRS 28	<i>S. haemolyticus</i>	Positivo	17	Setembro, 2015	UTB	Equipamentos de Uso Comum	Carrinho da Roupa de Banho
MSSA 29	<i>S. aureus</i>	Negativo	6	Setembro, 2015	UTB	Equipamentos de Uso Comum	Raio X
MRS 30	<i>S. haemolyticus</i>	Positivo	15	Setembro, 2015	EMG	Leito	Grades do Leito
MRS 31	<i>S. haemolyticus</i>	Positivo	6	Setembro, 2015	EMG	Banheiro de Paciente	Dispenser/Torneira/Descarga
MRS 32	<i>S. ciuri</i>	Positivo	17	Setembro, 2015	EMG	Sala de Procedimentos Especiais	Leito
MRSC 33	<i>S. ciuri</i>	Positivo	9	Setembro, 2015	EMG	Consultório	Maca
MRS 34	<i>S. haemolyticus</i>	Positivo	12	Setembro, 2015	EMG	Recepção	Cadeiras
MRSC 35	<i>S. sciuri</i>	Positivo	15	Outubro, 2015	CRi	Leito	Banheiro: Dispenser/Torneira/Descarga
MRS 36	<i>S. haemolyticus</i>	Positivo	16	Outubro, 2015	EMG	Leito	Grades do Leito
MRSA 37	<i>S. aureus</i>	Positivo	6	Novembro, 2015	UTA	Profissional	Jaleco
MRS 38	<i>S. saprophyticus</i>	Positivo	6	Novembro, 2015	UTA	Paciente	Nasal
MRSC 39	<i>S. sciuri</i>	Positivo	6	Novembro, 2015	UTB	Equipamentos de Uso Comum	Poltrona de Fisioterapia
MRSC 40	<i>S. sciuri</i>	Positivo	18	Dezembro, 2015	CMi	Profissional	Jaleco
MRSC 41	<i>S. sciuri</i>	Positivo	12	Dezembro, 2015	UTA	Sala de Repouso de Enfermagem	Camã/Mesa/Cadeiras
MRS 42	<i>S. haemolyticus</i>	Positivo	10	Janeiro, 2016	UTB	Leito	Termômetro
MRS 43			6	Julho, 2015	EMG	Paciente	Mãos
MRS 44			6	Abril, 2015	EMG	Posto de Enfermagem	Bancada/Computador/Telefone
MRS 45			15	Agosto, 2015	CMi	Equipamentos de Uso Comum	Glicosímetro
MRS 46			22	Agosto, 2015	EMG	Paciente	Nasal
MRS 47			20	Agosto, 2015	EMG	Banheiro de Paciente	Dispenser/Torneira/Descarga
MRS 48			24	Agosto, 2015	EMG	Sala de Medicação	Poltrona
MRS 49			15	Agosto, 2015	EMG	Consultório	Mesa de Computador
MRS 50			15	Outubro, 2015	UTA	Paciente	Swab Retal
MRS 51			6	Outubro, 2015	EMG	Paciente	Swab Retal
MRS 52			6	Outubro, 2015	EMG	Leito	Suporte de Sono
MRS 53			21	Outubro, 2015	EMG	Banheiro de Paciente	Dispenser/Torneira/Descarga
MRS 54			12	Outubro, 2015	EMG	Posto de Enfermagem	Bancada/Computador/Telefone
MRS 55			7	Novembro, 2015	EMG	Paciente	Swab Retal
MRS 56			6	Novembro, 2015	EMG	Banheiro de Paciente	Dispenser/Torneira/Descarga
MRS 57			6	Novembro, 2015	EMG	Consultório	Maca
MRS 58			6	Dezembro, 2015	CRi	Paciente	Swab Retal
MRS 59			6	Dezembro, 2015	CRi	Paciente	Nasal
MRS 60			6	Dezembro, 2015	CRi	Paciente	Nasal
MRS 61			6	Dezembro, 2015	EMG	Sala de Procedimentos Especiais	Leito
MRS 62			6	Janeiro, 2016	CMi	Leito	Banheiro: Dispenser/Torneira/Descarga
MRS 63			6	Fevereiro, 2016	UTA	Leito	Grades do Leito
MRS 64			6	Fevereiro, 2016	UTB	Paciente	Swab Retal
MRS 65			6	Março, 2016	CRi	Sala de Repouso de Enfermagem	Camã/Mesa/Armadios
MRS 66			17	Março, 2016	CMi	Paciente	Swab Retal
MRS 67			6	Março, 2016	UTA	Leito	Grades/Leito
MRS 68			6	Março, 2016	UTB	Leito	Monitores
MRS 69			17	Março, 2016	UTB	Equipamentos de Uso Comum	Carrinho da Roupa de Banho
MRS 70			6	Março, 2016	EMG	Paciente	Swab Retal
MRS 71			19	Março, 2016	EMG	Paciente	Mãos
MRS 72			6	Março, 2016	EMG	Recepção	Cadeiras

Fonte: desenvolvida pela autora.

O sequenciamento conseguiu distinguir os *Staphylococcus* spp., levando em consideração o maior número de sequências encontrado para cada amostra. Das 42 amostras, catorze eram *S. aureus*, treze *S. haemolyticus*, sete *S. sciuri*,

quatro *S. warneri*, dois *S. capitis*, um *S. epidermidis* e um *S. saprophyticus*.

Já foi demonstrado em pesquisas de colonização nasal que 40-50% dos isolados nas triagens com ágar manitol salgado enriquecido com oxacilina correspondem a MRS fermentadores de manitol, incluindo *S. haemolyticus*, *S. sciuri*, *S. hominis*, *S. cohnii*, *S. warneri*, *S. saprophyticus* e *S. epidermidis* (SHITTU et al., 2006). Também *S. capitis* é considerado fermentador de manitol (SCHLEIFER; BELL, 2009).

Devido a emergência dos *Staphylococcus* coagulase negativa como patógenos e reservatório de resistência a antimicrobianos, a identificação do gênero e espécie tem exigido o uso de técnicas confiáveis como o sequenciamento do amplicon do gene 16S RNA ribossomal (SRINIVASAN et al., 2015; MANAKA; TOKUE; MURAKAMI, 2017). No entanto, a abordagem de leitura curta por sequenciamento de segunda geração introduz vieses dependendo de quais regiões são empregadas e, dependendo da comunidade bacteriana estudada, não fornece resolução efetiva abaixo do nível do gênero bacteriano (D'AMORE et al., 2016; WAGNER et al., 2016). O gene 16S rRNA possui nove regiões hipervariáveis (V1-V9) de diferentes tamanhos, sendo as regiões V2 e V3 mais adequadas para diferenciar todas as espécies bacterianas a nível de gênero e V1 para distinguir entre *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* coagulase negativa. Para melhorar esse desempenho há estudos que padronizaram o sequenciamento das regiões V1-V3 utilizando a plataforma MiSeq®System (Illumina®) (CHAKRAVORTY et al., 2007; CHEN et al., 2014; ZHENG et al., 2015). Em contrapartida, foi demonstrado que é possível obter resultados comparáveis usando regiões mais curtas como é o caso das regiões V3 e V4 que foram utilizadas nesse estudo (SOERGEL et al., 2012; D'AMORE et al., 2016). A recomendação é o sequenciamento de outros genes, como o *rpoB* ou *sdoA* (POYART et al., 2001; DRANCOURT; RAOULT, 2002), quando houver dificuldades com a identificação utilizando o marcador 16S rDNA.

Foi pesquisado por qPCR o gene *mecA* para caracterizar a resistência à meticilina/oxacilina presente nos isolados. Assim, foi feita a confirmação da presença do gene *mecA* nos oito controles de MRSA, com 100% de positividade. Das 42 amostras estudadas, o gene *mecA* foi detectado em 39 (93%).

Dos catorze isolados de *S. aureus*, doze foram *mecA* positivos. A frequência de MRSA tem apresentado um crescimento contínuo em hospitais brasileiros, representando cerca de 30% a 35% de todos os isolados clínicos, onde os pacientes infectados ou colonizados são o reservatório principal e a forma de transmissão mais comum foi pelas mãos dos profissionais de saúde (BREVES et al., 2015). Entretanto, o estado de Santa Catarina tem apresentado uma notável baixa prevalência comparado com outros estados do Brasil (SILVEIRA et al., 2015a).

Dos catorze isolados de *S. aureus*, dois foram *mecA* negativos. Um deles, como esperado, possui um halo de inibição à cefoxitina de 23mm, portanto sensível à oxacilina segundo as recomendações do CLSI. O outro isolado, curiosamente, possui um halo de inibição à cefoxitina de 6mm, que segundo o CLSI, é considerado resistente à oxacilina (Tabela 2), descartando a presença de um *S. aureus mecA* positivo sensível a oxacilina (OS-MRSA). Estudos recentes sobre OS-MRSA no Brasil, em Recife-Pernambuco, tem sugerido a uma ampla distribuição dessas cepas em ambiente hospitalar (ANDRADE-FIGUEIREDO; LEAL-BALBINO, 2016). O fato desse segundo isolado não ter apresentado o gene *mecA*, mas ter sido considerado resistente à oxacilina, sugere que essa cepa pode apresentar outro gene que confere a resistência, como o *mecC* que não foi abordado nesse trabalho. No entanto, no Brasil ainda não foi reportado nenhum caso de MRSA com o homólogo *mecC* em humanos ou animais (FIGUEIREDO; FERREIRA, 2014; DOS SANTOS et al., 2016). Estudos recentes no Brasil, no estado de Rondônia, tem sido descrito isolados *mecA* negativos de MRSA e MRS, tanto em amostras de origem animal como de origem hospitalar, e após estudos das relações genéticas dos isolados, sugerem que foram transportadas, via contato com alimentos, a partir dos profissionais da saúde ou pacientes (PIERI et al., 2016). Vale ressaltar que, embora o primeiro isolado *mecA* negativo tenha sido considerado sensível ao teste de difusão com cefoxitina,

alguns estudos recentes apontam que isolados *mecC* positivos poderiam passar como MSSA (PATERSON; HARRISON; HOLMES, 2014; MILHEIRIÇO; DE LENCASTRE; TOMASZ, 2017).

Das 42 amostras que foram sequenciadas, 28 representam o grupo dos *Staphylococcus* spp. coagulase negativa (SCoN), das quais, 27 foram *mecA* positivos, o que corresponde a 96%. De fato, sabe-se que esse gene está amplamente disseminado entre SCoN resistentes à metilicina (NAHAEI et al., 2015). De maneira interessante, no nosso trabalho, o isolado *mecA* negativo e resistente à oxacilina, isolado de uma amostra das mãos de um profissional da saúde, corresponde a *S. sciuri*. Já há relatos no Brasil de divergências genômicas entre os genes *mecA* amplificados no grupo dos *Staphylococcus* spp. coagulase negativa, incluindo a espécie *S. sciuri*, originando dois grupos diferentes: aqueles isolados de humanos, equinos, roedores, gatos e cães e outro apenas dos isolados de bovinos (CALAZANS-SILVA et al., 2014). Portanto, pode ser que o *mecA* presente no *S. sciuri* do profissional da saúde seja uma divergência genômica e, dessa forma, não possa ser detectado pelos iniciadores tradicionais utilizados. Por outro lado, assim como para o caso do *S. aureus* discutido acima, pode ser que a resistência seja devida à presença de outro gene, como o gene *mecC* (HARRISON et al., 2014).

4.1.2 *Enterococcus* spp. resistentes à vancomicina (VRE)

Na tabela 4 encontra-se a descrição dos isolados de VRE obtidos a partir da semeadura dos 1.745 *swabs*, com suas respectivas descrições, além dos cinco isolados clínicos.

Dos 17 isolados de VRE, 15 foram isolados dos pacientes, principalmente dos *swabs* retais, um da bancada do posto de enfermagem e um das mãos de um profissional da saúde. Destaca-se um paciente da Emergência no qual foi isolado o VRE do *swab* retal, do *swab* das mãos e do *swab* nasal.

Todos os 17 isolados de VRE foram sequenciados e submetidos à pesquisa dos genes *vanA* e *vanB*.

Assim como no caso dos MRS, foi levado em consideração o maior número de sequências encontrado para cada amostra. Dos 17 isolados hospitalares de VRE, todas as amostras foram identificadas como *E. faecium* com exceção de uma amostra que não foi possível fazer a identificação pelo 16S rRNA. Durante a etapa de extração do DNA, tivemos dificuldades para processar as amostras devido a consistência das colônias e ao tamanho das mesmas. O VRE 3 (Tabela 4) foi identificado pelo sistema Vitek 2® como *E. faecium* no laboratório de Microbiologia do HU/UFSC.

Tabela 4: Isolados hospitalares de VRE obtidos neste estudo (n=17).

Correspondência	16S rRNA	vanA	Coleta (mês/ano)	Unidade Hospitalar	Ponto de coleta	Sítio de Coleta
VRE 1	<i>E. faecium</i>	Positivo	2016	UTI	Paciente	Urina
VRE 2	<i>E. faecium</i>	Positivo	2016	UTI	Paciente	Hemocultura
VRE 3	NI*	Negativo	2015	CMI	Paciente	Swab Retal
VRE 4	<i>E. faecium</i>	Positivo	2015	EMG	Paciente	Hemocultura
VRE 5	<i>E. faecium</i>	Positivo	2015	UTI	Paciente	Swab Retal
VRE 6	<i>E. faecium</i>	Positivo	2016	CRI	Posto de Enfermagem	Bancada/Computador/Telefone
VRE 7	<i>E. faecium</i>	Positivo	Julho, 2015	CMI	Paciente	Swab Retal
VRE 8	<i>E. faecium</i>	Positivo	Julho, 2015	CMI	Paciente	Swab Retal
VRE 9	<i>E. faecium</i>	Positivo	Agosto, 2015	EMG	Paciente	Swab Retal
VRE 10	<i>E. faecium</i>	Positivo	Agosto, 2015	EMG	Paciente	Mãos
VRE 11	<i>E. faecium</i>	Positivo	Agosto, 2015	EMG	Paciente	Nasal
VRE 12	<i>E. faecium</i>	Positivo	Agosto, 2015	EMG	Paciente	Mãos
VRE 13	<i>E. faecium</i>	Positivo	Outubro, 2015	EMG	Paciente	Nasal
VRE 14	<i>E. faecium</i>	Positivo	Outubro, 2015	CMI	Paciente	Swab Retal
VRE 15	<i>E. faecium</i>	Positivo	Novembro, 2015	CC	Profissional	Mãos
VRE 16	<i>E. faecium</i>	Positivo	Dezembro, 2015	UTIB	Paciente	Swab Retal
VRE 17	<i>E. faecium</i>	Negativo	Junho, 2015	UTIA	Paciente	Swab Retal

Legenda: O "NI" significa amostra não identificada pela metodologia 16S rRNA. E o "*" indica que essa amostra foi identificada pelo sistema Vitek 2® como *E. faecium* no laboratório de Microbiologia do HU/UFSC. Fonte: desenvolvida pela autora.

E. faecium e *E. faecalis* possuem uma elevada semelhança na sequência do 16S rRNA, apresentando 97,3% de similaridade (PATEL et al., 1998). Dessa forma, é possível que a nossa metodologia não consiga diferenciar de forma precisa essas duas espécies. Há estudos que demonstraram boa discriminação a nível de espécie utilizando a sequência completa do 16S rRNA (SRINIVASAN et al., 2015). No caso de dificuldades com a identificação utilizando as regiões hipervariáveis V3 e V4, a recomendação é a utilização de outros marcadores, como a sequência *groESL* (TSAI et al., 2005). Por isso, para estudos futuros com esse gênero bacteriano é

interessante a utilização da sequência completa do 16S rRNA ou de outros marcadores.

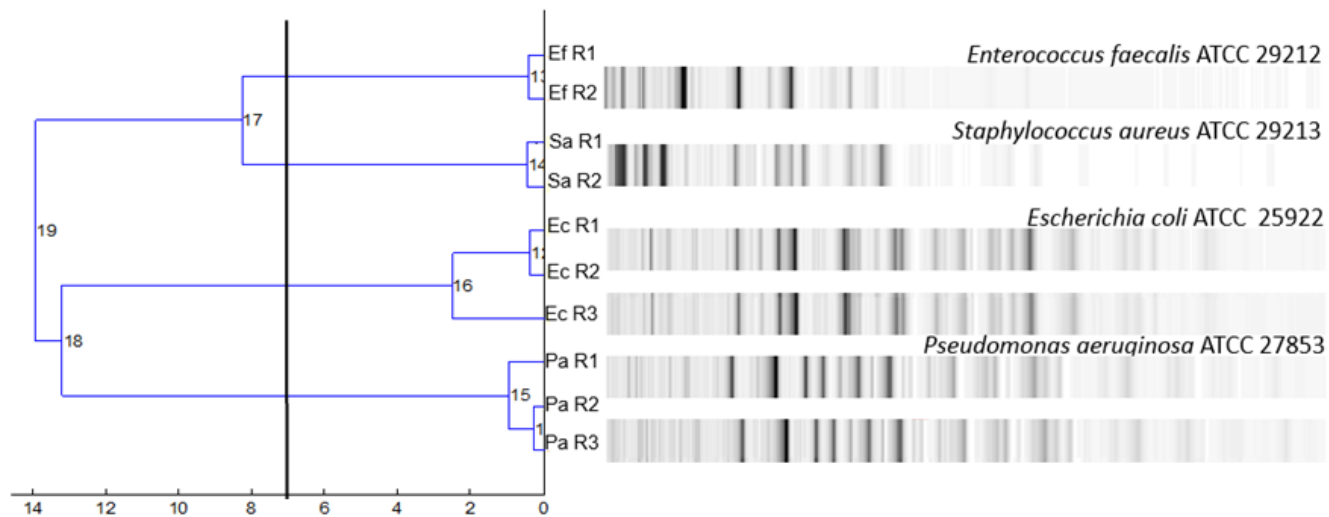
Foi pesquisado, primeiramente, o gene *vanA* dos 17 isolados hospitalares em estudo e foi detectado em 15 (88%). A mesma amostra que não foi identificada pelo sequenciamento, não amplificou o gene *vanA* na qPCR; a nossa suspeita inicial foi que tivemos um problema na extração do DNA, o procedimento foi repetido, e mesmo assim não foi possível obter resultado. Logo, o gene *vanB* não foi amplificado pelos 17 isolados hospitalares, sendo assim, correspondem a *E.faecium vanA* positivas/*vanB* negativas.

4.2 MALDI-TOF/MS

4.2.1 MALDI-TOF para identificação interespecífica

Para definir os critérios de diferenciação mínimos para bactérias de diferentes gêneros, a padronização da metodologia foi feita comparando primeiramente as cepas: *S. aureus* ATCC 29.213, *E. faecalis* ATCC 29.212, *E. coli* ATCC 25.922 e *P. aeruginosa* ATCC 27.853. Na figura 7 pode-se visualizar uma representação em gel virtual dos *fingerprints* para cada cepa e o agrupamento hierárquico entre elas, gerados no programa ClinProTools. Considerando as cepas bem caracterizadas e a variabilidade inerente às replicatas, a menor diferença necessária para separação das espécies foi em torno de 3% de dissimilaridade dos perfis proteicos. Além disso, com aproximadamente 15% de dissimilaridade as espécies de cocos Gram positivos foram separadas das espécies de bacilos Gram-negativos. Assim, considerando uma margem de segurança para eventuais variabilidades técnicas, esta análise pode indicar que o melhor ponto de corte para separação interespecífica com o protocolo proposto seja em torno de 5% de dissimilaridade (95% de similaridade).

Figura 7: Dendograma resultante da análise de agrupamento hierárquico entre as cepas-padrão de diferentes espécies por MALDI-TOF.



Legenda: O dendrograma criado mostra os agrupamentos calculados a partir dos espectros (eixo y) e a distância euclidiana ou a medida de dissimilaridade entre os agrupamentos (eixo x). Os números nos ramos indicam o *bootstrap value* e corresponde ao grau de confiança que temos na estrutura do dendrograma (UEDA et al., 2015). Os cinco padrões estão representados com o número de replicatas técnicas (R1, R2, R3), sendo, *Enterococcus faecalis* Ef, *Staphylococcus aureus* Sa, *Escherichia coli* Ec e *Pseudomonas aeruginosa* Pa. A linha vertical representa a menor diferença para separação das espécies. Fonte: desenvolvida pela autora.

Posteriormente utilizamos as análises estatísticas do ClinProTools para identificar picos com potência aparentemente alta para separar as quatro classes que diferenciaram as espécies. Para isso o programa gerou uma tabela com o valor médio da relação entre área/intensidade do pico para a classe (Ave), e esses valores foram, posteriormente analisados pelos testes estatísticos (PTTA, PWKW e PAD). O teste estatístico calcula um valor de p do teste ANOVA (PTTA) para cada pico, que corresponde a uma medida da probabilidade de que exista uma associação entre as diferentes classes; mas a potência do valor do p depende, principalmente, da quantidade de classes, da distribuição normal/anormal dos dados e do número de amostras para cada classe. O limite geralmente aceito dos valores de p, para considerar um resultado significativo, é de 0,05. Quanto mais baixo o valor p, maior será a potência do pico para diferenciar as quatro classes. O ClinProTools fornece uma lista de picos classificados de acordo com a significância estatística para diferenciar as classes, e no nosso trabalho o número de picos foi 91. Assim, a lista dos picos classificados, foi exportado em formato CSV e analisado manualmente no Microsoft Excel, considerando o valor de $p < 0,05$. No quadro 1 visualiza-se a lista de picos para cada classe que poderiam ser considerados para estudos futuros, note-se que os valores de PTTA estão no intervalo de 0,0005-0,02.

O valor de p do teste Anderson-Darling (PAD) fornece informações sobre a distribuição normal dos dados, sendo que o resultado para todos os picos das quatro classes foram valores

bem próximos a zero. Como utilizamos diferentes gêneros bacterianos espera-se ter dados não uniformemente distribuídos (PAD=0). Então para dados não uniformemente distribuídos é preferível a utilização do valor de p do teste Wilcoxon/Kruskal/Wallis (PWKW), que dá uma estimativa da probabilidade de que as diferenças de intensidade dos picos possam ser observadas ao acaso. Nesse caso, os valores de PWKW obtidos para os 20 picos de interesse foram $>0,05$, indicando que há probabilidade de que as diferenças de intensidade observadas dos picos individuais sejam coincidências (GRIFFIN et al., 2012). Portanto, para confirmar a capacidade dos picos de discriminar entre classes é necessário utilizar uma maior quantidade de amostras para cada classe e analisar com outros testes estatísticos, bem como outros modelos matemáticos de classificação do ClinProTools que não foram abordados nesse trabalho.

Quadro 1: Análises estatísticas do programa ClinProTools dos 20 picos de interesse das cepas-padrão.

Mass	DAve	PTTA	PWKW	PAD	Ave1	Ave2	Ave3	Ave4
4364.73	20.59	0.00458	0.0776	0.000574	21.16	4.36	4.56	0.57
5341.28	23.48	0.00048	0.0776	0.000113	23.68	3.97	0.21	1.37
5380.34*	54.08	0.00186	0.0797	5.15E-06	54.45	2.97	0.38	0.54
6314.22	20.59	0.0004	0.0776	0.0000232	20.75	0.16	1.79	2.44
9536.64	15.22	0.00136	0.0776	0.0000051	15.39	0.38	0.71	0.23
2057.36	21.3	0.00753	0.0776	0.0000812	0.59	21.4	1.04	0.1
3409.11	20.26	0.00423	0.0797	0.0000232	0.56	20.48	0.6	0.22
3450.32	161	0.00252	0.0857	0.0000161	0.53	161.6	0.92	0.68
3471.66	55.62	0.00136	0.0776	0.0000171	0.44	55.69	0.78	0.07
3488.13	67.51	0.00275	0.0776	0.0000194	0.38	67.59	0.59	0.08
4432.06*	30.72	0.0154	0.0776	0.012	1.62	30.95	18.62	0.23
5168.88	32.11	0.0132	0.0776	0.0000171	3.36	0.17	32.28	0.53
5209.48	69.63	0.00163	0.0776	5.15E-06	4.72	0.52	70.15	0.89
5736.23	17.06	0.00527	0.0776	5.15E-06	0.74	0.15	17.07	0.01
6045.5	14.27	0.0132	0.0776	0.0000051	0.27	0.48	14.34	0.07
6673.62	29.68	0.00739	0.0776	0.0000051	0.28	0.69	29.95	1.01
3006.22*	38.57	0.0159	0.0776	0.000593	1.38	0.38	0.9	36.78
5523.87	7.32	0.0159	0.0776	0.00152	0.26	0.13	0.58	7.36
6888.19	18.62	0.0173	0.0981	0.000872	0.95	0.68	1.33	17.29
6910.32	11.28	0.00556	0.0776	0.00952	0.09	0.02	2.2	8.44

Classe 1
Escherichia coli ATCC 25922

Classe 2
Enterococcus faecalis ATCC 29212

Classe 3
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

Classe 4
Staphylococcus aureus ATCC 29213

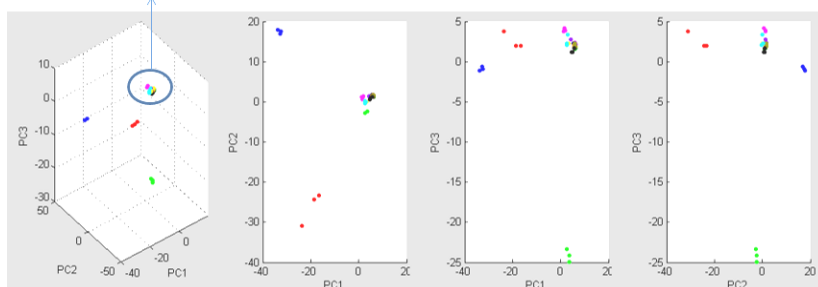
Legenda: O símbolo "*" indica aqueles picos que já foram descritos em outros estudos como marcadores da classe. Para a classe 1 e 2 (SANTOS et al., 2015) e para a classe 4 (JOSTEN et al., 2013). Mass, massa m/z (Da); DAve, diferença entre a média máxima e mínima da área/intensidade do pico para cada classe; PWKW, valor p de Wilcoxon

(todos foram $<0,1$); PAD, valor de p do teste de Anderson-Darling (intervalo de 0-1; 0, não uniformemente distribuído; 1, uniformemente distribuído); Ave, média de área/intensidade do pico da classe. Fonte: desenvolvido pela autora.

Além das quatro cepas-padrão foram testadas oito cepas-controle de *S. aureus* resistentes à meticilina com características bem definidas por outros marcadores (Tabela 1). A análise de componentes principais (PCA) no programa ClinProTools foi feita por meio de comparações entre os picos que contribuíram de forma mais significativa para a separação das classes. Na figura 8 pode-se observar que a análise mostrou uma distinção clara entre as quatro cepas-padrão e agrupou todas as cepas-controle de *S. aureus* resistentes à meticilina com o *S. aureus* ATCC 29.213, distinguindo claramente das outras espécies.

Figura 8: Análise de Componente Principal (PCA) das cepas-padrão e cepas-controle de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina

Staphylococcus aureus ATCC 29213 e Controles de MRSA



Legenda: Em verde, *Escherichia coli* ATCC 25.922; em azul, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27.853; em vermelho, *Enterococcus faecalis* ATCC 29.212. Fonte: desenvolvido pela autora.

4.2.2 MALDI-TOF para identificação intraespecífica

Um dos maiores problemas na caracterização de SCoN é a diferenciação a nível de espécie, já que as análises bioquímicas convencionais não são suficientemente específicas,

diferentemente do observado para *S. aureus*. Para avaliar se o protocolo de MALDI-TOF proposto pode auxiliar nesta identificação, analisamos os 33 isolados de SCoN que foram identificados por sequenciamento do 16S rRNA.

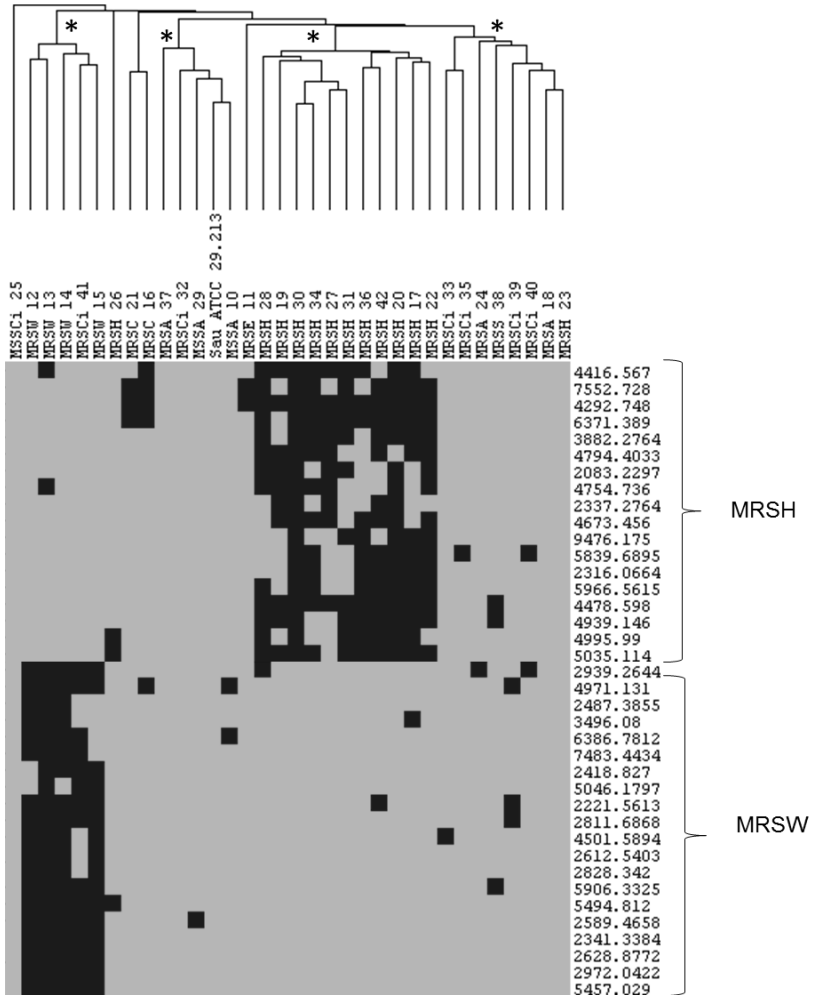
Para facilitar a interpretação dos resultados, utilizamos siglas indicando o resultado obtido na caracterização prévia dos isolados. Assim, entre os SCoN resistentes à oxacilina (MRSCoN) temos o *S. haemolyticus* (MRSH), *S. sciuri* (MRSCi), *S. warneri* (MRSW), *S. capitis* (MRSC), *S. epidermidis* (MRSE) e *S. saprophyticus* (MRSS). Além disso, uma cepa sensível à oxacilina, *S. sciuri* (MSSCi), também foi analisada.

Na análise de picos comuns obtivemos picos m/z que poderiam discriminar os isolados para 28 dos 33 isolados. Espécies representadas somente por 1 ou 2 isolados não apresentaram picos comuns, a saber: MRSC16 e 21, MRSE11 e MRSS38. Também o isolado MRSH42 não apresentou picos comuns ao seu agrupamento, podendo se tratar de um isolado variante ou mesmo um erro na identificação por sequenciamento. Nos demais isolados procuramos por picos presentes em SCoN e ausentes no *S. aureus* ATCC 29.213, de forma a selecionar possíveis marcadores específicos.

No dendograma da figura 9, pode-se visualizar quatro agrupamentos, sendo que a cepa sensível à metilicina não foi agrupada com o restante das cepas resistentes à metilicina. No quadro 2, podem ser observados os picos comuns a todos os isolados de cada agrupamento por espécie de SCoN, bem como a distribuição espacial e temporal dos isolados.

Considerando os picos exclusivos descritos no trabalho para cada espécie de *Staphylococcus* spp., fizemos a busca por picos comuns nos outros 30 isolados de SCoN, na tentativa de fazer a identificação da espécie baseada no método de MALDI-TOF desenvolvido (Figura 10). Para esta comparação foram escolhidos os isolados MRSA1, MRSA9, MRSA37, MRSCi35, MRSH27 e MRSW13. Note-se que esses isolados de SCoN, no dendograma da figura 9, fizeram parte dos *clusters* principais.

Figura 9: Dendrograma de 33 isolados MRS identificados pelo sequenciamento 16S rRNA.



Legenda: O símbolo "*" indica os agrupamentos dos MRS. Sendo os *S. haemolyticus* resistentes à meticilina (MRSH), *S. sciuri* resistentes à meticilina (MRSCi), *S. warneri* resistentes à meticilina (MRSW), *S.*

capitis resistentes à meticilina (MRSC), *S. epidermidis* resistentes à meticilina (MRSE), *S. saprophyticus* resistentes à meticilina (MRSS) e *S. sciuri* sensível à meticilina (MSSCi) Fonte: desenvolvido pela autora.

Quadro 2: Picos comuns aos agrupamentos por espécie de SCoN e distribuição espacial e temporal dos isolados.

Agrupamento por espécie	Picos comuns aos isolados do agrupamento	Código do isolado	Unidade Hospitalar	Localização da amostra	Ponto de coleta	Data da coleta
MRSCi	2455.2, 3782.9, 4306.7*, 4785.6	32	EMG	Ambiente	Leito	Setembro, 2015
		33	EMG	Ambiente	Maca	Setembro, 2015
		35	CRI	Ambiente	Banheiro	Outubro, 2015
MRSH	4292.7, 4478.6, 4517.6, 4754.4	17	EMG	Ambiente	Leito	Junho, 2015
		19	CMI	Paciente	Retal	Julho, 2015
		20	CMI	Paciente	Nasal	Julho, 2015
		22	UTI	Paciente	Nasal	Julho, 2015
		27	CMI	Ambiente	Cama/Mesa	Setembro, 2015
		28	UTI	Ambiente	Carrinho de roupa	Setembro, 2015
		30	EMG	Ambiente	Grades de leito	Setembro, 2015
		31	EMG	Ambiente	Maca	Setembro, 2015
		34	EMG	Ambiente	Cadeira	Setembro, 2015
		36	EMG	Ambiente	Grades de leito	Outubro, 2015
		42	UTI	Ambiente	Termômetro	Dezembro, 2015
MRSW	2205.4, 2221.6, 2341.3, 2589.6, 2612.5, 2628.9, 2788.8, 2811.7, 2828.2, 2900.6, 2923.4, 2939.2, 2972.0, 3607.5, 5457.0, 5494.8, 5906.3	12	UTI	Ambiente	Bancada	Maio, 2015
		13	UTI	Profissional	Celular	Junho, 2015
		14	UTI	Ambiente	Monitor	Junho, 2015
		15	UTI	Profissional	Jaleco	Junho, 2015

Legenda: O símbolo "*" indica que o pico também foi encontrado em *S. aureus*. Fonte: elaborado pela autora.

O dendograma da figura 10 mostra um agrupamento subdividido por espécie.

Sendo assim, o agrupamento obtido pode ser extrapolado à espécie bacteriana identificada pelo 16S rRNA (os picos sublinhados, $m/z \pm 3$, também foram encontrados no quadro 2 e na figura 10 e podem ser considerados espécie-específicos):

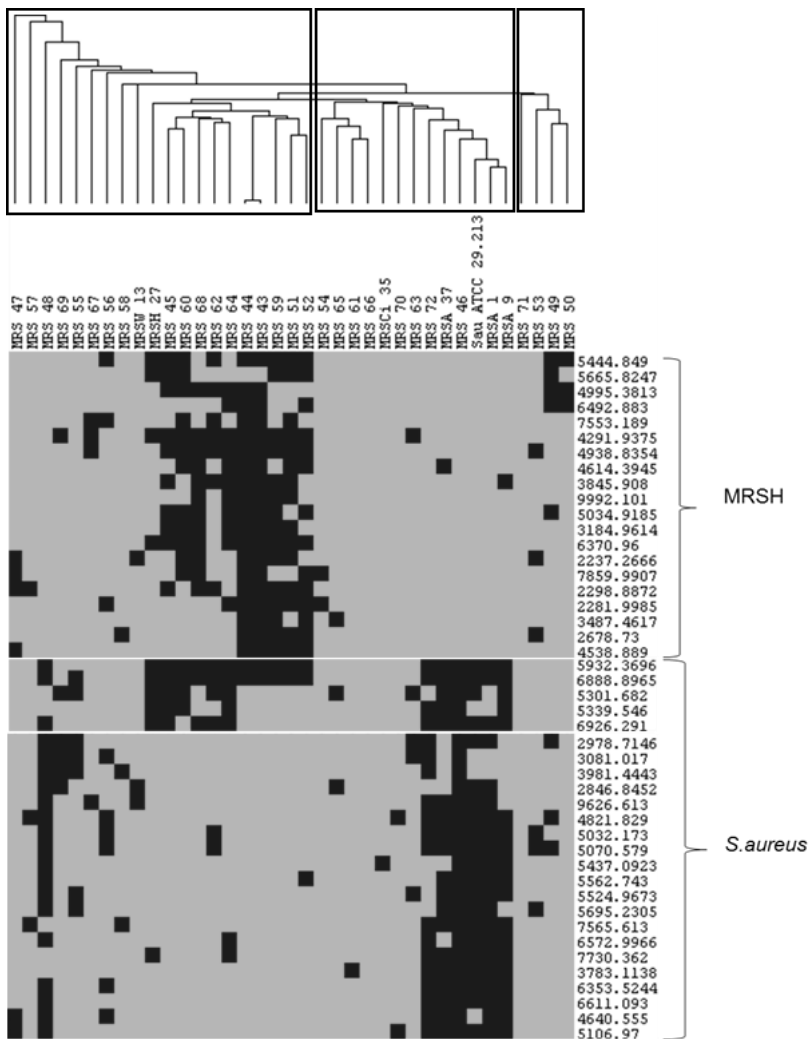
- os isolados MRS 70, 72, 46, 63 e 67, agrupados com os isolados de *S. aureus*, provavelmente são da espécie *S. aureus* (sem relação com a resistência à meticilina). Os picos comuns aos isolados do grupo são m/z 3783.1, 4306.1, 4343.0, 4821.8, 5032.2, 5070.6, 5302.5, 5932.3, 6353.4, 6610.9, 6888.9, 7565.5

e 7730.2. Os isolados MRS 46 e 72, amostras que correspondem ao *swab* nasal de um paciente e às cadeiras da recepção da emergência, estão agrupados com os isolados de *S. aureus*.

- os isolados MRS 47, 57, 48, 69, 55, 56, 58, 71, 53, 49 e 50, agrupados com o isolado MRSW13, provavelmente são da espécie *S. warneri*. Os picos comuns aos isolados do grupo são m/z 2124.4, 2222.0, 2418.6, 2438.1, 2454.3, 2611.9, 2827.8, 2971.4, 3110.1 e 5458.7. O isolado MRS 58 possui 100% de similaridade com o MRSW13.

- os isolados MRS 44, 45, 51, 52, 54, 59, 60, 61, 62, 64, 65, 66 e 68, agrupados com o MRSH27, provavelmente são da espécie *S. haemolyticus*. Os picos comuns para todos os isolados correspondem ao m/z 4292.9, 5932.3 e 6888.9. Entretanto, os picos m/z 5932.3 e 6888.9 também estão presentes em *S. aureus* ATCC 29213, mas o pico m/z 4292±1 é específico para nosso grupo de MRSH. Interessantemente, o pico 6888.9 não foi encontrado em nenhuma cepa VISA/hVISA (Figura11).

Figura 10: Dendrograma dos isolados de MRS com espécie desconhecida.

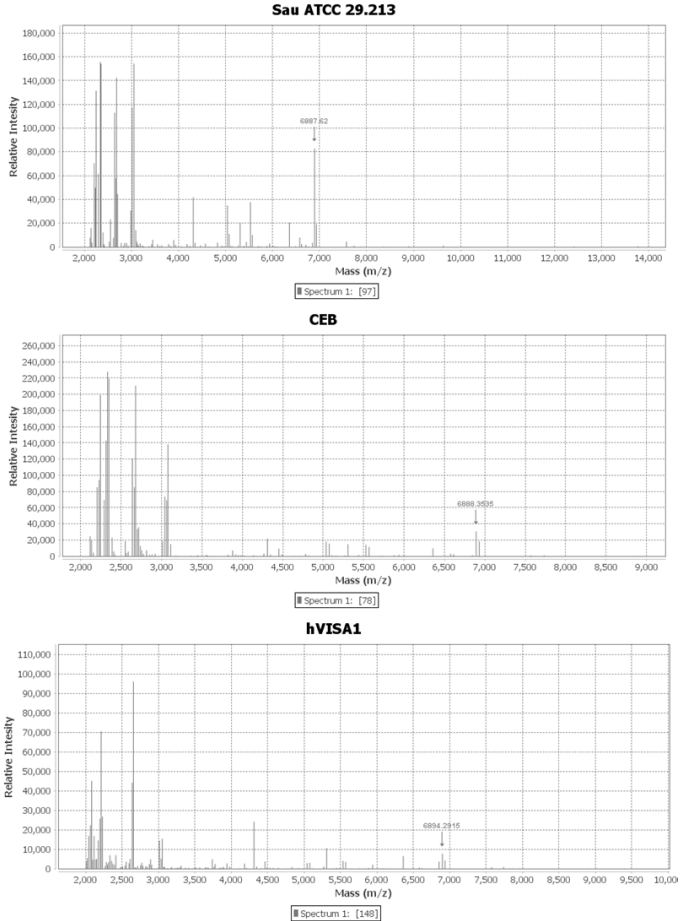


Legenda: O símbolo "*" indica os agrupamentos dos MRS. A cor preta indica a presença do pico e a cor cinza ausência do pico para essa cepa. Fonte: desenvolvido pela autora.

Neste último caso, nossos resultados mostram que 35% dos isolados de MRS são *S. haemolitycus*, considerando as 13

identificadas no 16S rRNA e as 9 associadas com o MRSH27, de um total de 63 MRS.

Figura 11: Espectro representativo do pico m/z 6888 ± 3 em MSSA, MRSA e hVISA.



Fonte: desenvolvido pela autora.

Estudos recentes sobre *S. haemolyticus* nosocomiais ressaltam a dificuldade do monitoramento epidemiológico nessa espécie e a necessidade de um método de tipagem rápido e confiável.

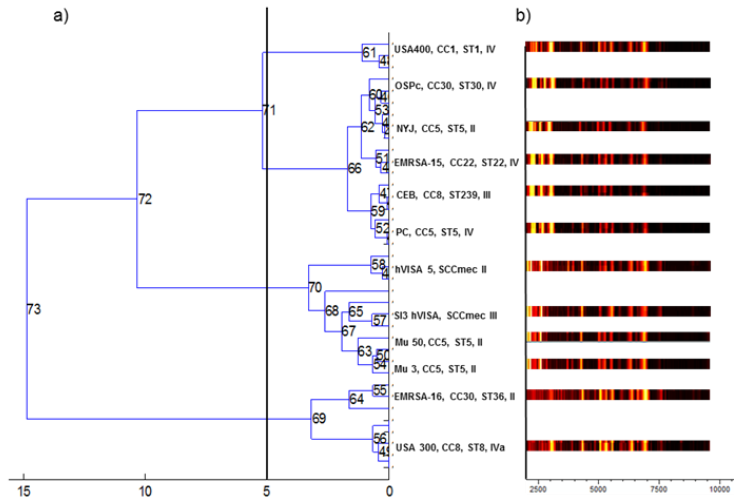
Os resultados demonstrados acima são promissores, indicando que o método de MALDI-TOF padronizado tem potencial para ser utilizado na identificação das espécies do gênero *Staphylococcus*, mas que precisa ser melhor estudado. Para comprovar nossa hipótese e confirmar a identificação das espécies de MRS desconhecidas, os isolados foram enviados ao CDC para identificação por MALDI-TOF em sistema padronizado.

4.2.3 MALDI-TOF para estudos de variabilidade

Para investigar se o MALDI-TOF em conjunto com o *software* ClinProTools consegue estabelecer relações entre cepas de *S. aureus* genotipicamente diferentes, foi realizado o agrupamento hierárquico dos *fingerprints* das oito cepas-controle de MRSA e das quatro cepas-controle hVISA.

Na figura 12, considerando uma linha de corte arbitrário de 5%, pode-se visualizar a separação em quatro agrupamentos principais: i) cepa USA400, ii) cepas EMRSA-16 e USA300, iii) demais cepas MRSA (OSPC, NYJ, EMRSA-15, CEB e PC) e iv) cepas VISA/hVISA (hVISA 5, SI13 hVISA, Mu50 e Mu3). A similaridade global entre as cepas foi de 85%. É importante destacar que as cepas VISA/hVISA utilizadas também são MRSA, mas possuem a característica adicional de resistência intermediária à vancomicina (SILVEIRA et al., 2015b). Assim, apesar da similaridade de >85%, o protocolo proposto foi capaz de agrupar as cepas VISA/hVISA separadamente das demais cepas MRSA.

Figura 12: Dendrograma resultante da análise de agrupamento hierárquico entre as cepas-controle de MRSA e hVISA por MALDI-TOF.



Legenda: O dendrograma criado mostra os agrupamentos calculados a partir dos espectros (eixo y) e a distância euclidiana ou a medida de dissimilaridade entre os agrupamentos (eixo x). Os números nos ramos indicam o *bootstrap value* e corresponde ao grau de confiança que temos na estrutura do dendrograma (UEDA et al., 2015). Na figura a note-se que as cepas possuem replicatas biológicas (R1, R2, R3, R4), por esse motivo, o ramo de cada cepa está subdividido. Na figura b se observa a representação em gel virtual das oito cepas-controle de MRSA e as cepas-controle de hVISA (Mu 3, Mu50, hVISA 5 e SI3 hVISA). Fonte: desenvolvido pela autora.

As ligações epidemiológicas entre clones bacterianos são avaliadas por tipagem molecular, tal como com PFGE e MLST. A tipagem por MALDI-TOF tem sido avaliada como uma nova ferramenta para a investigação de surtos de MRSA em tempo real, e na literatura se encontra uma concordância de até 93% em relação às técnicas de tipagem de referência (STEENSELS et al., 2016). Nesse contexto, comparamos os resultados de PFGE descrito por Silveira et al. (2015) e Sousa-Junior et al. (2013), para essas mesmas cepas, com os gerados na análise dos espectros de MALDI-TOF. De maneira geral na figura 12a, não parece haver correlação dos agrupamentos gerados nesta análise com as características já conhecidas das cepas (Tabela 1) obtidas por outros métodos (MLST, tipagem do SCC*mec*, PFGE). Como exemplo, o par NewYork/Japan e *Pediatric Clone* (que possuem o mesmo *sequence type* ST5, mas SCC*mec* diferentes) possui uma similaridade de 60% em relação a todas as cepas-controle no estudo de Silveira et al. (2015); já na análise de agrupamento hierárquico pelo MALDI-TOF (Figura 12a) possuem uma similaridade de 98%, mas também estão no mesmo grupo de cepas com distintos STs.

Devido à degeneração do código genético, é esperado que a variabilidade genômica seja menor que a proteômica, mas também é esperado que a expressão proteica seja mais susceptível a diferenças nas condições de cultivo, gerando uma maior variação nas replicatas do ensaio (Figura 12a). Assim, o menor poder discriminatório do método proposto também é devido à variabilidade do ensaio, já que o ponto de corte arbitrário é deslocado para desconsiderar a variação das replicatas (EGLI et al., 2015). As diferenças nas réplicas biológicas podem ser devidas à utilização da colônia diretamente

na placa, sendo difícil a padronização da quantidade utilizada. Pensando nisso, variações na preparação da amostra, como extração de proteínas a partir de condições de cultivo padronizadas, têm sido utilizadas e demonstraram um aumento na resolução do MALDI-TOF (STEENSELS et al., 2016).

Apesar do poder discriminatório do MALDI-TOF para análises de clonalidade em *S. aureus* ser questionado pelos nossos resultados e por outros autores (LASCH et al., 2014), alguns autores relatam sucesso em suas análises (SAUGET et al., 2017). Para aprofundar esta abordagem, analisamos nossos isolados frente a 16 picos (Quadro 3), descritos por diferentes estudos de tipagem bacteriana e compilados no trabalho de Sauget et al. (2017), dos principais complexos clonais de *S. aureus*.

Quadro 3: Biomarcadores proteicos encontrados nos principais complexos clonais de *Staphylococcus aureus*.

Picos m/z (Da)	3876	3891	5004	5033	5419	5439	5508	5527	6008	6030	6040	6553	6591	6612	7420	7815
CC5	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
CC8	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
CC22	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
CC30	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
CC45	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
CC398	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

Legenda: a cor preta indica presença do pico, a cor cinza indica ausência do pico e a cor branca indica picos incluídos no modelo de tipagem do complexo clonal (CC) mas a presença ou ausência não é determinante. Fonte: Adaptado de Sauget et al. (2017).

Na tabela 5, pode-se visualizar que o pico m/z 3876 só está presente em EMRSA-15 (CC22), USA 300 (CC8), CEB (CC8) e MRSA 3, embora no quadro 3 se mostra comum para os CC8, CC22, CC30, CC45 e CC398. Sendo assim, esse pico

deveria ser detectado nas cepas-controle CC30, EMRSA-16 e OSPc, o que não aconteceu.

O pico m/z 5031 \pm 3, correspondente a uma proteína ribossomal, está presente em todos os isolados e cepas do estudo de Sauguet et al. (2017), excetuando EMRSA-15 (CC22), porém aqui só está presente em 2 MRSA clínicos.

De forma curiosa, o pico m/z 6591 \pm 1, específico do CC8, foi registrado em CEB (CC8), EMRSA-15 (CC22), EMRSA-16 (CC30), PC (CC5), MRSA1, MRSA3, MRSA 4, MRSA 6, MRSA7 e MRSA 9. Não sendo detectado no USA 300 (CC8).

O pico m/z 6610 \pm 2, correspondente a uma tautomerase, foi encontrado no: EMRSA-15, EMRSA-16, USA 300, CEB, PC, MRSA 1-4, MRSA 6-9. Esperava-se a detecção nas cepas-controle NYJ (CC5) e OSPc (CC30).

Tabela 5: Identificação de biomarcadores proteicos descritos por Sauguet et al. (2017) nas cepas-controle de MRSA e nos isolados hospitalares MRSA 1-9.

Pico Observado m/z (Da)	Número de acesso (NCBI)	Descrição	EMRSA-15	EMRSA-16	USA 300	USA 400	CEB	NYJ	OSPC	PC	MRSA 1	MRSA 2	MRSA 3	MRSA 4	MRSA 5	MRSA 6	MRSA 7	MRSA 8	MRSA 9
			CC22 SCCmecIV	CC30 SCCmecII	CC8 SCCmecIV	CC1 SCCmecIV	CC8 SCCmecII	CC5 SCCmecII	CC30 SCCmecIV	CC5 SCCmecIV	MRSA 1 SCCmecIV	MRSA 2 SCCmecIV	MRSA 3 SCCmecIV	MRSA 4 SCCmecIV	MRSA 5 SCCmecIV	MRSA 6 SCCmecIV	MRSA 7 SCCmecIV	MRSA 8 SCCmecIV	MRSA 9 SCCmecIV
3875.7722	AIO22368.1	Proteína hipotética KQ76_09645																	
3891.9775	AIO20959.1	Proteína hipotética KQ76_06585																	
5030.959	AIO21667.1	Proteína hipotética KQ76_01085																	
5034.4053	AIO22360.1	Proteína ribossomal 50S L3																	
5528.2207	Ni																		
6552.041	AIO21317.1	Proteína ribossomal 50S L30																	
6589.4097	AIO22166.1	Proteína hipotética KQ76_13225																	
6592.9297	AIO21952.1	Proteína de membrana																	
6610.4097	AIO19885.1	Proteína hipotética KQ76_00835																	
6612.1104	AIO21640.1	4-oxalocrotonato tautomerase																	

Legenda: a cor cinza indica a presença do pico na cepa. Fonte: desenvolvido pela autora.

Na figura 13b, pode-se visualizar a representação em gel virtual dos espectros dos isolados clínicos MRSA1 a 9 gerado no programa ClinProTools. Podemos notar que os espectros dos isolados MRSA2, MRSA4 e MRSA9, possuem um perfil proteico diferente dos demais. Entretanto quando analisamos os mesmos isolados no dendograma, o MRSA4 se encontra separado do agrupamento dos isolados MRSA2 e MRSA9, mostrando menor similaridade com o par (61%).

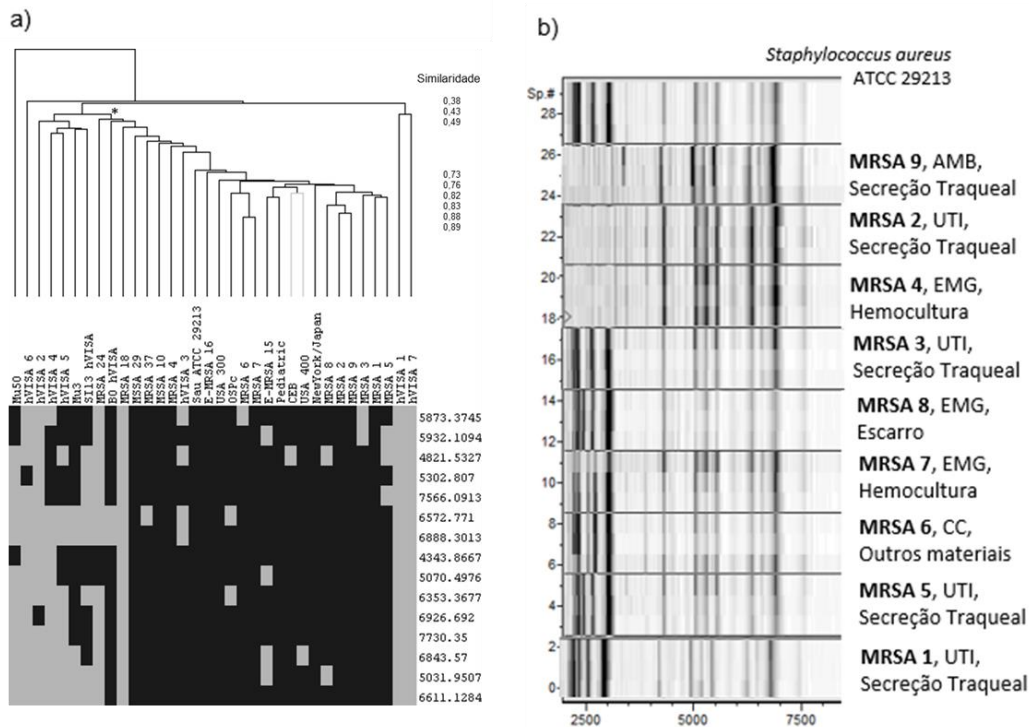
Assim, a utilização desses biomarcadores não permitiu a classificação dos nossos isolados nos complexo clonais (CC) já descritos, confirmando o baixo poder discriminatório do método para análises de clonalidade.

4.2.4 MALDI-TOF para análise de marcadores de resistência

Nessa etapa foram analisadas as 14 amostras identificadas como *S. aureus* (MRSA 1-9, MRSA 18, MRSA 24, MRSA 37, MSSA 10 e MSSA 29), além das cepas-controle de MRSA e de hVISA e a cepa-padrão *S. aureus* ATCC 29.213 (Tabela 1).

O dendograma da figura 13a, gerado no programa Mass-Up, mostra um aparente agrupamento dos isolados VISA/hVISA, demonstrando uma diferença considerável no perfil proteico comparado aos isolados MRSA e MSSA. Entretanto, como discutido no item anterior, a metodologia de MALDI-TOF proposta neste trabalho não apresentou poder discriminatório suficiente para inferências de similaridade dos isolados MRSA com os clones epidêmicos utilizados.

Figura 13: Dendrograma da análise de agrupamento dos espectros das cepas e isolados de *S. aureus* e representação em gel virtual das amostras MRSA.



Legenda: Na figura **a**, o símbolo "*" indica o começo do agrupamento dos isolados/cepas MRSA. Na área dos picos comuns, a cor preta indica a presença do pico e a cor cinza ausência do pico para essa cepa. Na figura **b**, representação em gel virtual dos espectros de massas de nove isolados hospitalares de MRSA isolados de pacientes. Fonte: desenvolvido pela autora.

Considerando os isolados MSSA10, MRSA 18, MSSA 29 e MRSA 37, vemos que foram agrupados entre os isolados MRSA, e não estão relacionados de forma considerável entre elas.

Assim, a análise genérica da topologia do dendograma não fornece mais informações acerca do perfil de resistência dos isolados, exceto pela aparente divergência das cepas VISA/hVISA em relação aos demais isolados MRSA e MSSA.

Para aprofundar a análise, foi realizada a detecção de picos comuns entre os isolados e cepas-controle. Assim obteve-se uma lista de 16 picos que podem ser úteis para a análise de marcadores de resistência (diagrama da figura 13a), sendo que o pico m/z 6888, que já tínhamos descrito no quadro 1, e o m/z 6572 não estão presentes em nenhum dos isolados de hVISA. Note-se que todos os picos estão presentes no *S. aureus* ATCC 29.213. Também vale destacar que o pico m/z 2415, descrito por Rhoads e colaboradores (2016) como indicativo da presença do gene *mecA* em *Staphylococcus* não foi encontrado nos isolados analisados. Somente nos isolados de *S. warneri* encontramos um pico próximo em m/z 2418.6.

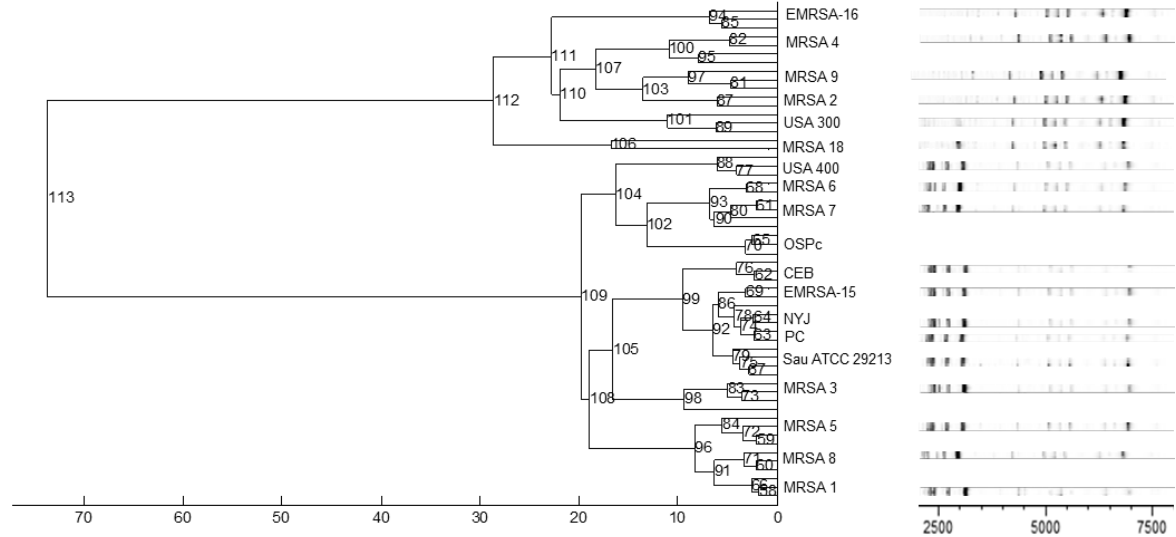
Os isolados MRSA18 e MRSA 24 possuem um perfil mais próximo ao agrupamento dos hVISA, sendo que a heterorresistência à vancomicina será pesquisada posteriormente nesses isolados para confirmar a validade dos marcadores.

Nota-se também que as cepas sensíveis à metilina foram agrupadas com as cepas resistentes, compartilhando vários picos em comum, à exceção do MRSA 18, que não possui os picos comuns listados na figura 13.

Visando obter uma melhor resolução do espectro, foi construído um dendograma com as cepas-controle de MRSA e isolados MRSA com o programa ClinProTools. Na figura 14, se observa a representação em gel virtual dos *fingerprints*, se destacam dois perfis principais, confirmados com o dendograma gerado. Um *cluster* menor que agrupa as amostras USA 300, EMRSA-16, MRSA2, MRSA4, MRSA9 e MRSA18, e um *cluster* maior que inclui as amostras USA 400, OSPc, CEB, EMRSA-15, NYJ, PC, MRSA1, MRSA3, MRSA5-8.

Considerando o agrupamento hierárquico obtido na figura 14, foi feita a pesquisa de biomarcadores de resistência, comparando duas classes: a classe 1 que corresponde à cepa MSSA (*Staphylococcus aureus* ATCC 29.213) e a classe 2 que corresponde aos isolados e cepas MRSA (USA 400, OSPc, CEB, EMRSA-15, NYJ, PC, MRSA1, MRSA3, MRSA5-8). O ClinProTools gerou uma lista de 105 picos, classificados de acordo com significância estatística, utilizando o modo de classificação do valor PTTA. Essa lista foi analisada manualmente no Microsoft Excel, como foi mencionado no item 4.2.1, e foram filtrados nove picos que poderiam diferenciar isolados MSSA e MRSA (Quadro 4).

Figura 14: Dendrograma de cepas-controle de MRSA e isolados MRSA com o programa ClinProTools.



Fonte: desenvolvido pela autora.

Quadro 4: Análises estatísticas do programa ClinProTools dos nove picos de interesse para diferenciar isolados de *S. aureus* sensíveis e resistentes à meticilina.

Número do pico	Massa (Da)	DAve	PTTA	PWKW	PAD	Ave1	Ave2	SD1	SD2	CV1	CV2	AUC da Curva	COR
6	2302.91	6.03	0.486	0.551	0.00936	35.2	29.16	3.6	6.85	10.23	23.5	0.814815	
10	2449.6	9.72	0.0109	0.551	< 0.000001	0.31	10.03	0.16	14.23	52.28	141.79	0.768519	
12	2630.18	10.76	0.128	0.551	0.00427	30.11	19.35	3.79	11.94	12.59	61.72	0.787037	
18	2972.96	3.1	0.272	0.551	0.166	15.99	12.89	1.11	6.79	6.96	52.68	0.768519	
19	3000.61	3.01	0.725	0.783	0.00705	37.77	40.78	2.11	16.11	5.59	39.5	0.648148	
22	3072.93	16.34	0.0402	0.278	0.00951	9.69	26.03	4.14	13.52	42.69	51.95	0.925926	
38	5021.77	6.62	0.725	0.783	0.00738	14.65	8.03	14.44	5.85	98.57	72.85	0.62963	
47	5292.05	2.26	0.725	0.692	0.00746	4.94	7.2	3.19	4	64.53	55.51	0.685185	
51	5513.27	8.56	0.725	0.551	0.00409	15.17	6.61	12.67	4.58	83.52	69.3	0.759259	

Legenda: Ave1 e Ave2, correspondem a razão entre a área do pico e a intensidade média da classe 1 (MSSA) e da classe 2 (MRSA), respectivamente; SD1 e SD2, desvio padrão da razão entre a área do pico e a intensidade média da classe 1 (MSSA) e da classe 2 (MRSA), respectivamente; CV1 e CV2, o coeficiente de variação (%) da classe 1 (MSSA) e da classe 2 (MRSA), respectivamente. Fonte: desenvolvido pela autora.

Além disso foram obtidas as curvas para avaliação da qualidade de discriminação de cada pico, denominada curva Característica de Operação do Receptor (COR) ou curva ROC (*Receiver operator characteristic*), no programa ClinProTools. As curvas foram geradas com o modelo SVM (*Support Vector Machines*) e nos informam sobre a especificidade e sensibilidade do pico em estudo. Sendo que um resultado com especificidade e sensibilidade igual a 1, que corresponde ao resultado ideal, mostraria uma curva COR que começa na origem, depois ascende verticalmente até o valor 1 do eixo y e finalmente se estende horizontalmente até o valor 1 do eixo x (GRIFFIN et al., 2012). Na figura 15 pode-se visualizar as nove curvas COR. Pode-se observar que todas as curvas ascendem verticalmente da origem até valores de 0,25-0,85 do eixo y, e vão se curvando em direção ao valor 1 do eixo x. Pode-se estudar o desempenho geral do pico para diferenciar isolados MRSA de MSSA com ajuda do valor AUC (area under the ROC curve), que corresponde a uma medida do valor médio de sensibilidade para todos os possíveis valores de especificidade. Um valor de AUC de 0,5 corresponde ao limite inferior, que resulta numa curva COR em linha diagonal e é interpretado como o puro acaso. Um valor de

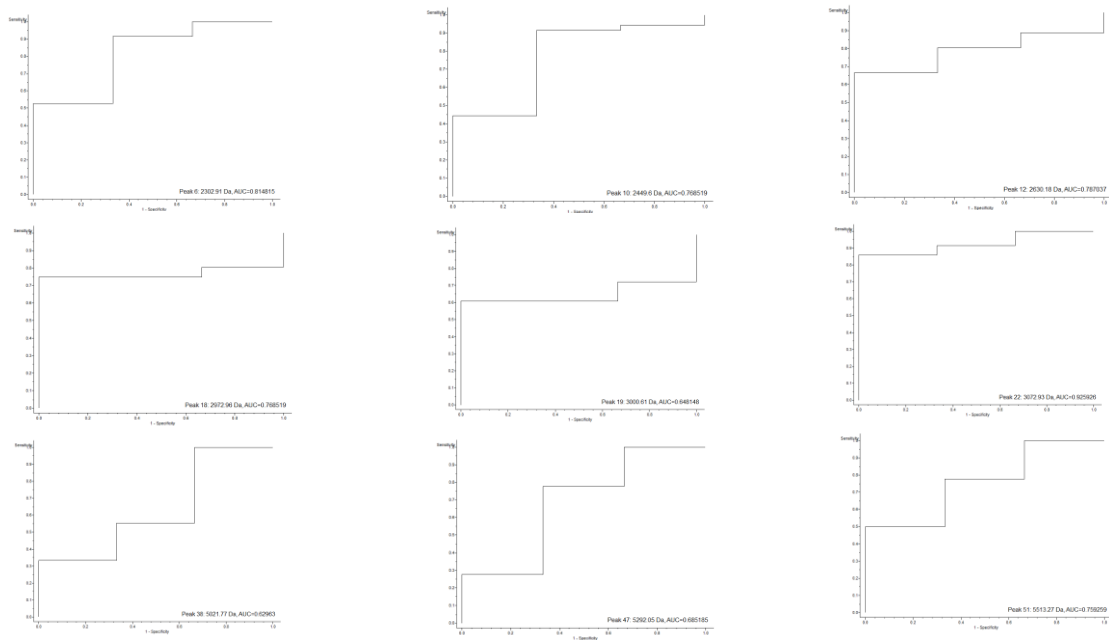
AUC maior a 0,5, nos indica que não há dependência do puro acaso e que o marcador tem alguma capacidade de discriminar MRSA de MSSA. Já uma curva COR com uma AUC mais próxima a 1, mostra um melhor desempenho global e um valor de AUC igual a 1, é aquele que foi preciso de forma perfeita (SEONG; JIN; CHANG-HEE, 2004; GRIFFIN et al., 2012). Os valores de AUC dos picos em estudo, 6, 10, 12, 19, 22, 38, 47 e 51, como se mostra no quadro 4, foram todos superiores a 0,62. Sendo que o pico 22 (m/z 3072.93), possui um valor de AUC da curva COR de 0,93, próximo a 1, mostrando uma excelente *performance* para discriminar os isolados. Porém, já têm sido demonstrado que a correlação dos picos comuns considerando cepas com fatores de resistência ou virulência, poderia ser aparente, ou seja, devido a efeitos da clonalidade (SZABADOS et al., 2011; SPINALI et al., 2015). Para confirmar esta hipótese, analisamos todos os picos listados no quadro 4 com uma diferença de ± 4 Da (Quadro 5). Nele podemos observar um pico gênero-específico (m/z 5302), mas nenhum presente exclusivamente em todas as amostras MRSA.

Quadro 5: Pesquisa dos potenciais biomarcadores de resistência nos isolados.

Pico m/z	Sau ATCC 29.213	CEB	EMRSA-15	NYJ	OSPc	PC	USA 400	MRSA 1	MRSA 3	MRSA 5	MRSA 6	MRSA 7	MRSA 8
2306.3428													
2453.9048													
2635.1611													
2978.9663													
3006.3438													
3008.8936													
3075.766													
5302.6245													
5516.7036													

Legenda: a cor cinza indica presença do pico. Fonte: desenvolvida pela autora.

Figura 15: Curvas COR dos nove picos candidatos a biomarcadores de resistência.



Legenda: O eixo x corresponde à especificidade e o eixo y corresponde à sensibilidade. Fonte: desenvolvida pela autora.

4.2.5 MALDI-TOF para análise global das cepas e isolados de *Enterococcus* spp resistentes à vancomicina (VRE)

As análises de MALDI-TOF dos isolados VRE foram limitadas devido aos poucos controles disponíveis e a algumas dificuldades técnicas no manuseio das amostras conforme será discutido a seguir.

A partir dos espectros de MALDI-TOF para os isolados VRE, foi obtido no programa Mass-Up uma lista comparativa entre os picos dos 17 isolados hospitalares com os picos da cepa-padrão *E. faecalis* ATCC 29.212. Foram detectados 506 picos diferentes, entre os quais, o pico com m/z 4430 ± 3 foi comum entre todos os isolados. De fato, estudos prévios têm descrito esse único pico como marcador específico do gênero *Enterococcus* spp. (SANTOS et al., 2015), o que foi demonstrado no nosso trabalho. A comparação do pico m/z 4430 ± 3 com as massas moleculares das proteínas da base de dados da cepa *E. faecalis* ATCC 29.212, sugere a proteína ribossomal L36 (Número de acesso: AIL04102.1). Apesar de característico do gênero, este pico não é um bom marcador intraespecífico.

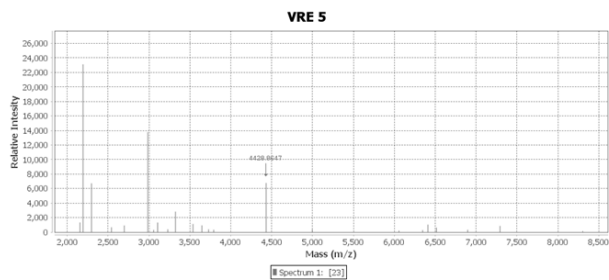
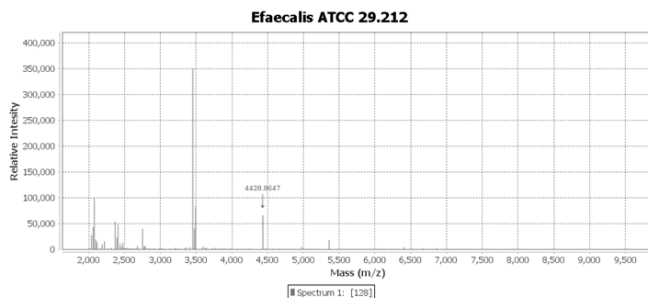
Por comparação dos *fingerprints* dos isolados com a cepa-padrão, os isolados foram identificados a nível de gênero. Na figura 16, podem-se visualizar os espectros e o dendograma. Note-se que neste último, estão representados os dois picos mais comuns (m/z 4428, 6511 e 7288). O pico m/z 4428 foi automaticamente encontrado no controle e em 15 amostras (ATCC, VRE1-8, VRE10, VRE11 e VRE13-17). Foi feita uma busca manual nas duas amostras restantes, VRE8 e VRE9, por picos dentro do intervalo m/z 4.430 ± 3 , sendo encontrado o m/z de 4.433 e de 4.431, respectivamente.

Os picos de m/z 7.288 ± 3 e 6511 ± 3 foram descartados como possíveis marcadores por não ser encontrados em cinco amostras. Além disso, foram pesquisados outros picos comuns para a espécie *E. faecium*, como possível biomarcador de espécie, e só foram encontrados picos de baixa intensidade e com $m/z > 16.000$. Sabe-se que o intervalo de massa de 2-12 kDa é utilizado preferencialmente para a pesquisa de sinais

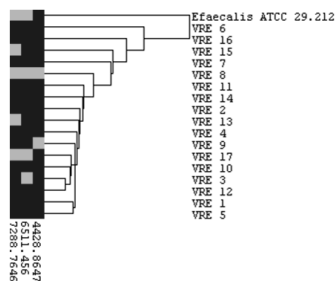
potencialmente disponíveis para a caracterização das espécies, sendo assim, esses picos comuns foram descartados como possíveis marcadores (LASCH et al., 2014).

Figura 16: Espectros de massas e dendograma obtidos para o gênero *Enterococcus* spp.

a)



b)



Legenda: a) Espectro representativo da cepa *E. faecalis* ATCC 29.212 e do isolado hospitalar VRE 5. Nota-se o pico m/z 4.430 ± 3 indicado na figura. b) Dendograma das 17 amostras de VRE e da cepa *E. faecalis* ATCC 29.212. A cor preta indica presença do pico e a cor cinza ausência do pico para esse isolado. Fonte: desenvolvido pela autora.

O MALDI-TOF possui resoluções taxonômicas variadas dependendo dos microrganismos e da metodologia de preparação da amostra, como por exemplo, têm cepas que foram identificadas até a subespécie e inclusive foram classificadas pelo sorotipo (SANDRIN; GOLDSTEIN; SCHUMAKER, 2013). Nesse contexto, já se tem conhecimento que a resolução a nível de espécie nos *Enterococcus* spp. de origem ambiental, humana ou de animais, pode ser melhorada por meio de um pré-tratamento da amostra, utilizando o protocolo de extração com etanol/ácido fórmico ou com uma enzima como lisozima (GIEBEL et al., 2008; QUINTELA-BALUJA et al., 2013). A detecção de picos marcadores, após uma metodologia de preparação da amostra pode ser falha, pois diferentes metodologias geram diferentes espectros. De fato, os picos para diferenciação de *E. faecium* e *E. faecalis*, descritos por Quintela-Baluja (2013), não foram encontrados no nosso trabalho. Além disso, a qualidade dos dados gerados no MALDI-TOF pode ser influenciada pelo meio de cultura de isolamento. Recomenda-se a utilização de meios de cultura não seletivos e a padronização da quantidade de bactérias colocada no *spot* (VELOO et al., 2014; SANTOS et al., 2015).

No dendograma da figura 16b pode-se visualizar que há uma clara divisão entre a cepa-padrão *E. faecalis* dos demais isolados de *E. faecium*.

Na pesquisa de picos marcadores de resistência antimicrobiana, há estudos que mostram uma correlação entre a presença dos picos m/z 3516 e 3644 e *E. faecium* *vanA* positivos, utilizando o programa ClinProTools (WEI et al., 2014). Nenhum desses picos foram encontrados nos 17 isolados VRE do nosso estudo, isto pode ser devido à etapa de preparação

prévia das amostras realizada nos estudos mencionados acima e às condições de cultivo inicial.

Para *E. faecium* van B positivo foi descrito por Griffin et al. (2012), os biomarcadores m/z 2.211, 5.095, 5.945 e 8.328, os quais também não foram encontrados nas 17 cepas do nosso trabalho.

Assim, para as condições testadas, não foi possível a identificação de marcadores proteicos para identificação específica de espécies de *Enterococcus* spp. ou para estudos de resistência e variabilidade.

5 CONCLUSÕES

O presente trabalho procurou analisar biomarcadores proteicos para identificação fenotípica e avaliação de resistência e de variabilidade em isolados de *Staphylococcus* spp. resistentes à meticilina (MRS) e de *Enterococcus* resistentes à vancomicina (VRE). Com a metodologia proposta podemos concluir que:

1. A partir de 1.759 amostras, coletadas entre abril de 2015 e março de 2016 de cinco alas do HU/UFSC, foram obtidas 72 MRS e 17 VRE;
2. O protocolo de MALDI-TOF validado neste trabalho para análises microbiológicas mostrou poder discriminatório para identificação dos isolados a nível de gênero, tanto para VRE quanto para MRS, analisando-se proteínas na faixa de 2.000 a 20.000 Da;
3. Para *Staphylococcus* spp., os biomarcadores proteicos identificados permitiram uma análise robusta para identificação das espécies, mas não mostraram poder discriminatório suficiente para análises de marcadores de resistência à oxacilina e vancomicina ou de variabilidade e clonalidade;
4. Da pesquisa de biomarcadores proteicos para identificação fenotípica de *Staphylococcus* spp. manitol positivo, obteve-se quatro picos para MRSCi, quatro para MRSH e dezessete para MRSW;
5. Na tentativa de diferenciar MRSA dos MSSA, foram obtidos nove picos com especificidade e sensibilidade consideráveis, mas somente dois, m/z 2302±2Da e 3073±2Da possuem valores relevantes de AUC da curva COR para futuras pesquisas.

6. No caso do VRE, o pico m/z 4430 \pm 3 Da foi comum para todas as amostras e estudos recentes já o tem descrito como marcador do gênero *Enterococcus*. Não houve dados suficientes que permitiram a diferenciação interespécie e nem de resistência e clonalidade.

Finalmente, apesar de bem estabelecido para identificação bacteriana, nossos dados sugerem cautela na interpretação dos resultados de MALDI-TOF/MS para estudos de resistência e variabilidade até que modelos computacionais estejam bem validados.

6 LIMITAÇÕES DO ESTUDO E PERSPECTIVAS

- Houve uma limitação financeira no estudo que não permitiu o sequenciamento e a pesquisa dos genes de resistência para todos os isolados. Além disso, também não permitiu a tipagem dos isolados por PFGE, MLST ou *spa* typing;
- Não foi possível realizar a identificação dos isolados em um equipamento MALDI-TOF comercial a tempo para comparação dos resultados. Os arquivos dos espectros de massas obtidos para as 111 cepas no MALDI-TOF/MS foram exportados para o programa Biotyper®, que possui uma base de dados de referência para identificação bacteriana, mas não foi possível realizar a identificação, devido a incompatibilidade dos espectros obtidos com o protocolo estabelecido pela Bruker®. Essas análises estão sendo realizadas no CDC, EUA, em parceria com o Dr. Glauber Wagner;
- Foram utilizados poucos complexos clonais (CC) ou tipos de sequência (ST) de MRS e VRE, dificultando a extrapolação dos resultados. Além disso, o fato de serem isolados hospitalares da mesma área geográfica também é um fator limitante;
- Na tentativa de identificação de proteínas foi considerado que um pico m/z corresponde a uma proteína individual. Sabe-se que proteínas variadas podem produzir picos m/z similares. Além disso, existem várias modificações pós-traducionais e ligação com cofatores que mudariam o valor m/z do pico.

REFERÊNCIAS

AL-ZHRANI, I. et al. *Sma*I Restriction Site-Based Multiplex PCR for Typing of Hospital- and Community-Acquired *Staphylococcus aureus*. **J Clin Microbiol**. v.49, n.11, p.3820-3828, 2011.

ASGHAR, A.H. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from tertiary care hospitals. **Pak J Med Sci**. v.30, n.4, p.698-702, 2014.

ANDRADE-FIGUEIREDO, M.; LEAL-BALBINO, T.C. Clonal diversity and epidemiological characteristics of *Staphylococcus aureus*: high prevalence of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* (OS-MRSA) associated with clinical isolates in Brazil. **BMC Microbiol**. v.16, n.1, p.115, 2016.

ANGELETTI, S. Matrix assisted laser desorption time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical microbiology. **J Microbiol Methods**. v.S0167-7012, n.16, p.30253-30256, 2016.

ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária intensifica controle de infecção em serviços de saúde**. 10.1590/S0034-89102004000300022. Rev Saúde Pública. v.38, n.3, p.47-48, 2004.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Análise do Inquérito Nacional sobre infra-estrutura, recursos humanos, equipamentos, procedimentos, controle de qualidade e biossegurança nos Laboratórios de Microbiologia**, 2007.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Programa nacional de prevenção e controle de infecções relacionadas à assistência à saúde (2013 – 2015)**, 2013.

ARIAS, C.A.; CONTRERAS, G.A.; MURRAY, B.E. Management of multidrug-resistant enterococcal infections. **Clin Microbiol Infect**. v.16, p.555-562, 2010.

ARTHUR, M. et al. Evidence for in vivo incorporation of d-lactate into peptidoglycan precursors of vancomycin-resistant enterococci. **Antimicrob. Agents Chemother.** v.36, p.867-869, 1992.

BALKHAIR, A. et al. Epidemiology of Multi-Drug Resistant Organisms in a Teaching Hospital in Oman: A One-Year Hospital-Based Study. **ScientificWorldJournal.** v.2014, p. 57102, 2014.

BENITO, M.J. et al. Rapid differentiation of *Staphylococcus aureus* from staphylococcal species by arbitrarily primed-polymerase chain reaction. **Lett Appl Microbiol.** v.31, n.5, p.368-373, 2000.

BREVES, A. et al. Methicillin- and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in health care workers and medical devices. **J Bras Patol Med Lab,** v. 51, n.3, p.143-152, 2015.

CABOCLO, R.M. et al. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Rio De Janeiro Hospitals: Dissemination of the USA400/ST1 and USA800/ST5 SCC *mec* Type IV and USA100/ST5 SCC *mec* Type II Lineages in a Public Institution and Polyclonal Presence in a Private One. **Am J Infect Control.** v. 41, n.3, p. 21-26, 2012.

CAIAFFA-FILHO, H.H. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying SCC *mec* type II was more frequent than the Brazilian endemic clone as a cause of nosocomial bacteremia. **Diagn Microbiol Infect Dis.** v.76, n.4, p.518-520, 2013.

CALAZANS-SILVA A.C. et al. Genetic analysis of *mecA* gene and detection of homologue *pbpD* in *Staphylococcus sciuri* group. **Braz. J. Microbiol.** v.45, n.2, 2014.

CAMARGO, I.L. et al. Identification of an unusual *vanA* element in glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* in Brazil following international transfer of a bone marrow transplant patient. **Can J Microbiol.** v.50, n.9, p.767-770, 2004.

CAMOEZ, M. et al. Automated categorization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates into different clonal complexes by MALDI-TOF mass spectrometry. **Clin Microbiol Infect.** v.22, n.2, p.161-170, 2016.

CAPORASO, J.G. et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **The ISME Journal.** v.6, p.1621-1624, 2012.

CASTAÑO, S.V. et al. Is MALDI-TOF Mass Spectrometry a Valuable New Tool for Microorganisms Epidemiology?. **J Proteomics Bioinform** v.9, p.9, 2016.

CDC. Centers of Disease Control and Prevention. **Antibiotic resistance threats in the United States**, 2013.

CETINKAYA, Y.; FALK, P.; MAYHALL, C.G. Vancomycin-resistant enterococci. **Clin Microbiol Rev.** v.13, n.4, p.686-707, 2000.

CHAKRAVORTY, S. et al. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. **J Microbiol Methods.** v.69, n.2, p.330-339, 2007.

CHEMALY, R.F. et al. The role of the healthcare environment in the spread of multidrug-resistant organisms: update on current best practices for containment. **Ther Adv Infect Dis.** v.2, n.3-4, p.79-90, 2014.

CHEN, L. et al. Rapid Sanger Sequencing of the 16S rRNA Gene for Identification of Some Common Pathogens. **PLoS One.** v.9, n.2, 2014.

CHUNG, M. et al. International Clones of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Two Hospitals in Miami, Florida. **J Clin Microbiol.** v.42, n.2, p.542-547, 2004.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Sixth Informational Supplement, M02 e M07**. 2016.

CONCEIÇÃO, N. et al. First report of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* in Uberaba, Minas Gerais state. **Braz J Microbiol**.v. 41, n.1, p.34-36, 2010.

COOKSON, B. et al. Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): screening and decolonization. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v.37, p.195-201, 2011.

CORREA, A.A. et al. Small hospitals matter: insights from the emergence 84 and spread of vancomycin-resistant enterococci in 2 public hospitals in inner Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v.82, n.3, p.227-233, 2015.

D'AMORE, R., et al. A comprehensive benchmarking study of protocols and sequencing platforms for 16S rRNA community profiling. **BMC Genomics**, v.17, n.1, p.55. 2016.

DA SILVA, L.P. et al. Genetic features and molecular epidemiology of *Enterococcus faecium* isolated in two university hospitals in Brazil. **Diagn Microbiol Infect Dis**. v.74, n.3, p.267-271, 2012.

DABUL, A.N.G; CAMARGO, I.L.B.C. Clonal complexes of *Staphylococcus aureus*: all mixed and together. **FEMS Microbiol Lett**. v.351, n.1, p.7-8, 2014.

DALLA COSTA, L.M. et al. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: first case in Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**. v.2, p.160-163, 1998.

DAVIS, M.F. et al. Two coagulase-negative staphylococci emerging as potential zoonotic pathogens: wolves in sheep's clothing?. **Front Microbiol**. v.4, p.123, 2013.

DE ALMEIDA, L.M. et al. Linezolid Resistance in Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*

Isolates in a Brazilian Hospital. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.58, n.5, p.2993-2994, 2014.

DELEO F, CHAMBERS H. Reemergence of antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* in the genomics era. **J Clin Invest**. v. 119, n.9, p. 2464–2474, 2009.

DEPARDIEU, F. et al. Modes and Modulations of Antibiotic Resistance Gene Expression. **Clin Microbiol Rev**. v.20, n.1, p.79–114, 2007.

DOS SANTOS, F.F. et al. Presence of *mecA*-positive multidrug-resistant *Staphylococcus epidermidis* in bovine milk samples in Brazil. **J Dairy Sci**. v.99, p.1-9, 2016.

DRANCOURT, M.; RAOULT, D. *rpoB* gene sequence-based identification of *Staphylococcus* species. **J Clin Microbiol**. v.40, p.1333-1338. 2002.

DRYDEN, M.S. Complicated skin and soft tissue infection. **J Antimicrob Chemother**. v.65, n.3, p.35-44, 2010.

ECDC. European Centre for Disease Prevention and Control. **Point Prevalence Survey of healthcare-associated infections and antimicrobial use in European acute care hospitals**. ECDC, 2013.

ECDC. European Centre for Disease Prevention and Control. **Summary of latest data on antibiotic resistance in the European Union**. EARS-Net surveillance data. ECDC, 2015.

EDWARDS-JONES, V. et al. Rapid discrimination between methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by intact cell mass spectrometry. **J Med Microbiol**. v.49, n.3, p.295-300, 2000.

EGLI, A. et al. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass-Spectrometry (MALDI-TOF MS) Based Typing of Extended-Spectrum β -Lactamase Producing *E. coli* – A Novel Tool for Real-Time Outbreak Investigation. **PLoS One**. v.10, n.4, 2015.

EIGNER, U. et al. Performance of a matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry system for the identification of bacterial isolates in the clinical routine laboratory. **Clin Lab**. v. 55, p.289-296, 2009.

ELLINGTON, M. et al. Decline of EMRSA-16 amongst methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* causing bacteraemias in the UK between 2001 and 2007. **J Antimicrob Chemother**.v. 65, n.3, p.446-448, 2010.

ENRIGHT, M.C. et al. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Proc Natl Acad Sci**. v.99, n.11, p. 7687-92, 2002.

FRENAY, H.M. et al. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on the basis of protein A gene polymorphism. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**. v.15, p.60-64, 1996.

FIGUEIREDO, A.M.S.; FERREIRA, F.A. The multifaceted resources and microevolution of the successful human and animal pathogen methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 109, n.3, p.265-278, 2014.

FROTHINGHAM, R. Differentiation of strains in *Mycobacterium tuberculosis* complex by DNA sequence polymorphisms, including rapid identification of *M. bovis* BCG. **J. Clin. Microbiol**. v.33, p.840-844, 1995.

GARDETE, S.; TOMASZ A. Mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. **J Clin Invest**. v. 124, n.7, p. 2836-2840, 2014.

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

GETACHEW, Y. et al. Genetic variability of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates from humans, chickens, and pigs in Malaysia. **Appl Environ Microbiol**. v. 79, n.15, p.4528-4533, 2013.

GIEBEL, R.A.; FREDENBERG, W.; SANDRIN, T.R. Characterization of environmental isolates of *Enterococcus* spp. by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Water Res**. v.42, n.4-5, p.931-940, 2008.

GOMEZ, E. et al. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* SCC*mec* Type and Its Association with Clinical Presentation, Severity, and Length of Stay among Patients with Complicated Skin and Skin Structure Infections. **Advances in Infectious Diseases**. v.4, p.111-115, 2014.

GRIFFIN, P.M. et al. Use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to identify vancomycin-resistant enterococci and investigate the epidemiology of an outbreak. **J Clin Microbiol**. v.50, p.2918-2931, 2012.

GURIEVA, T.V.; BOOTSMA, M.C.; BONTEN, M.J. Decolonization of patients and health care workers to control nosocomial spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a simulation study. **BMC Infect Dis**. v.14, n.12. p.302, 2012.

HARRISON, E.M. et al. A novel hybrid SCC*mec*-*mecC* region in *Staphylococcus sciuri*. **J Antimicrob Chemother**. v.69, n.4, p.911-918, 2014.

HERMANOVSKÁ, L.; BARDOŇ, J.; ČERMÁK, P. Vancomycin-resistant enterococci - the nature of resistance and risk of

transmission from animals to humans. **Klin Mikrobiol Infekc Lek.** v.22, n.2, p.54-60, 2016.

HEUDORF, U. et al. Healthcare associated infections (HAI), antibiotic use and prevalence of multidrug-resistant bacteria (MDRO) in residents of long-term care facilities: the Frankfurt HALT plus MDRO project 2012. **Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz.** v. 57, n.4, p.414-422, 2014.

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. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. **J Antimicrob Chemother.** v.40, n.1, p.135-6, 1997.

HOGARDT, M. et al. Current prevalence of multidrug-resistant organisms in long-term care facilities in the Rhine-Main district, Germany 2013. **Euro Surveill.** v.2, p.20, 2015.

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, p99139, 2010.

INDRÁKOVÁ, A. et al. The evolutionary pathway of the staphylococcal cassette chromosome element. **Biologia.** v.71, n.11, p. 1195-1203, 2017.

ITO, T. et al. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome mec integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob. Agents Chemother.** v.45, p.1323-1336, 2001.

ITO, T. et al. Novel type V staphylococcal cassette chromosome mec driven by a novel cassette chromosome recombinase, ccrC. **Antimicrob Agents Chemother.** v.48, n.7, p. 2637-2651, 2004.

ITO, T. et al. Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (*SCC_{mec}*) analysis of MRSA. **Methods Mol Biol.** v.1085, p.131-148, 2014.

IWG-SCC. International working group on the classification of staphylococcal cassette chromosome elements, 2011.

Disponível em:

<http://www.sccmec.org/Pages/SCC_TypesEN.html>. Acesso em: 10 abril 2017.

JACKSON, K. et al. Optimisation of intact cell MALDI method for fingerprinting of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **J Microbiol Methods.** v.62, n.3, p.273-84, 2005.

JOSTEN, M. et al. Analysis of the matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrum of *Staphylococcus aureus* identifies mutations that allow differentiation of the main clonal lineages. **J Clin Microbiol.** v.51, n.6, p.1809-17, 2013.

KERSCHNER, H. et al. First report of *mecC* MRSA in human samples from Austria: molecular characteristics and clinical data. **New Microbes New Infect.** v.3, p. 4-9, 2015.

KING, J.M. et al. Phenotypes and Virulence among *Staphylococcus aureus* USA100, USA200, USA300, USA400, and USA600 Clonal Lineages. **mSphere.** v.1, n.3, p. 8, 2016.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN JR., W. C. **Diagnóstico Microbiológico – Texto e Atlas Colorido.** 6ª edição ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KORNIENKO, M. et al. Analysis of nosocomial *Staphylococcus haemolyticus* by MLST and MALDI-TOF mass spectrometry. **Infect Genet Evol.** v.39, p.99-105, 2016.

KRISTICH, C.J. et al. Reciprocal regulation of cephalosporin resistance in *Enterococcus faecalis*. **mBio**. v.2, n.6, p.199-211, 2011.

LASCH, P. et al. Insufficient discriminatory power of MALDI-TOF mass spectrometry for typing of *Enterococcus faecium* and *Staphylococcus aureus* isolates. **J Microbiol Methods**. v.100, p.58-69, 2014.

LARSEN, J. et al. Multilocus Sequence Typing Scheme for *Staphylococcus aureus*: Revision of the gmk Locus. **J Clin Microbiol**. v.50, n.7, p.2538–2539, 2012.

LEBRETON, F.; WILLEMS, R.J.L.; GILMORE, M.S. **Enterococcus Diversity, Origins in Nature, and Gut Colonization**, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190427/>>. Acesso em: 10 abril 2017.

LI, W.; RAOULT, D.; FOURNIER P.E. Bacterial strain typing in the genomic era. **FEMS Microbiol Rev**. v.33, n.5, p.892-916, 2009.

LIM, D.; STRYNADKA, N.C. Structural basis for the beta lactam resistance of PBP2a from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Nat Struct Biol**. v.9, n.11, p. 870-876, 2002.

LÓPEZ-FERNÁNDEZ, H. et al. Mass-Up: an all-in-one open software application for MALDI-TOF mass spectrometry knowledge discovery. **BMC Bioinformatics**. v.16, p.318, 2015.

LOWY, F. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. **J Clin Invest**. v. 111, n.9, p. 1265-1273, 2003.

LUNA, C.M. et al. Tratamento de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina na América Latina. **Braz J Infect Dis**. v.14, s.2, p. S121-S129, 2010.

MA X.X., et al. Novel type of staphylococcal cassette chromosome mec identified in community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains. **Antimicrob. Agents Chemother.** v.46, n.4, p.1147-1152, 2002.

MANGA, I. et al. Rep-PCR typing of *Staphylococcus* spp. strains in meat paste production line and identification of their origin. **Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences.** v. 9, n.1, 2015.

MAIDEN, M.C. et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v.95, p.3140-3145, 1998.

MANAKA, A.; TOKUE, Y.; MURAKAMI, M. Comparison of 16S ribosomal RNA gene sequence analysis and conventional culture in the environmental survey of a hospital. **J Pharm Health Care Sci.** v.3, p.8, 2017.

MANERO, A.; BLANCH, A.R. Identification of *Enterococcus* spp. with a Biochemical Key. **Appl Environ Microbiol.** v. 65, n.10, p. 4425–4430, 1999.

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

MCBRYDE, E.S. et al. An investigation of contact transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **J Hosp Infect.** v.58, n.2, p.104-108, 2004.

MCHARDY, I.H. et al. Clinical and Microbiological Aspects of β -Lactam Resistance in *Staphylococcus lugdunensis*. **J Clin Microbiol.** v.55, n.2, p.585-595, 2017.

MEHTA, Y. et al. Guidelines for prevention of hospital acquired infections. **Indian J Crit Care Med**. v.18, n.3, p.149–163, 2014.

MILHEIRIÇO, C.; DE LENCASTRE, H.; TOMASZ, A. MRSA strains carrying the novel *mecC* gene: full genome sequencing identifies in the genetic background several determinants that modulate the resistant phenotype. **Antimicrob Agents Chemother**. v.61, n.3, 2017.

MILLER, W.R.; MUNITA, J.M.; ARIAS, C.A. Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. **Expert Rev Anti Infect Ther**. v.12, n.10, p.1221-1236, 2014.

MOURA, H. et al. MALDI-TOF mass spectrometry as a tool for differentiation of invasive and noninvasive *Streptococcus pyogenes* isolates. **FEMS Immunol Med Microbiol**. v.53, p.333–342, 2008.

MOURA, H. et al. Detection of biomarkers of pathogenic *Naegleria fowleri* through mass spectrometry and proteomics. **J Eukaryot Microbiol**. v.62, n.1, p.12-20, 2015.

MUTTERS, N.T. et al. Control of the Spread of Vancomycin-Resistant Enterococci in Hospitals: Epidemiology and Clinical Relevance. **Dtsch Arztebl Int**. v.110, n.43, p. 725-731, 2013.

NAHAEI, M.R. et al. Detection of Methicillin-Resistant Coagulase-Negative Staphylococci and Surveillance of Antibacterial Resistance in a Multi-Center Study from Iran. **Jundishapur J Microbiol**. v.8, n.8, 2015.

NAMVAR A. et al. Clinical characteristics of *Staphylococcus epidermidis*: a systematic review. **GMS Hyg Infect Control**. v.9, n.3, 2014.

NEMEGHAIRE S, VANDERHAEGHEN W, ARGUDÍN MA, et al. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus sciuri* isolates from industrially raised pigs, cattle and broiler chickens. **J Antimicrob Chemother** v.69, n.11, p. 2928-2934, 2014.

NILSSON, O. Vancomycin resistant enterococci in farm animals – occurrence and importance. **Infect Ecol Epidemiol.** v.2, p.16.959, 2012.

NOGUEIRA-JUNIOR, C. et al. Characterization of epidemiological surveillance systems for healthcare-associated infections (HAI) in the world and challenges for Brazil. **Cad Saude Publica.** v. 30, n.1, p.11-20, 2014.

NOWAKIEWICZ, A. et al. Characterization of Multidrug Resistant *E. faecalis* Strains from Pigs of Local Origin by ADSRRS-Fingerprinting and MALDI -TOF MS; Evaluation of the Compatibility of Methods Employed for Multidrug Resistance Analysis. **PLoS One.** v.12, n.1, 2017.

O'HARA, F.P. et al. *spa* Typing and Multilocus Sequence Typing Show Comparable Performance in a Macroeidemiologic Study of *Staphylococcus aureus* in the United States. **Microb Drug Resist.** v.22, n.1, p.88-96, 2016.

OLIVE, D. M.; BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **J. Clin. Microbiol.** v.37, p.1661-1669, 1999.

OLIVEIRA, A.C.; DE PAULA, A. Descolonização de portadores de *Staphylococcus aureus*: indicações, vantagens e limitações. **Texto contexto enferm.** v.21, n.2, 2012.

ØSTERGAARD, C.; HANSEN, S.G.; MØLLER, J.K. Rapid first-line discrimination of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains using MALDI-TOF MS. **Int J Med Microbiol.** v.305, n.8, p.838-847, 2015.

OTTER, J.A.; YEZLI, S.; FRENCH, G.L. The role played by contaminated surfaces in the transmission of nosocomial pathogens. **Infect Control Hosp Epidemiol.** v.32, p.687-699, 2011.

OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis* – the “accidental” pathogen. **Nat Rev Microbiol.** v.7, n.8, p. 555-567, 2009.

PADOVEZE, M.C.; FORTALEZA, C. Healthcare-associated infections: challenges to public health in Brazil. **Rev Saude Publica.** v.4, n.6, p.995-1001, 2014.

PASTERNAK, J. Novas metodologias de identificação de micro-organismos: MALDI-TOF. **Einstein (São Paulo).** v.10, n.1, 2012.

PATEL, R. et al. Determination of 16S rRNA Sequences of Enterococci and Application to Species Identification of Nonmotile *Enterococcus gallinarum* Isolates. **J Clin Microbiol.** v.36, n.11, p.3399-3407, 1998.

PATERSON, G.K.; HARRISON, E.M.; HOLMES, M.A. The emergence of *mecC* methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **Trends Microbiol.** v.22, n.1, p.42-47, 2014.

PIERI, F.A. et al. Phenotypic and Molecular Aspects of *Staphylococcus* spp. Isolated from Hospitalized Patients and Beef in the Brazilian Amazon. **Foodborne Pathog Dis.** v.13, n.3, p.128-134, 2016.

PINA, E. et al. Infecções associadas aos cuidados de saúde e segurança do doente. **Revista Portuguesa de Saúde Pública,** v. 10, p. 27-39, 2010.

PITTET, D. et al. Infection control as a major World Health Organization priority for developing countries. **J Hosp Infect.** v. 68, n.4, p.285-292, 2008.

POMPILIO, A. et al. New insights in *Staphylococcus pseudintermedius* pathogenicity: antibiotic-resistant biofilm formation by a human wound-associated strain. **BMC Microbiol.** v.15, n.109, 2015.

POYART, C. et al. Rapid and accurate species-level identification of coagulase-negative staphylococci by using the *sodA* gene as a target. **J Clin Microbiol.** v.39, p.4296–4301, 2001.

QUINTELA-BALUJA, M. et al. Characterization of different food-isolated *Enterococcus* strains by MALDI-TOF mass fingerprinting. **Electrophoresis**. v.34, n.15, p.2240-2250, 2013.

RIBAS, R.M. et al. Vancomycin-resistant *vanA* phenotype *Enterococcus faecalis*: first case in Minas Gerais state and epidemiological considerations. **Braz J Infect Dis**. v.11, n.4, p.439-440, 2007.

RHOADS, D.D. et al. The presence of a single MALDI-TOF mass spectral peak predicts methicillin resistance in staphylococci. **Diagn Microbiol Infect Dis**. v. 86, n.3, p.257-261, 2016.

RODRIGUES, A.M. **Ocorrência e Caracterização de Espécies Patogênicas do Gênero Staphylococcus em Artigos Médicos e Profissionais de Saúde em duas Unidades Básicas de Saúde no Município do Rio de Janeiro, no período de 2009 a 2011**. Tese (Mestrado em Vigilância Sanitária) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro, 2011.

RODRIGUEZ, M. et al. Discriminatory Indices of Typing Methods for Epidemiologic Analysis of Contemporary *Staphylococcus aureus* Strains. **Medicine (Baltimore)**. v.94, n.37, 2015.

ROZENBAUM, R. et al. The first report in Brazil of severe infection caused by community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). **Braz J Med Biol Res**. v.42, n.8, p.756-760, 2009.

SACRAMENTO, A.G. **Caracterização molecular de Enterococcus spp. resistentes à vancomicina em amostras clínicas, ambientes aquáticos e alimentos**. Tese (Doutorado em Farmácia) - Universidade de São Paulo, Programa de Pós-graduação em Farmácia, São Paulo, 2015.

SANDRIN, T.R.; GOLDSTEIN, J.E.; SCHUMAKER, S. MALDI TOF MS profiling of bacteria at the strain level: a review. **Mass Spectrom Rev.** v.32, n.3, p.188-217, 2013.

SANTOS, A.A.M. **O modelo brasileiro para o controle das infecções hospitalares após vinte anos de legislação, onde estamos e para onde vamos?** Tese de Mestrado. Belo Horizonte, Faculdade de Medicina da UFMG, 2006.

SANTOS, T. et al. Use of MALDI-TOF mass spectrometry fingerprinting to characterize *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* isolates. **Journal of Proteomics.** v.127, p.321-331, 2015.

SAUGET, M. et al. Can MALDI-TOF Mass Spectrometry Reasonably Type Bacteria?. **Trends Microbiol.** v.16 p.30212-30218, 2017.

SCHLEBUSCH, S. et al. MALDI-TOF MS meets WGS in a VRE outbreak investigation. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.** v. 36, n.3, p.495-499, 2017.

SCHLEIFER, K.H.; BELL, J.A. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume 3: The Firmicutes**, Springer, 2009, p. 392-426.

SEONG, H.; JIN, M.; CHAN-HEE, J. Receiver Operating Characteristic (ROC) Curve: Practical Review for Radiologists. **Korean J Radiol.** v.5, n.1, p.11-18, 2004.

SHARMA-KUINKEL, B.K. et al. Potential Influence of *Staphylococcus aureus* Clonal Complex 30 Genotype and Transcriptome on Hematogenous Infections. **Open Forum Infect Dis.** v.2, n.3, p.ofv098, 2015.

SHARP, S.E.; SEARCY, C. Comparison of Mannitol Salt Agar and Blood Agar Plates for Identification and Susceptibility Testing of *Staphylococcus aureus* in Specimens from Cystic Fibrosis Patients. **J Clin Microbiol.** v.44, n.12, p.4545-4546, 2006.

SHITTU, A. et al. Identification and molecular characterization of mannitol salt positive, coagulase-negative staphylococci from nasal samples of medical personnel and students. **Journal of Medical Microbiology**. v.55, p.317-324, 2006.

SHORE, A.C. et al. Detection of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Type XI Carrying Highly Divergent *mecA*, *mecI*, *mecR1*, *blaZ*, and *ccr* Genes in Human Clinical Isolates of Clonal Complex 130 Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob Agents Chemother**. v.55, n.8, p.3765-3773, 2011.

SIEGEL, J. D. et al. Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. **American Journal of Infection Control**. v. 35, n. 10, p.65-164, 2007.

SILVA, W.P. et al. Identification of *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius* and *S. hyicus* by PCR amplification of *coa* and *nuc* genes. **Braz. J. Microbiol**. v.34, n.1, p.125, 2003.

SILVEIRA, A.C.O.; D'ACEVEDO, P.A. *Staphylococcus lugdunensis*: a different view in the clinical laboratory. **J Bras Patol Med Lab**. v.47, n.2, 2011.

SILVEIRA, A.C.O. et al. MRSA from Santa Catarina State, Southern Brazil: intriguing epidemiological differences compared to other Brazilian regions. **Braz J Infect Dis**. v.19, n.4, 384-389, 2015a.

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, 2015b.

SINGHAL, N. et al. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. **Front Microbiol**. v.6, p. 791, 2015.

SIVERTSEN, A. et al. A Silenced *vanA* Gene Cluster on a Transferable Plasmid Caused an Outbreak of Vancomycin-Variable Enterococci. **Antimicrob Agents Chemother.** v.60, n.7, p.4119-4127, 2016.

SMITH, T.C. Livestock-Associated *Staphylococcus aureus*: The United States Experience. **PLoS Pathog.** v.11, n.2, 2015.

SOERGEL, D.A. et al. Selection of primers for optimal taxonomic classification of environmental 16S rRNA gene sequences. **ISME J.** v.6, n.7, p.1440-1444, 2012.

SOUSA-JUNIOR, F.C. et al. Genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates obtained in the Northeast region of Brazil. **Braz J Med Biol Res.** v.42, p.877-881, 2009.

SPINALI, S. et al. Microbial typing by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: do we need guidance for data interpretation?. **J Clin Microbiol.** v.53, n.3, p.760-765, 2015.

SRINIVASAN, R. et al. Use of 16S rRNA Gene for Identification of a Broad Range of Clinically Relevant Bacterial Pathogens. **PLoS One.** v.10, n.2, 2015.

STEENSELS, D. et al. MALDI-TOF MS typing of a nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* outbreak in a neonatal intensive care unit. **Acta Clin Belg.** v.24, p.1-7, 2016.

SUZUKI, M. et al. Identification of the clonal complexes of *Staphylococcus aureus* strains by determination of the conservation patterns of small genomic islets. **J Appl Microbiol.** v.107, n.4, p.1367-1374, 2009.

SZABADOS, F. et al. The matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) based protein peaks of 4448 and 5302 Da are not associated with the presence of Pantone-Valentine leukocidin. **Int J Med Microbiol.** v. 301, n.1, p.58-63, 2011.

TENOVER, F.C. et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **J Clin Microbiol.**v.33, n.9, p.2233-2239, 1995.

TEIXEIRA, M.M. et al. Emergence of clonal complex 5 (CC5) methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates susceptible to trimethoprim-sulfamethoxazole in a Brazilian hospital. **Braz J Med Biol Res.** v.45, n.7, p.637-643, 2012.

TONG, S.Y. et al. *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. **Clin Microbiol Rev.** v.28, n.3, p.603-661, 2015.

TSAI, J.C. et al. Identification of Clinically Relevant *Enterococcus* Species by Direct Sequencing of *groES* and Spacer Region. **J Clin Microbiol.** v.43, n.1, p.235-241, 2005.

UDO, E.E.; BOSWIHI, S.S.; AL-SWEIH, N. High prevalence of toxic shock syndrome toxin-producing epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* 15 (EMRSA-15) strains in Kuwait hospitals. **New Microbes New Infect.** v.12, p.24-30, 2016.

UEDA, O. et al. Development of a novel matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrum (MALDI-TOF-MS)-based typing method to identify methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones. **J Hosp Infect.** v.90, n.2, p.147-155, 2015.

VAN RIJEN, M. et al. Mupirocin ointment for preventing *Staphylococcus aureus* infections in nasal carriers. **Cochrane Database Syst Rev.** v. 8, n.4, 2008.

VAN HOOVELS, L. et al. First Case of *Staphylococcus pseudintermedius* Infection in a Human. **J Clin Microbiol.** v. 44, n.12, p.4609-4612, 2006.

VELOO, A.C. et al. The influence of incubation time, sample preparation and exposure to oxygen on the quality of the MALDI-TOF MS spectrum of anaerobic bacteria. **Clin Microbiol Infect.** v.20, n.12, p.O1091-O1097, 2014.

VON EIFF, C.; PETERS, G.; HEILMANN, C. Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. **Lancet Infect Dis.** v.2, n.11, p.677-685, 2002.

WAGNER, J. et al. Evaluation of PacBio sequencing for full-length bacterial 16S rRNA gene classification. **BMC Microbiol.** v.16, n.1, p.274, 2016.

WALKER, J. et al. Intact cell mass spectrometry (ICMS) used to type methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: media effects and inter-laboratory reproducibility. **J Microbiol Methods.** v.48, n.2-3, p.117-126, 2002.

WANG, Y.; QIAN, P. Conservative Fragments in Bacterial 16S rRNA Genes and Primer Design for 16S Ribosomal DNA Amplicons in Metagenomic Studies. **PLoS ONE.** v.4, n.10, 2009.

WEI, W. et al. Application of matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry in the screening of *vanA*-positive *Enterococcus faecium*. **Eur.J. Mass Spectrom.** v.20, p.461-465, 2014.

WERNER, G.; KLARE, I.; WITTE, W. The current MLVA typing scheme for *Enterococcus faecium* is less discriminatory than MLST and PFGE for epidemic-virulent, hospital-adapted clonal types. **MC Microbiology.** v.7, p.28, 2007.

WERTHEIM, H.F. et al. Associations between *Staphylococcus aureus* genotype, infection, and in-hospital mortality: a nested case-control study. **J Infect Dis.** v.192, p.1196-1200, 2005.
WHITELAW, A. C. et al. Role of infection control in combating antibiotic resistance. **South African Medical Journal.** v.105, n.5, p. 421-424, 2015.

WHO. World Health Organization. **National and State Healthcare Associated Infections: Progress Report**. 2016.

WOLTERS, M. et al. MALDI-TOF MS fingerprinting allows for discrimination of major methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineages. **J. Med. Microbiol.** v.301, p.64-68, 2011.

ZHANG, R. et al. Prevalence of multidrug resistant Gram-positive cocci in a Chinese hospital over an 8-year period. **Int J Clin Exp Med.** v.8, n.6, p.9462–9469, 2015.

ZHANG, T. et al. Analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* major clonal lineages by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS). **J Microbiol Methods.** v.117, p.122-127, 2015.

ZHENG, W. et al. An accurate and efficient experimental approach for characterization of the complex oral microbiota. **Microbiome.** v.3, p.48, 2015.