

Yan Rodrigues de Oliveira Moura Batista

**Linhagens de *Staphylococcus aureus* Resistentes à
Meticilina Envolvidas em Infecções na Corrente Sanguínea
em Pacientes Internados em Hospitais do Grande Rio e
Região Serrana, no período de 2016 a 2018**



**Monografia apresentada ao Instituto de
Microbiologia Paulo de Góes, da
Universidade Federal do Rio de Janeiro,
como pré-requisito para a obtenção do
grau de Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia.**

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO
MARÇO / 2022**

Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia Médica, do Instituto Paulo de Góes, UFRJ, sob Orientação do Professor Leonardo Rocchetto Coelho e Coorientação da Professora Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho.

FICHA CATALOGRAFICA**CIP - Catalogação na Publicação**

RB3331 Rodrigues de Oliveira Moura Batista, Yan

Linhagens de *Staphylococcus aureus* Resistentes à Meticilina Envolvidas em Infecções na Corrente Sanguínea em Pacientes Internados em Hospitais do Grande Rio e Região Serrana, no Período de 2016 a 2018.

/ Yan Rodrigues de Oliveira Moura Batista. -- Rio de Janeiro, 2022. 55 f.

Orientador: Leonardo Rocchetto Coelho. Coorientador: Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho. Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia, 2022.

1. MRSA. 2. Complexo clonal. 3. MLST. 4. Infecções na corrente sanguínea. I. Rocchetto Coelho, Leonardo, orient. II. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho. coorient.

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO**

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO NO RCS DE
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO, BACHARELADO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA**

ALUNO: **Yan Rodrigues de Oliveira Moura Batista**
DRE: 118105661

BANCA EXAMINADORA: Profa. Marcia Giambiagi de Marval (Presidente)
Dra. Caroline Lopes Martini
M.Sc. Alice Slotfeldt Viana
Profa. Tatiana de Castro Abreu Pinto (Suplente)

Título da Monografia: **“Linhagens de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina envolvidas em infecções na corrente sanguínea em pacientes internados em hospitais do Grande Rio e Região Serrana, no período de 2016 a 2018”**


Local: Sala virtual <https://meet.google.com/otx-iwba-tak>
Data e hora de início: **10 de março de 2022 às 14:00h**

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota **10 (dez)** neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelo presidente da banca examinadora, aluno, orientador (ou coorientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 10 de março de 2022.

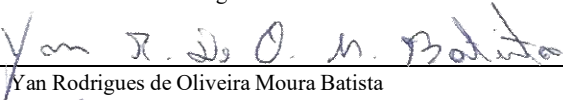
NOTA	Banca Examinadora:
<u>10</u>	Profa. Marcia Giambiagi de Marval
<u>10</u>	Dra. Caroline Lopes Martini
<u>10</u>	M.Sc. Alice Slotfeldt Viana
<u> </u>	Profa. Tatiana de Castro Abreu Pinto

Presidente da banca




Profa. Marcia Giambiagi de Marval

Aluno:




Yan Rodrigues de Oliveira Moura Batista

Orientador:

Prof. Leonardo Rocchetto Coelho / Coorientador: Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

Coordenador
de TCC



Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e a meus pais Dilma e Denilson, pelo auxílio e por todo o suporte necessário para ter chegado até aqui, seja financeiro ou emocional. Por todo amor e afeto que me dão. Fatores essenciais para um bom desempenho acadêmico, o que infelizmente é um privilégio sobre muitos. Agradeço também por sempre me ensinarem que a educação é o melhor caminho e por incentivarem minhas ambições acadêmicas, o que me motiva a prosseguir mesmo em um país onde a academia é desvalorizada. Agradeço a minha falecida avó Rosa, por me ensinar que “o saber nunca ocupa espaço”. Agradeço ao meu irmão Thiago por me motivar a ser um exemplo e por ser meu melhor amigo. Aos meus orientadores, Leo, por estar sempre disponível e disposto a me orientar, mesmo durante as folgas e/ou madrugadas. Agnes pelos “puxões de orelha”, tão necessários para meu amadurecimento científico, e por ser incansável ao ensinar deixando evidente seu amor à docência. E a Bernadete por ter me apresentado ao curso e ao Leo, e por ter me assistido como um filho, sempre com carinho em todas as vezes que recorri a ela.

Agradeço a todos os meus “amigos”, Millena, Ana, João, Laryssa, Adriane, Glauber, Flavia, Mariane, Juliana, Amanda e Giovanna que tornaram mais leve e divertida toda essa jornada, me fazendo sempre rir, e me ensinando a amar e respeitar pessoas diferentes de mim.

Aos meus amigos de longa data Gustavo, João Vitor, João Carlos, Gabriel, Lucas, Renan e Larissa por crescerem junto comigo e por sempre me apoiarem e ouvirem.

Aos meus amigos do BMB, Cícera, Matheus, Carol, Alice, Lais, Marquinhos, Bruno, Thais, Deborah, Isis e Mari, por terem me acolhido e por se mostrarem sempre dispostos e pacientes ao me ensinar e ajudar em minhas tarefas.

A todos os aqui citados meus mais sinceros agradecimentos, pois me ensinaram, de alguma forma, coisas que foram necessárias não apenas para o meu amadurecimento acadêmico, mas também pessoal.

Por fim, agradeço ao DASA, por nos cederem as amostras clínicas, ao CNPq/UFRJ pela bolsa de Iniciação Científica PIBIC, e aos professores e funcionários do IMPG/UFRJ.

EPÍGRAFE

Meus passos vêm de longe e me trouxeram aqui.

-Djonga

RESUMO

Yan Rodrigues de Oliveira Moura Batista

Linhagens de *Staphylococcus aureus* Resistentes à Meticilina Envolvidas em Infecções na Corrente Sanguínea em Pacientes Internados em Hospitais do Grande Rio e Região Serrana, no Período de 2016 a 2018

**Orientador: Leonardo Rocchetto Coelho
Coorientadora: Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho**

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Staphylococcus aureus é um microrganismo comum na microbiota humana, colonizando principalmente as narinas anteriores e outras regiões do hospedeiro, como a pele. Porém, estudos apontam *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) como um dos principais agentes envolvidos em bacteremias no ambiente nosocomial. Um dos aspectos mais intrigantes da epidemiologia e evolução de MRSA é a estrutura clonal de sua população, tornado complexa a identificação de linhagens. Adicionalmente, MRSA pode sofrer alternância clonal. Tal fenômeno ocorre quando um clone de MRSA substitui outro anteriormente prevalente, em uma determinada região. No Rio de Janeiro, o BEC (clone epidêmico brasileiro; linhagem ST239(CC8)-SCCmecIII) foi o primeiro clone de MRSA descrito. Posteriormente, um clone relacionado ao USA400 (ST1(CC1)-SCCmecIV) suplantou o BEC em pelo menos 03 hospitais do Rio de Janeiro. Mais recentemente, estudos demonstraram a emergência no país, incluindo no Rio de Janeiro, de cepas de MRSA relacionadas aos clones NY/Japan (ST5(CC5)-SCCmecII) e pediátrico (ST5(CC5)-SCCmecIV). O objetivo deste trabalho foi analisar amostras de MRSA isoladas de bacteremias de pacientes internados em hospitais do Grande Rio e Região Serrana, visando avaliar a linhagem predominante em bacteremias. As cepas de MRSA foram identificadas como *S. aureus* através dos testes de rotina. Para a caracterização molecular dos complexos clonais (CC) de MLST utilizamos os testes de restrição e modificação (testes RM) e a tipagem de SCCmec. O teste de susceptibilidade aos antimicrobianos foi realizado utilizando o VITEK-2, um teste automatizado. Nossos resultados demonstraram um claro predomínio da linhagem CC5-SCCmecII (78,4%; n=58/74), a qual foi isolada em 18 dos

23 (78,3%) hospitais analisados. A segunda linhagem mais frequente foi CC5-SCC*mecIV* (17,6%; n=13/74) que foi detectada em 9 hospitais (12,2%). A linhagem CC1-SCC*mecIV*, anteriormente prevalente em hospitais do Rio de Janeiro, apareceu somente em uma amostra. Também foram isoladas uma amostra CC30-SCC*mecIV* e outra CC8-SCC*mecIV*, relacionadas aos clones de CA-MRSA conhecidos como OSPC (Oceania-Southwest Pacific) e USA300; respectivamente. Também importante é o fato de que amostras de MRSA predominantes em bacteremias (CC5-SCC*mecII*) apresentaram maior frequência de multirresistência aos antimicrobianos. Uma das amostras multirresistentes CC5-SCC*mecII* apresentou também resistência à vancomicina e teicoplanina pelo VITEK-2; porém, o tipo de resistência (VISA ou VRSA) ainda necessita ser caracterizado. Portanto, nossos dados apontam para a presença de um clone predominante em bacteremias em hospitais da cidade do Rio e adjacências, em amostras obtidas no período de 2016 a 2018. Tais dados corroboram estudos prévios, de nosso grupo, que apontaram cepas do clone ST105(CC5)-SCC*mecII* como as mais frequentes em bacteremias nesta região; porém, os dados anteriores, foram obtidos de amostras de diferentes origens (sangue e outros sítios), sendo também a maioria, de anos anteriores àquelas aqui estudadas. Assim, a partir desses dados é relevante se pesquisar o porquê do predomínio dessa linhagem em bacteremia nesta região. É ainda de suma importância avaliar o seu potencial patogênico, bem como verificar se as mesmas são capazes de agravar o prognóstico das bacteremias por MRSA em hospitais desta região.

Palavras-chave: MRSA, complexo clonal, MLST, testes RM, infecções na corrente sanguínea

ABSTRACT

Yan Rodrigues de Oliveira Moura Batista

Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Lineages Involved in Blood Stream Infections in Patients Hospitalized in Grande Rio and Region Serrana Hospitals, from 2016 to 2018

Orientador: Leonardo Rocchetto Coelho

Coorientadora: Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Staphylococcus aureus is a common microorganism in the human microbiota, colonizing mainly the anterior nares and in other regions, such as the skin. However, studies indicated methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) as one of the main agents involved in bacteremia in the hospital environment. One of the most intriguing aspects of the epidemiology and evolution of MRSA is the clonal structuring of its population, making the identification of lineages a complex task. Additionally, MRSA can undergo clonal wave. Such phenomenon occurs when an MRSA clone emerges and replaces a previous predominant one in a certain region. In Rio de Janeiro, BEC (Brazilian epidemic clone; ST239(CC8)-SCC*mec*III lineage) was the first MRSA clone described. Subsequently, a clone related to USA400 (ST1(CC1)-SCC*mec*IV) replaced BEC in at least three hospitals in Rio de Janeiro. More recently, studies reported the emergence in Brazil, including Rio de Janeiro, of MRSA strains related to clones NY/Japan (ST5(CC5)-SCC*mec*II) and pediatric (ST5(CC5)-SCC*mec*IV). The aim of this study was to analyze MRSA isolates from patients with bacteremia admitted to hospitals in the Grande Rio and adjacencies to assess the predominant MRSA lineage in bacteremia. MRSA strains were identified as *S. aureus* by routine methods. For the molecular characterization of MLST clonal complexes (CC) we used restriction and modification (RM) tests and SCC*mec* typing. The antimicrobial susceptibility test was performed using an automated test, the VITEK-2. Our results showed a clear predominance of the CC5-SCC*mec*II lineage (78.4%; n=58/74), which was isolated in 18 of the 23 (78.3%) hospitals analyzed. The second most

frequent lineage was CC5-SCC*mecIV* (17.6%; n=13/74), which was detected in 9 hospitals (12.2%). The CC1-SCC*mecIV* lineage, previously prevalent in hospitals in Rio de Janeiro, corresponded to only one isolate. One isolate CC30-SCC*mecIV* and another CC8-SCC*mecIV* related to the CA-MRSA clones known as OSPC (Oceania-Southwest Pacific; ST30(CC30)-SCC*mecIV*) and USA300 (ST8(CC8)-SCC*mecIV*) were also detected; respectively. Also important is the fact that the isolates predominant in bacteremia (CC5-SCC*mecII*) showed a higher frequency of multidrug resistance. One of the multidrug-resistant CC5-SCC*mecII* isolate also showed resistance to vancomycin and teicoplanin by VITEK-2; however, the type of resistance (VISA or VRSA) still needs to be characterized. Therefore, our data point to the presence of a predominant MRSA clone in bacteremia in hospitals in Rio de Janeiro city and surrounding areas, in isolates obtained from 2016 to 2018. These data corroborate previous studies by our group showing a clone of the ST105(CC5)-SCC*mecII* lineage as the most frequent in bacteremia in this region; however, previous data were obtained from samples from different sources (blood and other sites), and most of them were from years prior to those studied here. Thus, based on these data, it is relevant to investigate the reason for the predominance of this lineage in bacteremia in this region. It is still very important to evaluate their pathogenic potential, as well as to verify if they can worsen the prognosis of MRSA bacteremia.

Keywords: MRSA, clonal complexes, MLST, RM Tests, bloodstream infections.

RESUMO PARA LEIGOS

Yan Rodrigues de Oliveira Moura Batista

Linhagens de *Staphylococcus aureus* Resistentes à Meticilina Envolvidas em Infecções na Corrente Sanguínea em Pacientes Internados em Hospitais do Grande Rio e Região Serrana, no Período de 2016 a 2018

Orientador: Leonardo Rocchetto Coelho

Coorientadora: Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

Resumo em linguagem leiga da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) é uma bactéria comumente presente em determinadas partes do corpo humano e, normalmente, não causa doenças em indivíduos saudáveis. Entretanto, devido ao intenso uso de antibióticos, principalmente em hospitais, essa bactéria se tornou resistente aos mesmos, incluindo ao antibiótico meticilina. *S. aureus* que são resistentes à meticilina são conhecidos como MRSA. MRSA é frequentemente detectada em hospitais e pode apresentar resistência não apenas à meticilina, mas a vários antibióticos. MRSA é um dos principais agentes de infecções em hospitais, principalmente, em pacientes mais debilitados, como aqueles internados em unidades de terapia intensiva (UTI). Nos hospitais essa bactéria pode causar infecções muito graves, como as infecções na corrente sanguínea. Amostras de MRSA podem se diferenciar uma das outras em várias características e, por isso, são classificadas em diferentes linhagens. Além disso, dentro de uma mesma linhagem pode haver diferenças importantes, e o conjunto de uma célula diferente com seus descendentes é chamado de clone. Com base nesse conhecimento, várias técnicas foram desenvolvidas para permitir a identificação de linhagens e de clones de MRSA que circulam pelos hospitais. Identificar tais linhagens é importante, uma vez que microrganismos de uma mesma linhagem ou clone apresentam, geralmente, resistência aos mesmos tipos antibióticos, e ao conhecer esses padrões de resistência, os médicos poderão aplicar o antibiótico mais eficaz para tratar seus pacientes. Neste estudo nós utilizamos duas técnicas envolvendo análises de DNA, as quais permitem a

classificação de MRSA em linhagens, visando caracterizar amostras obtidas de pacientes com infecção na corrente sanguínea, no Grande Rio e Região Serrana, de 2016 a 2018. Nossos resultados mostram que uma certa linhagem de MRSA (classificada como CC5-SCC*mecII*) foi a mais isolada de infecção na corrente sanguínea, na grande maioria dos 23 hospitais do Grande Rio e Região Serrana, a ponto de corresponder a 78,4% das amostras estudadas; ou seja, de cada 100 pacientes com infecção na corrente sanguínea em cerca de 78 esta será causada pela linhagem de MRSA denominada CC5-SCC*mecII*. Esse resultado é preocupante porque essa linhagem de MRSA predominante apresenta, com muita frequência, resistência a vários antibióticos, o que pode ser um fator negativo para o sucesso do tratamento do paciente. Finalmente, mais estudos são necessários para descobrir se as infecções por MRSA dessa linhagem seriam mais graves que as causadas por outras linhagens de MRSA; ou seja, se a linhagem CC5-SCC*mecII* estaria provocando um maior número de mortes nos hospitais. Além disso, pretendemos investigar o porquê desse MRSA, CC5-SCC*mecII*, causar mais infecções na corrente sanguínea em comparação a outras linhagens de MRSA que são muito semelhantes à CC5-SCC*mecII*, mas que são muito menos comuns em infecção na corrente sanguínea. Estudos como este são importantes para o controle e tratamento de infecções nos hospitais, de modo que ocorram menos mortes por essas doenças em nossos hospitais.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CA- MRSA: *Staphylococcus aureus* associados à infecções na comunidade

CC: Complexo Clonal

CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*

HA- MRSA: *Staphylococcus aureus* associados à infecções hospitalares

MLST: *Multilocus Sequence Typing*

MRSA: *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*

MSSA: *Methicillin-susceptible Staphylococcus aureus*

PBP: *Penicillin-binding Protein*

PFGE: *Pulsed Field Gel Electrophoresis*

PVL: *Panton-Valentine leukocidin*

RM: *Restriction modification*

S. aureus: *Staphylococcus aureus*

SCCmec: *Staphylococcal Cassette Chromosome mec*

SI: Sistema Imune

VRSA: *Vancomycin-Resistant Staphylococcus aureus*

PCR : *Polymerase Chain Reaction*

TE: Tris EDTA

TAE: Tris-Acetato-EDTA

ST: *Sequence Typing*

ICS : Infecção na corrente sanguínea

ÍNDICE

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
RESUMO PARA LEIGOS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Gênero <i>Staphylococcus</i>	1
1.2 <i>Staphylococcus</i> subespécie <i>aureus</i>	1
1.3 <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à meticilina	2
1.4 Clones de <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à meticilina associados às infecções hospitalares (HA-MRSA)	5
1.4.1 Clones de HA-MRSA associados às infecções sanguíneas	7
1.5 Clones de <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à meticilina associados à comunidade (CA-MRSA)	9
2. JUSTIFICATIVA	10
3. OBJETIVOS	11
3.1 Objetivos específicos	12
4. MATERIAIS E MÉTODOS	12
4.1 Amostras de <i>S. aureus</i> isoladas de bacteremias	12
4.2 Triagem das amostras de <i>S. aureus</i> quanto a resistência à meticilina	12
4.3 Identificação das amostras de <i>S. aureus</i>	13
4.3.1 Coloração de Gram	13
4.3.2 Teste para catalase	14
4.3.3 Teste para coagulase	14
4.4 Análise do perfil de susceptibilidade das amostras de <i>S. aureus</i> aos antimicrobianos	14
4.5 Extração de DNA	15
4.6 Amplificação de fragmentos de DNA através da reação em cadeia de polimerase	15
4.6.1 Amplificação do gene <i>mecA</i> e <i>SCCmec</i>	16
4.6.2 Testes RM	17
4.7 Eletroforese em gel de agarose 1,5%	18
4.8 Análise dos dados clínicos dos pacientes	18
4.9 Análise estatística	18

5. RESULTADOS	18
5.1 Distribuição geográfica das amostras de MRSA isoladas de bacteremia no Grande Rio e Região Serrana	18
5.2 Distribuição de SCC <i>mec</i> nas amostras de MRSA isoladas de bacteremia	19
5.3 Distribuição dos complexos clonais nas amostras de MRSA isoladas de bacteremia	20
5.4 Distribuição das linhagens de amostras de MRSA isoladas de bacteremia	21
5.5 Distribuição das linhagens de MRSA isoladas de bacteremias nas regiões do Grande Rio e Serrana	21
5.6 Distribuição das linhagens de MRSA isoladas de bacteremias de acordo com as faixas etárias dos pacientes	23
5.7 Distribuição das linhagens de MRSA isoladas de bacteremias de acordo com o gênero dos pacientes	24
5.8 Perfil de resistência aos antimicrobianos	25
6. DISCUSSÃO	25
7. CONCLUSÃO	30
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	31
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
ANEXOS	38

1. INTRODUÇÃO

1.1 Gênero *Staphylococcus*

O gênero *Staphylococcus* é composto por bactérias esféricas de aproximadamente 0,5µm a 1,5µm de diâmetro, produtoras da enzima catalase, anaeróbias facultativas e pertencentes à família *Staphylococcaceae* (Schleifer & Bell, 2010). Durante a fissão binária *Staphylococcus* dividem-se em três planos perpendiculares alternados e, normalmente, as células, permanecem aderidas umas às outras após a divisão mitótica (Tzagoloff & Novick, 2015). São bactérias Gram-positivas, quando observadas através de microscópio óptico, após serem coradas pela coloração de Gram, encontram-se a maioria das células agrupadas morfologicamente, semelhantes a cachos de uvas. O prefixo *Staphylo*, vem de “*staphylé*” do grego, que significa cachos de uvas e “*coccus*” significa baga (pequena fruta).

1.2 *Staphylococcus aureus* subespécie *aureus*

Dentre as 63 espécies de *Staphylococcus*, *Staphylococcus aureus* é um microrganismo comumente presente na microbiota humana, mais frequente nas fossas nasais e em outras regiões da pele (dobras, fossa cubital, axilas e virilhas). Todavia, *S. aureus* possui diversos fatores de virulência que auxiliam desde a adesão à matriz extracelular do hospedeiro, até a evasão do sistema imune (SI). *Staphylococcus aureus* apresenta duas subespécies, a subespécie *anaerobius* e a subespécie *aureus*. A subespécie *anaerobius* se diferencia da subespécie *aureus* por ser anaeróbia estrita e negativa para a enzima catalase (Murray *et al.*, 2003). No entanto, o *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (frequentemente referido como *Staphylococcus aureus*) é a única espécie do gênero *Staphylococcus* encontrada em humanos, produtora da enzima coagulase e, portanto, se diferenciando das demais espécies desse gênero conhecidas como estafilococos coagulase-negativos (Murray *et al.*, 2003). É importante salientar que neste trabalho quando mencionado “*S. aureus*” é referente apenas a *Staphylococcus aureus* subespécie *aureus*.

Já foram descritos na literatura diversos fatores de virulência para *S. aureus*, entre eles estão moléculas de superfície, fatores que auxiliam na evasão do SI e toxinas (Cheung *et al.*, 2021). Com os mais variados fatores de virulência, *S. aureus* é um patógeno oportunista. Em

consequência disso, os *Staphylococcus aureus* são considerados importantes agentes de infecções hospitalares e comunitárias em todo o mundo. Estudos mostram que a redução da carga bacteriana de *S. aureus* na fossa nasal de pacientes cirúrgicos diminui as chances de ocorrer infecção hospitalar causada por este microrganismo (Byrd, Belkaid & Segree, 2018). Diversas pesquisas sobre infecções ocorrida na corrente sanguínea de pacientes internados em hospitais apontam *S. aureus* como um dos principais causadores de bacteremias neste ambiente, sendo inclusive em alguns hospitais, até mais frequentemente isolados em casos clínicos que bactérias Gram-negativas, e com potencial letal para pacientes com alguma doença de base, comorbidades ou debilitados (Dreyfus *et al.*, 2021).

1.3 *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA)

Em 1941 a penicilina foi introduzida no mercado farmacêutico como medida terapêutica contra infecções bacterianas. O anel β -lactâmico da penicilina possui alta afinidade molecular pela a *Penicillin-binding Protein* (PBP), uma transpeptidase responsável pela síntese da parede celular de *S. aureus* e de algumas outras bactérias. Essa afinidade permite que o anel β -lactâmico se conjugue a PBP, provocando a inibição da síntese da parede, tendo como consequência a morte celular (Wright, 1999).

A penicilina como nova medida terapêutica diminuiu a taxa de mortes por infecções bacterianas e contribuiu para o aumento da expectativa de vida, mas seu uso exacerbado teve como consequência a pressão seletiva sobre cepas circulantes de *S. aureus* naquele momento. Com isso, no ano seguinte, já começaram a ser mais frequentes cepas de *S. aureus* contendo um plasmídeo que codifica uma enzima β -lactamase (ou penicilinase), que possui potencial para hidrolisar o anel β -lactâmico. (Wright, 1999).

Para combater essas cepas resistentes foi introduzida no mercado em 1959 a meticilina e, logo a seguir, em 1961 foram descritas as primeiras cepas resistentes à meticilina, os MRSA (Enright *et al.*, 2002). Essas cepas carregam o Cassete Cromossômico Estafilocócico *mec* (SCC*mec*), um elemento genético móvel que é uma ilha genômica de resistência, por abrigar diversos genes que podem contribuir para a resistência aos antimicrobianos (Katayama, Ito & Hiramatsu, 2000).

O SCC*mec* está localizado em uma região do cromossomo de MRSA chamada *attB_{scc}*. Dentro do SCC*mec* existe uma região denominada J (de *Junkyard*), tal região além de possuir genes que concedem resistência a outras classes de antimicrobianos não β -lactâmicos, apresenta

variações genéticas, sendo úteis na tipagem do SCC*mec* (Kondo *et al.*, 2007). O SCC*mec*, abriga o gene *mecA*, seus reguladores *mecI* e *mecRI* e também os genes do complexo *ccr*. Os genes da recombinase cromossômica do cassete (*ccr*), são componentes presentes no SCC*mec* e estão envolvidos na integração e excisão de SCC*mec* no cromossomo de MRSA (Shore *et al.*, 2011). Até o momento, cinco variantes do gene *ccr* foram descritas na literatura (*ccrA1B1*, *ccrA2B2*, *ccrA3B3*, *ccrA4B4* e *ccrC*) (Baig *et al.*, 2018). Com base na combinação de diferentes tipos do gene *ccr* e na variação genética da região J, é possível a caracterização dos SCC*mec* e consequente tipagem de MRSA com base nesta combinação. Até o momento foram descritos treze tipos de SCC*mec* (I a XV) ao redor do mundo (Baig *et al.*, 2018).

Os SCC*mec* I, IV, V, VI, VII, VIII e XII, apresentam estrutura mais simples, contendo normalmente apenas genes estruturais, seus reguladores e recombinases e genes de resistência a β -lactâmicos. Enquanto os tipos II, III, IX, X, XI, XIII e XV além de recombinases, genes estruturais e seus reguladores, apresentam elementos transponíveis e genes que também conferem resistência aos antimicrobianos não β -lactâmicos (Baig *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2022). Os SCC*mec* de I a III foram os primeiros tipos descritos na literatura e são mais frequentes em cepas de HA-MRSA (MRSA associados à infecções hospitalares) enquanto os SCC*mec* IV, V, VI e VII. são mais frequentes em cepas de CA-MRSA (MRSA associados à infecções adquiridas na comunidade). Todavia têm sido cada vez mais frequentes cepas que carregam o SCC*mec*III em ambiente comunitário e cepas contendo SCC*mec*IV em ambiente nosocomial (Singh-Moodley *et al.*, 2019). Cepas que carregam o SCC*mec*IX curiosamente estão frequentemente associadas a populações suínas, normalmente são negativas para a leucocidina de Pantón-Valentine (PVL; do inglês: *Panton-Valentine leukocidin*) e apesar de seus isolados apresentarem resistência a maioria dos β -lactâmicos, o padrão de resistência dentre as amostras de SCC*mec* IX é muito diverso (Rongsanam *et al.*, 2020; Vestergaard *et al.*, 2012).

Estudos relataram presença do SCC*mec*X em cepas de MRSA isoladas de humanos e as cepas pertencentes a essa linhagem, comumente apresentam resistência à metais pesados, além de β -lactâmicos (Li *et al.*, 2011). Por isso, a sua presença em animais agropecuários é discutida, uma vez que antibióticos a base de metais pesados são responsáveis por pressão seletiva enorme neste ramo (Rensing *et al.*, 2018). O SCC*mec*XI, por sua vez, é frequente em humanos e em bovinos (García-Álvarez *et al.*, 2011; Loncaric *et al.*, 2013; Schlotter *et al.*, 2014) e suas cepas normalmente apresentam resistência não apenas a β -lactâmicos, mas também possuem genes que conferem resistência ao arsenito de sódio e ao arsenato de sódio (Shore *et al.*, 2011). Amostras contendo SCC*mec*XII são comumente descritas associadas a suínos, bovinos e

humanos (Wenyuan *et al.*, 2018; Jin *et al.*, 2020). Como os outros clones descritos em animais, SCCmecXII também apresenta resistência a múltiplas drogas (Jin *et al.*, 2020). Análises genéticas também demonstraram que cepas que carregam SCCmecXII evoluíram de uma cepa de MSSA, além disso demonstraram semelhanças na expressão de virulência entre cepas que carregam SCCmecXII com as outras cepas de CA-MRSA (Jin *et al.*, 2020). Recentemente um grupo de pesquisa descreveu o mais novo tipo de SCCmec que é também semelhante a cepas frequentes na comunidade, o SCCmecXIII porém ainda há poucas informações sobre este clone (Baig *et al.*, 2018).

O gene *mecA*, que também se encontra no SCCmec, concede a resistência não só a meticilina, mas também a maioria dos β -lactâmicos. O gene *mecA* codifica a PBP2a ou PBP2', uma enzima transpeptidase dita alternativa por apresentar menor afinidade de ligação ao anel β -lactâmico, permitindo a síntese da parede celular dessa bactéria, mesmo na presença dos antibióticos desta classe. (Deurenberg *et al.*, 2007). A resistência aos antimicrobianos, como um fator de virulência, também parece ser um dos potencializadores do sucesso da infecção por *S. aureus*.

A virulência de MRSA, seu potencial de resistir à pressão seletiva e sua alta taxa de mutação tem permitido a sua disseminação, tanto em ambiente nosocomial, como na sociedade, fora dos muros dos hospitais. Esse fato representa uma grande ameaça à saúde global. Isso chamou a atenção de pesquisadores para compreender melhor o mecanismo que possibilita essa diversidade clonal e assim, elucidar melhor como ocorre a evolução natural de clones de MRSA. Em 2002, Enright *et al.* analisaram com MLST (MLST; do inglês: *Multilocus Sequence Typing*) o perfil alélico de 913 amostras de MRSA e MSSA, provenientes do mundo inteiro, com o intuito de elucidar a origem ancestral de cada clone. A partir dessas amostras, foi possível a tipagem em 11 clones e classificação desses clones em 5 grupos associados geneticamente, denominados complexos clonais (CCs).

Diversos fatores podem favorecer a diversidade clonal de MRSA, incluindo a recombinação gênica, mutações pontuais e até mesmo a transferência horizontal de genes. Também já foram descritos indícios de mutações provocadas por elementos transponíveis (Botelho *et al.*, 2019). Já existem relatos na literatura científica de diversos complexos clonais, porém os CCs mais frequentes no mundo são: CC5, CC8, CC22, CC30 e CC45 (Lakhundi & Zhang, 2018). No Brasil, cepas pertencentes ao CC5 já eram detectadas em 2012; porém, mais recentemente emergiram como predominantes em diversos hospitais do Rio de Janeiro (Teixeira *et al.*, 2012, Viana *et al.*, 2021).

1.4 Clones de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina associados às infecções hospitalares (HA-MRSA)

MRSA é uma das principais causas de infecções nosocomiais. O potencial de infecção é maior em situações de imunossupressão, em situações em que os pacientes foram submetidos a osteointegração, intubação e até mesmo simples procedimentos de caráter intravenoso, como a implantação de cateteres (Cuervo *et al.*, 2015). Isso é comum porque *S. aureus* possui como fator de virulência a produção de biofilmes. Sua alta virulência permite que MRSA cause diversos tipos de infecções nesses ambientes, principalmente pneumonia, bacteremia ou outras infecções invasivas.

Cepas envolvidas em casos clínicos são frequentemente resistentes a múltiplas classes de antimicrobianos, incluindo β -lactâmicos e não β -lactâmicos. A diversidade clonal de MRSA em ambiente hospitalar é intrigante, visto que alguns clones parecem se adaptar melhor a esse tipo de ambiente por conta de obstáculos específicos, não muito comuns na comunidade (Figueiredo e Ferreira, 2014). Percebe-se também que alguns clones possuem capacidade de se disseminar em grande área geográfica. Infelizmente o motivo da sobreposição de alguns clones perante outros ainda não foi totalmente elucidado.

Como dito anteriormente, dentre os SCC*mec* mais frequentes em cepas de HA-MRSA no mundo destacam-se SCC*mec* I, II e III, que são frequentemente associados a clones altamente virulentos e multirresistentes, capazes de causar infecções graves. Com o intuito de esclarecer a intrigante epidemiologia de MRSA desde a década de 1970 diversos métodos de tipagem vem sendo desenvolvidos. Na década de 1990 foi aperfeiçoada para a tipagem de MRSA a técnica de PFGE (PFGE; do inglês: *pulsed-field gel electrophoresis*). Por ser menos dispendiosa é uma abordagem que demanda recursos que estão dentro do orçamento da maioria dos laboratórios de microbiologia. O fácil acesso a PFGE o torna um método muito útil para levantamentos epidemiológicos locais (Reed *et al.*, 2007).

Apesar de ter um bom poder discriminatório, o PFGE contribui pouco quando é necessária a comparação de amostras entre grupos diferentes de pesquisas e quando comparada

às técnicas mais novas, como o sequenciamento completo através do WGS, do inglês: (*whole genome sequencing*) ou através do sequenciamento de alguns fragmentos como o MLST.

Esse método consiste no sequenciamento de fragmentos de sete genes metabólicos expressos pelo patógeno. No caso de *S. aureus* os genes sequenciados são: *arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi* e *yqiL*. Variantes das sequências de cada fragmento dos genes, são definidas como alelos distintos, e cada amostra é caracterizada pelos alelos que apresenta em cada um dos sete genes. Dessa forma podemos ter o seu perfil alélico ou ST (ST; do inglês: *Sequence Type*). Como há muitos alelos em cada um dos sete loci, é improvável que as amostras tenham perfis alélicos idênticos ao acaso. Assim, presumimos que as cepas que apresentam o mesmo ST são originárias de um ancestral em comum, sendo dessa forma atribuídas como membros do mesmo complexo clonal (Enright *et al.*, 2002).

A maioria dos clones de MRSA evoluíram de seis complexos clonais (Teixeira *et al.*, 2012). Estes são os mais frequentes em cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA), por enquanto, (CC1, CC5, CC8, CC22, CC30 e CC45). O MLST sozinho não possui potencial para diferenciar linhagens diferentes, que pertencem ao mesmo complexo clonal. Por isso o ideal é a associação da tipagem do SCCmec com base nos genes *ccr* com o MLST para determinar o clone. Com essa associação é possível uma alta discriminação dos clones de MRSA que emergem em ambientes hospitalares e na comunidade internacionalmente.

Em 2007 Cockfield e colaboradores protocolaram um teste baseado na classificação do MLST, porém um teste menos custoso e mais acessível. Os testes RM (RM; do inglês: *restriction modification tests*), são adequados para laboratórios de diagnóstico clínico, unidades de controle de infecção hospitalar e laboratórios de pesquisa que realizam análises em grande escala. Esse teste consiste na amplificação de dois genes de *S. aureus* da família *hsdS*: os genes *sau1hsdS1* e *sau1hsdS2*. Esses genes variam entre os clones, mas dentro das linhagens são altamente conservados, sendo assim marcadores moleculares úteis na tipagem do complexo clonal (Cockfield *et al.*, 2007).

De forma geral, infecções hospitalares causadas por MRSA representam um enorme problema econômico e logístico para provedores de saúde e maior morbidade e mortalidade em pacientes (Lindsay *et al.*, 2013). A pandemia de MRSA tem como prejuízo para a economia europeia estimadamente 380 milhões de euros por ano, por exemplo (Köck *et al.*, 2010). Em 2011 um estudo realizado em Belo Horizonte, demonstrou que cada paciente infectado por MRSA pode gerar prejuízo de U\$327 a U\$874,50 (De Paula., 2011). Fatores como perfil de resistência aos antimicrobianos, tipo de infecção e persistência da infecção influenciam na

variabilidade do custo. Sem mencionar prejuízos indiretos, como afastamento e consequente queda de produtividade do paciente no trabalho (Ratti & Sousa, 2009).

Infelizmente no Brasil são desconhecidos estudos que contabilizam o prejuízo para a economia em âmbito nacional. Estratégias como a lavagem correta das mãos, higienização rigorosa de equipamentos e ambientes, triagem de pacientes infectados e o manejo correto de cateteres e objetos intravenosos, podem auxiliar na minimização da taxa de infecções em ambientes hospitalares (Cuervo *et al.*, 2015).

1.4.1 Clones de HA-MRSA associados às infecções sanguíneas.

S. aureus é um dos principais agentes etiológicos causadores de bacteremia em ambiente nosocomial (Laupland, 2013) e MRSA permanece associado a resultados clínicos piores em comparação com *S. aureus* sensível à meticilina (MSSA). Isso nos mostra que a resistência a antimicrobianos pode ser um fator essencial para a prevalência de *S. aureus* em infecções sanguíneas. Antibióticos recomendados para prescrição em casos de HA-MRSA, são a daptomicina e a vancomicina, todavia já foram relatadas cepas que carregam genes de resistência à vancomicina (VRSA, do inglês: *Vancomycin-Resistant Staphylococcus aureus*). (Mcguinness *et al.*, 2017). Isso pode vir a ser um enorme obstáculo no combate a epidemias de MRSA associados à bacteremia. MRSA correlacionados às infecções sanguíneas frequentemente causam infecções metastáticas como endocardite infecciosa, artrite séptica, osteomielite e podem evoluir para sepse e choque séptico (Hassoun *et al.*, 2017). Isso pode ser consequência de fatores de virulência específicos. Como mencionado anteriormente, *S. aureus* possui diversos determinantes de virulência que a auxiliam na adesão e invasão de tecidos, evasão do sistema imune e no seu crescimento populacional. Algumas enzimas e toxinas produzidas por *S. aureus*, são capazes de degradar células do sistema imunológico do hospedeiro, manipular a resposta imune inata e adaptativa e degradar matrizes celulares, contribuindo para a proliferação de *S. aureus* (Oliveira *et al.*, 2018).

A formação de biofilmes também parece ser um fator fundamental no sucesso de *S. aureus* em infecções sanguíneas. Um biofilme é caracterizado como um conglomerado de células bacterianas, ligadas por matrizes extracelulares que formam uma estrutura com alto potencial de adesão a tecidos do hospedeiro. Essa estrutura pode auxiliar na resistência aos antimicrobianos, uma vez que a absorção do mesmo pode ser dificultada. Também auxilia na

evasão do SI, dificultando o acesso de neutrófilos e macrófagos a células bacterianas (Bhattacharya *et al.*, 2018).

Nem todos os clones de MRSA apresentam padrão de virulência semelhante. Um exemplo disso é o fato da PVL ser expressa apenas em alguns clones de MRSA (Singh-Moodley *et al.*, 2019). A exotoxina PVL é uma exoproteína citotóxica, formadora de poros codificada pelos genes *lukS-PV* e *lukF-PV*. Tem potencial de provocar morte celular em leucócitos, através da formação de poros na estrutura celular, que tem como consequência a morte celular. Muitos estudos atribuem a ela um papel fundamental na patogenicidade de MRSA em bacteremias, por não ser expressa em todas as cepas de *S. aureus*, mas estar frequentemente relacionada a cepas que causam infecções sanguíneas (Singh-Moodley *et al.*, 2019). Dados como estes sugerem que a diversidade clonal e as divergentes expressões de fatores de virulência, possuem grande potencial para determinar não apenas o ambiente onde a infecção é adquirida (comunidade ou hospitais), mas também o tipo de infecção. Por isso a caracterização dos clones de MRSA, associados aos casos clínicos é importante. Os clones frequentes em ambiente hospitalar, conseqüentemente estão mais envolvidos em bacteremias. Nos MRSA isolados de pacientes internados em hospitais do Rio de Janeiro, nosso grupo de pesquisa tem observado que linhagens do CC5 associadas aos SCCmec II e IV, pertencentes, são as mais detectadas nessas amostras nos últimos anos (Viana *et al.*, 2021).

É importante salientar que o padrão epidemiológico de complexos clonais dominantes sofre alterações bruscas de anos em anos. Durante os anos 1990, cepas pertencentes ao CC8 foram as mais frequentes (Teixeira *et al.*, 1995), já nos anos 2000 cepas pertencentes a CC1 emergiram a ponto de suplantar CC8 em alguns hospitais do Rio de Janeiro (Silva-Carvalho *et al.*, 2009). Nos últimos anos o complexo clonal mais frequente em cepas isoladas de bacteremia no mundo todo é o CC5, que está associado tanto às cepas de HA-MRSA, como às cepas de CA-MRSA (Pérez-Montarelo *et al.*, 2018). Ainda há muito o que elucidar sobre os fatores que influenciam na sobreposição de alguns clones, a sugestão é que as diferentes combinações da expressão de fatores de virulência possuem grande influência, mas isso ainda não está claro. Outro fator importante a ser observado, é o perfil clínico dos pacientes, que pode facilitar a virulência de MRSA.

O uso de dispositivos médicos implantados cirurgicamente e de cateteres endovenosos centrais podem potencializar a formação de biofilmes em sua superfície, permitindo assim acesso de um grande número de células bacterianas a corrente sanguínea. A idade dos pacientes também pode interferir. Idosos e recém-nascidos, por exemplo, não possuem um sistema

imunológico totalmente funcional ou maduro, respectivamente, e se tornam mais susceptíveis a bacteremia. Principalmente quando há lesão ou perfuração proveniente de procedimentos médicos na pele do paciente, ambiente este propício a proliferação de *S. aureus*. Uma vez viabilizada a entrada de *S. aureus* na corrente sanguínea esses pacientes se tornam muito mais vulneráveis. Pacientes com comorbidades de igual modo, quando sujeitos a lesões estão mais suscetíveis. Todas essas condições, associadas ou isoladas são capazes de colaborar como possíveis agravantes em uma infecção por MRSA na corrente sanguínea (Lisowska-Lysiaki *et al.*, 2021).

Em pandemias de etiologia viral, como é o caso da pandemia de COVID-19, o aumento de casos de infecções bacterianas secundárias em pacientes internados é esperado. Entretanto, quando estas infecções são causadas por MRSA é notado um aumento significativo nas taxas de mortalidade destes pacientes (Morris *et al.*, 2017). Atualmente estamos enfrentando a pandemia causada pelo SARS-CoV2 e já são observados relatos do aumento na taxa de bacteremias causadas por MRSA em pacientes internados em hospitais e co-infectados com SARS-CoV-2 (Randall *et al.*, 2020).

1.5 Clones de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina associados às infecções na comunidade (CA-MRSA)

Nos anos 1990 foram descritos diversos casos clínicos com cepas de MRSA, adquiridas na comunidade por indivíduos saudáveis, sem contato prévio com ambiente hospitalar. Essas cepas apresentavam divergências genética em relação as cepas que já circulavam em hospitais, sendo necessária assim uma classificação para essas mesmas. As então chamadas CA-MRSA (CA-MRSA; do Inglês: *Community-associated methicillin resistant Staphylococcus aureus*), se disseminaram por todo o continente, estando presentes não apenas na comunidade, mas também se propagando em ambiente nosocomial (Mediavilla *et al.*, 2012). CA-MRSA, assim como HA-MRSA são resistentes aos antibióticos β -lactâmicos, mas existem diferenças na epidemiologia, nas manifestações clínicas e padrões de suscetibilidade antimicrobiana, além disso estudos de vigilância genômica descreveram diferenças genéticas entre cepas de HA-MRSA e CA-MRSA (Bukharie *et al.*, 2010).

Isso indica que por mais que ambas estejam igualmente distribuídas na comunidade e em ambiente nosocomial, elas possuem origens diferentes. CA-MRSA normalmente ocorrem em indivíduos previamente saudáveis que, provavelmente, têm cortes ou feridas e estão em

constante aglomeração. Por isso pequenos surtos de CA-MRSA são frequentemente relatados em escolas, penitenciárias e asilos (Kong *et al.*, 2016). É mais comum a infecção provocar problemas dermatológicos, infeccionando os tecidos moles, todavia já foram relatados casos graves, onde houve evolução para pneumonia e fascite necrosantes, por exemplo (Bukharie *et al.*, 2010).

Um dos primeiros clones de CA-MRSA descritos na literatura foi o USA300, que apresenta um alto potencial de virulência. Outros clones de CA-MRSA com patogenicidade semelhante, tem surgido normalmente carregam SCC*mec* tipos IV ou V geralmente suscetíveis a antimicrobianos não β -lactâmicos como a clindamicina e o sulfametoxazol-trimetoprima (Choo, 2017). Por mais que a presença de SCC*mec* seja comum em quase todas as cepas de MRSA, algumas diferenças específicas em regiões do SCC*mec* diferenciam CA-MRSA de HA-MRSA (Choo, 2017). Além disso, algumas cepas podem expressar PVL. Essas proteínas possuem potencial de induzir a morte celular em neutrófilos, indicando que podem estar associadas com aumento da virulência de CA-MRSA (Kong *et al.*, 2016).

O primeiro caso clínico grave de CA-MRSA, ocorrido no Brasil, descrito na literatura, foi relatado em 2009. Uma criança, sem histórico de imunossupressão e previa hospitalização, residente no Rio de Janeiro, teve muitas complicações, incluindo osteomielite hematogênica, abscessos em tecidos moles, empiema pleural e pericardite. A amostra isolada era pertencente ao clone SCC*mec*IV-CC30 e carregava os genes *lukS-PV* e *lukF-PV* (Rozenbaum *et al.*, 2009). Surpreendentemente a presença de clones de CA-MRSA em casos graves, tanto na comunidade, como em ambiente hospitalar tem sido cada vez mais frequentes. No Rio de Janeiro, com passar dos anos, a presença do clone SCC*mec*IV-CC30, vem sendo notada em ambiente hospitalar (Figueiredo, 2017). Isso é preocupante, pois surtos provenientes de CA-MRSA podem ser mais difíceis de serem contidos, por conta da facilidade desses MRSA se disseminarem na comunidade, onde o controle por profissionais de saúde é menor.

2. JUSTIFICATIVA

O uso de antimicrobianos indiscriminado, entre humanos e animais, tem repercutido na proliferação de bactérias multirresistentes nos mais variados ambientes. A resistência aos antimicrobianos têm sido um enorme desafio para a humanidade em geral. Como mencionado anteriormente, a terapia contra microrganismos resistentes é muito mais dispendiosa do que

contra microrganismos susceptíveis e pode afetar a economia mundial de diversas formas. O estudo do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos é um dos primeiros passos para elucidar essa problemática. Estes constituem uma base para que possam ser tomadas medidas que preservem a eficácia dos antimicrobianos existentes, evitando seu uso de forma inadequada e limitando a propagação de cepas multirresistentes de MRSA.

O papel da diversidade clonal e da virulência de MRSA no sucesso de infecções não está totalmente elucidado; mas, sugere-se que o perfil de virulência de MRSA deva possuir grande influência no tipo de infecção e, conseqüentemente, no resultado clínico. Desta forma, a vigilância epidemiológica é um fator fundamental para se esclarecer o papel da virulência de certas linhagens e clones de MRSA envolvidos em bacteremia ocorridas em pacientes internados em hospitais (Viana *et al.*, 2021). A associação entre os resultados observados com a vigilância epidemiológica desses patógenos e os dados clínicos podem contribuir fornecendo informações sobre quais são os clones de MRSA mais frequentes em infecções sanguíneas. Isso é fundamental para que estudos posteriores averiguem quais fatores podem levar a prevalência de uma determinada linhagem/clone, e investiguem o prognóstico de infecções sanguíneas causadas por cepas de MRSA específicas. Além disso, dentro de linhagens específicas de MRSA as bactérias possuem, geralmente, perfil semelhante de resistência aos antimicrobianos. Assim, o conhecimento da linhagem e/ou clone predominante, e o perfil de resistência aos antimicrobianos, pode auxiliar os médicos em uma escolha mais racional durante tratamento empírico de uma infecção por MRSA, promovendo, desta forma, informações para maior sucesso na terapia antimicrobiana. Finalmente, todos esses dados são valiosos para a implementação de medidas mais efetivas visando o controle da disseminação de linhagens/clones mais hipervirulentos e multirresistentes.

3. OBJETIVOS

Esse estudo tem como objetivo investigar amostras de MRSA isoladas de bacteremias, em pacientes internados em 23 hospitais situados nas Regiões do Grande Rio e Serrana do Estado do Rio de Janeiro no período de 2016 a 2018, visando determinar a frequência de diferentes linhagens de MRSA nessas amostras. Também temos como objetivos analisar os padrões de resistência aos antimicrobianos e observar se existe um aumento da prevalência de

alguma linhagem nas amostras de sangue em relação a outras. Como objetivos específicos, pretendemos:

3.1 Objetivos específicos

- Confirmar a identificação prévia das amostras de *S. aureus* através de testes de rotina.
- Confirmar a identificação das amostras como MRSA através da detecção do gene *meaA*.
- Identificar as linhagens de MRSA através de métodos moleculares.
- Analisar a resistência aos antimicrobianos.
- Correlacionar as linhagens de MRSA detectadas com os dados clínicos dos pacientes.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostras de *S. aureus* isoladas de bacteremias

As 74 amostras clínicas de *Staphylococcus aureus* foram isoladas de pacientes com bacteremia (hemocultura), os quais estavam internados em 23 hospitais localizados nas Regiões do Grande Rio e Serrana do Estado do Rio de Janeiro. As amostras bacterianas foram recebidas do laboratório clínico em placas de ágar sangue, e foram repicadas, por esgotamento, em meio de cultura TSA (TSA; do inglês: *Tryptic Soy Agar*: Difco, Franklin Lakes, NJ, EUA) para posterior confirmação da identificação. Posteriormente, as amostras foram estocadas em criotubo contendo meio TSB (TSB; do inglês: *Tryptic Soy Broth*: Difco, Franklin Lakes, NJ, EUA) e glicerol para uma concentração final de 10% (v/v). Os estoques foram acondicionados em um freezer a -80°C.

4.2 Triagem das amostras de *Staphylococcus aureus* quanto a resistência à metilina.

Uma triagem inicial das amostras foi realizada para averiguar se as amostras bacterianas utilizadas no estudo eram realmente resistentes à metilina. Para isto as amostras previamente identificadas no laboratório clínico como MRSA foram semeadas em meio de cultura TSA contendo metilina a 25µg/mL. Desta forma, um volume de 100µL de uma cultura densa

(aproximadamente 10^9 UFC/mL) em meio de cultura TSB, obtida por agitação vigorosa ($37^\circ\text{C}/18\text{h}$; 250rpm), foi inoculado de forma homogênea na placa contendo metilina. As placas foram incubadas em temperatura de 37°C por 24h, e caso não houvesse crescimento bacteriano até 48h. As amostras de MRSA crescem nesse meio de triagem, enquanto cepas de *S. aureus* susceptíveis à metilina (MSSA) não são capazes de crescer nessa concentração de metilina (Silva-Carvalho *et al.*, 2009).

4.3 Identificação das amostras de *Staphylococcus aureus*

Após a triagem das amostras de *S. aureus* quanto a resistência à metilina, estas tiveram sua identificação confirmada a partir de testes fenotípicos de rotina. Para isto, foram realizados a coloração de Gram e testes para produção da enzima catalase e da proteína coagulase, conforme descrito a seguir.

4.3.1 Coloração de Gram

Um esfregaço a partir do crescimento de *S. aureus* em TSA foi fixado em uma lâmina de microscopia, através de passagens rápidas da lâmina, por 3 vezes, na chama do bico de Bunsen. Esse esfregaço foi submetido a aplicação de solução do corante cristal violeta (1%) sobre o esfregaço por aproximadamente 90 segundos. A seguir o cristal violeta foi removido rapidamente com um filete de água destilada. Na sequência, foi adicionado uma solução de lugol (iodo + iodeto de potássio) ao esfregaço fixado na lâmina, permanecendo por 1 minuto. Após esse tempo, o esfregaço da lâmina foi lavado álcool à 95% e em seguida, lavado com água destilada como dito anteriormente. A lâmina foi então corada com o corante safranina por aproximadamente 30 segundos. A lâmina então foi lavada rapidamente com um filete de água destilada e colocada delicadamente sobre uma tira de papel de filtro para secar. Posteriormente, foi aplicada uma gota de óleo mineral sobre o esfregaço na lâmina para a utilização de microscópio ótico, utilizando lentes oculares com aumento de 10x e objetiva de imersão com aumento de 100x, permitindo a visualização das bactérias fixadas com aumento total de 1.000 vezes. Os estafilococos se apresentam, nessa coloração, como cocos Gram-positivos arroxeados em arranjos semelhantes a cachos de uva.

4.3.2 Teste de Catalase

Catalase é uma enzima produzida por algumas bactérias com o intuito de proteger as células da toxicidade do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), sendo este teste utilizado, principalmente, para diferenciar bactérias Gram-positivas do gênero *Staphylococcus* daquelas do gênero *Streptococcus*. Durante o procedimento, cerca de três colônias da cultura pura da amostra de MRSA, em meio TSA, foram utilizadas para fazer um esfregaço em lâmina de microscopia. Em seguida foi adicionada, sobre o esfregaço, uma gota de H_2O_2 . A liberação de oxigênio em até 30 segundos, observado indiretamente pela formação de bolhas, é indicativo da produção da enzima catalase.

4.3.3 Teste de Coagulase

Coagulase (Coa) e a proteína estafilocócica que se liga ao fator de von Willebrand (vWbp) são proteínas produzidas por *S. aureus* e outras bactérias. Essas proteínas são consideradas fatores de virulência, pois ambas são capazes de coagular o fibrinogênio presente no sangue, convertendo-o em fibrina e, conseqüentemente, formando coágulo. Tal feito ocorre porque essas duas coagulases agem de forma semelhante ao se ligarem à protombina. Essa ligação causa uma quebra na molécula da coagulase. Tal quebra leva a uma mudança conformacional na coagulase-protombina que ativa a transformação do fibrinogênio em fibrina. Para detectar a presença dessa proteína em uma amostra, um volume de 400 μ L de uma suspensão da amostra de MRSA é inoculado em um tubo de ensaio contendo 100 μ L de plasma de coelho com anticoagulante. O tubo foi incubado em banho-maria, à temperatura de 35°C e observado a cada 1 hora de incubação, durante as 4 primeiras horas. Quando não houve observação do coágulo durante as 4 horas iniciais, foi feita uma última leitura após 24h de incubação. A formação de coágulo em qualquer uma das leituras, confirma a presença de coagulases e, conseqüentemente, foi considerado teste positivo para a produção dessas proteínas, indicando ser uma amostra de *S. aureus*.

4.4 Análise do perfil de susceptibilidade das amostras de *S. aureus* aos antimicrobianos

O perfil de resistência aos antimicrobianos das amostras de MRSA analisadas neste estudo foi realizado previamente no laboratório clínico, de forma automatizada, através do

processador VITEK[®] 2 (Biomerieux; Rio de Janeiro, RJ, BR). Neste equipamento as amostras, após isolamento, são inoculadas em um cartão, inseridas no equipamento e processadas sem a intervenção do usuário. O sistema VITEK[®] 2 se baseia na tecnologia colorimétrica. Cada cartão contém 64 orifícios, sendo pelo menos um orifício o controle positivo (com meio de cultura sem antibiótico e com inóculo da bactéria isolada) e os demais com a amostra inoculada em meio de cultura de acordo com o CLSI e contendo concentrações crescentes dos antibióticos em cada orifício. O meio de cultura e os antibióticos utilizados são os indicados de acordo com o preconizado pelo CLSI para a espécie bacteriana isolada do paciente. A concentração inibitória mínima (CIM) é determinada através da comparação da curva de crescimento da amostra com as curvas de crescimento padrão de bactérias e CIM armazenadas no banco de dados do equipamento que contém mais de 1800 microrganismos gram-negativos e mais de 1200 microrganismos gram positivos com vários mecanismos de resistência distintos. As leituras ocorrem a cada 15min, utilizando 3 comprimentos de onda diferentes para assegurar a precisão do resultado.

4.5 Extração de DNA

Após confirmar fenotipicamente a identificação de amostras de *S. aureus* e a resistência à meticilina, o DNA da cultura pura de cada amostra de MRSA estudada foi extraído, através do método de lise térmica. A partir do estoque foi feita uma semeadura em placa de TSA e incubação por 24h a 37°C. Posteriormente, uma pequena porção de massa bacteriana (cerca de duas colônias) foi suspensa em 500µL de TE (Tris acetato 20mM, EDTA 0,5mM [pH 8,0]) em tubo tipo Eppendorf. O material foi então centrifugado por 2min a 15.000rpm, sendo o sobrenadante desprezado e o *pellet* suspenso em 200µL de TE. A seguir, o *pellet* foi centrifugado novamente por 2min a 15.000rpm e o sobrenadante mais uma vez desprezado. O *pellet* foi ressuspenso mais uma vez em 200µL de TE e, na sequência, o tubo tipo Eppendorf teve sua tampa vedada para não abrir durante fervura, na qual foi submetido por 10min. Por fim foi realizada mais uma etapa de centrifugação por 2min, e o sobrenadante foi transferido para um tubo tipo Eppendorf estéril e estocado a -20°C (Silva-Carvalho *et al.*, 2009).

4.6 Amplificação de fragmentos de DNA através da reação em cadeia de polimerase

Com esse DNA extraído foi dado seguimento às análises genóticas através do PCR (PCR; do inglês; *polymerase chain reaction*). As amplificações foram realizadas no

termociclador Veriti™ 96-Well ThermalCycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). A tipagem de MRSA foi realizada através de uma adaptação do método descrito por Boye *et al.*, 2007 e de Oliveira e de Lencastre, 2002). Foram utilizados ainda neste estudo dois outros tipos de métodos PCR. O primeiro com o intuito de amplificar o gene *mecA* e confirmar genotipicamente a resistência aos β -lactâmicos. O segundo é designado como testes RM para a classificação dos complexos clonais de MLST. Na reação básica para as ampliações foram utilizados os seguintes reagentes: 0,5 μ L de uma mistura equivalente para cada dNTP em um dNTP Mix (200 μ M); 1 μ L de cada um dos *primers* (direto e reverso; 0,2 μ M de cada *primer*); 0,5 μ L de Taq DNA polimerase (1U); 5 μ L de DNA (aproximadamente 100ng); 2,5 μ L do tampão da enzima 10x concentrado contendo MgCl₂ (1,5mM) e 15,5 μ L de H₂O bidestilada estéril. O volume final da reação deve ser 25 μ L.

4.6.1 Amplificação do gene *mecA* e SCC*mec*

A tipagem do SCC*mec* foi realizada através de uma adaptação dos métodos descritos por Oliveira e de Lencastre 2002, e Boye *et al.* 2007. A amplificação foi realizada no termociclador Veriti™ 96-Well ThermalCycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Essa PCR multiplex é capaz de, em um único ensaio, identificar cinco tipos estruturais do SCC*mec*, com base na combinação de diferentes tipos do complexo *ccr* e na variação genética da região J. Na tabela 1, encontram-se os *primers* que foram utilizados na reação, o tamanho dos amplicons esperados para cada par de *primers* e o tipo de SCC*mec* associado ao tamanho do amplicon. Para esta tipagem foi necessária apenas uma reação, contendo todos os pares de *primers*. Para a reação de PCR, após uma etapa de pré-desnaturação a 94°C por 5min, seguido de 30 ciclos com: uma etapa de desnaturação a 94°C/30s, seguido de anelamento a 55°C/1min e de uma etapa de extensão do *primer* a 72°C/2min. Após os 30 ciclos, foi realizada uma etapa de extensão final à 72°C/4min.

Tabela 1 - *Primers* utilizados e o produto da amplificação associados ao SCC*mec* e *mecA*

<i>Primer</i> ^a	Sequência	Tamanho	SCC <i>mec</i>
β	ATTGCCTTGATAATAGCCYTCT	937 pb	IV
α	TAAAGGCATCAATGCACAAACACT		
KDP F1	AATCATCTGCCATTGGTGATGC	284 pb	II
KDP R1	CGAATGAAGTGAAAGAAAGTGG		
ccrCF	CGTCTATTACAAGATGTAAAGGATAAT	518 pb	III E V

ccrCR	CCTTTATAGACTGGATTATTCAAAAATAT		
1272F1	GCCACTCATAACATATGGAA	415 pb	I e IV
1272R1	CATCCGAGTGAAACCCAAA		
<i>mecA</i> F	AAAAGTAGGTGTTGGTGAAGATATAACC		
<i>mecA</i> R	GAAAGGATCTGTACTGGGTTAATCAG	585pb	<i>mecA</i>

^aTodos os *primers* foram descritos por Boye *et al.* (2007), exceto KDP F1 e R1, que foram descritos por Oliveira e de Lencastre (2002) e *mecA* F e R que foram descritos por da Silva-Carvalho *et al.* (2009).

A amplificação do gene *mecA* foi realizada separadamente através de uma PCR convencional. Para as etapas programadas no termociclador foram realizadas uma pré-desnaturação a 94°C por 5min, seguida de 35 ciclos com as etapas de: desnaturação a 94°C/30s, anelamento a 55°C/30s e extensão a 72°C/2min. Após os ciclos, foi realizada uma etapa de extensão final à 72°C/4min.

4.6.2 Testes RM

Os testes RM, como já mencionados, consistem na amplificação de dois genes de *S. aureus* da família *hsdS*: os genes *sau1hsdS1* e *sau1hsdS2* e têm o intuito de identificar a qual o complexo clonal uma determinada cepa de *S. aureus* pertence. Tais testes foram realizados de acordo com o protocolo descrito por Cockfield e colaboradores em 2007. A amplificação foi realizada no termociclador Veriti™ 96-Well ThermalCycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Foram feitas 3 reações, utilizando um total de 6 *primers*, 3 diretos e 3 reversos. Os *primers* utilizados, os tamanhos dos produtos das amplificações e os agrupamentos dos amplicons no complexo clonal correspondente, estão indicados na Tabela 2.

Tabela 2 - *Primers* utilizados para o Teste de Restrição e Metilação (RM) segundo Cockfield e colaboradores (2007).

Teste	<i>Primer</i> direto	<i>Primer</i> Reverso	Tamanho (pb)	CC ^a
1	AF: AGGGTTTGAAGGCGAATGGG	AR30: CAACAGAATAATTTTTTAGTTC	203	CC30
		AR22: TCAGAGCTCAACAATGATGC	990	CC22
2	AF: AGGGTTTGAAGGCGAATGGG	AR45: GGAGCATTATCTGGTGTITTCC	722	CC45
		AR1: GGGTTGCTCCTTGCATCATA	1037	CC1
3	BF: CCCAAAGGTGGAAGTGAAAA	BR5: TCGTCCGACTTTTGAAGATTG	680	CC8
		BR8: CCAGTTGCACCATAGTAAGGGTA	1071	CC5

^aCC: complexo clonal

O programa definido para a amplificação desta reação no termociclador foi o seguinte: Pré-desnaturação à 95°C/4min, seguido de 35 ciclos: desnaturação à 95°C/30s, anelamento à 55°C/30s, extensão à 72°C/2min e, após os ciclos, uma extensão final à 72°C/4min.

4.7 Eletroforese em gel de agarose a 1,5%

Após a reação de PCR foi realizada uma eletroforese em gel de agarose, conforme descrito por Sambrook *et al.*, 1989. O gel de agarose foi feito com o tampão TAE 1X (Tris acetato 20mM, EDTA 0,5mM [pH 8,0]) em concentração final de 1,5% (p/v). Foi utilizado 5µL do *Ladder* (Sinapse Inc.) (padrão de tamanho das bandas de DNA) e 2µL de *loading buffer* (corante de corrida) para cada 5µL de DNA da amostra. Após a eletroforese, o gel foi tratado com brometo de etídio (0,5µg/mL) por 20 minutos. Posteriormente, foi feita a leitura no captador de imagens Gel Doc™ EZ Imager (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

4.8 Análises dos dados clínicos dos pacientes

Dados fornecidos nas fichas dos pacientes apresentando bacteremia por MRSA, como faixa etária, gênero, hospital e região geográfica dos hospitais foram registrados em uma planilha e incluídos no estudo. Todos estes dados foram analisados frente às linhagens de MRSA envolvidas nos casos de bacteremia da população estudada.

4.9 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas através do teste do χ^2 utilizando o software Graphpad Prism 9.

5. RESULTADOS

5.1 Distribuição geográfica das amostras de MRSA isoladas de bacteremia no Grande Rio e Região Serrana

Com base nas fichas dos pacientes foi feito um levantamento das amostras de MRSA do estudo, de acordo com a localização geográfica dos hospitais onde as amostras foram

isoladas (Tabela 1A em anexo). Dentre as 64 amostras que possuíam registro da localidade dos hospitais, a maior parte (31,3%; n= 20) foi isolada na Zona Oeste da cidade do Rio de Janeiro. Na Região Serrana do Estado do Rio de Janeiro foram isoladas 15 amostras, representando 23,4%. Tanto na Baixada Fluminense, como na Zona Norte da cidade do Rio de Janeiro, foram isoladas 8 amostras, representando 12,5% cada. Na região envolvendo Niterói e adjacências foram isoladas 7 amostras, representando 9,5%. Finalmente, na Zona Sul da Cidade do Rio de Janeiro, foram isoladas 6 amostras, representando 10,9%. As identificações dos hospitais para outras 10 amostras não foram registradas (Figura 1 e Tabela 1A em anexo).

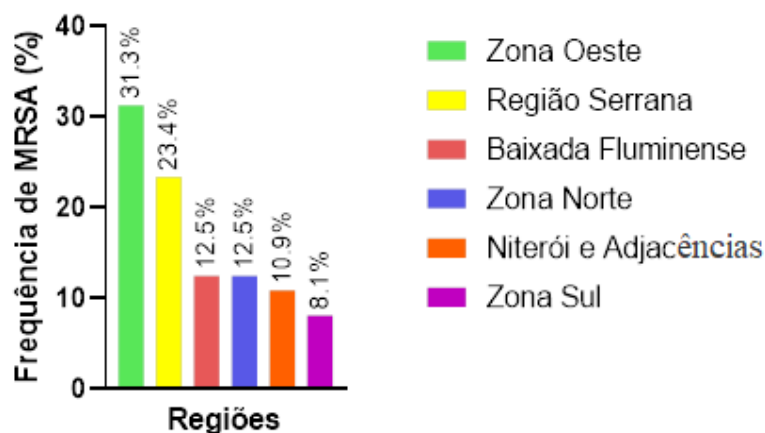


Figura 1 - Distribuição das 64 amostras de MRSA isoladas de bacteremias, de acordo com a localização geográfica dos hospitais no Grande Rio e Região Serrana. Para 10 amostras não havia registro da localização dos hospitais nestas regiões.

5.2 Distribuição de SCCmec nas amostras de MRSA isoladas de bacteremia

A tipagem do SCCmec foi realizada através de uma adaptação entre os métodos descritos por Boye *et al.* (2007) e o de Oliveira e de Lencastre (2002), uma vez que, além dos *primers* descritos no método de Boye *et al.*, utilizamos também os *primers* para o gene *kdp* descrito pelos últimos autores. Os SCCmec encontrados dentre as amostras estudadas foram SCCmecII e SCCmecIV. As cepas que carregam o SCCmecII foram as mais frequentes dentre as amostras de bacteremia estudadas, representando 78,4% das amostras (n=58/74). A presença do SCCmecIV foi observada em 22,2% das amostras (n=16/74) (Figura 2).

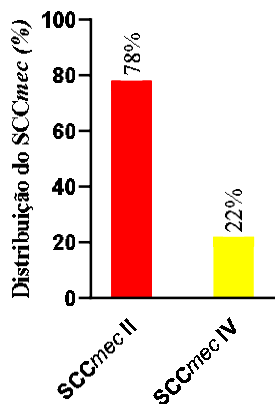


Figura 2 - Distribuição dos SCCmec nas 74 amostras de MRSA isoladas de bacteremias nas Regiões do Grande Rio e Serrana.

5.3 Distribuição dos complexos clonais nas amostras de MRSA isoladas de bacteremia

De acordo com o protocolo proposto por Cockfield e colaboradores em 2007, as amostras de MRSA foram classificadas nos complexos clonais de MLST. Com base nos fundamentos dos testes RM, anteriormente mencionados, as 74 amostras de MRSA foram classificadas em 4 CCs, dentre as quais 96% (n=71) foram classificadas como CC5. Porém apenas 1,3% (n=1) foram classificadas como CC8, CC30 ou CC1 (representando uma amostra de cada um desses CCs) (Figura 3).

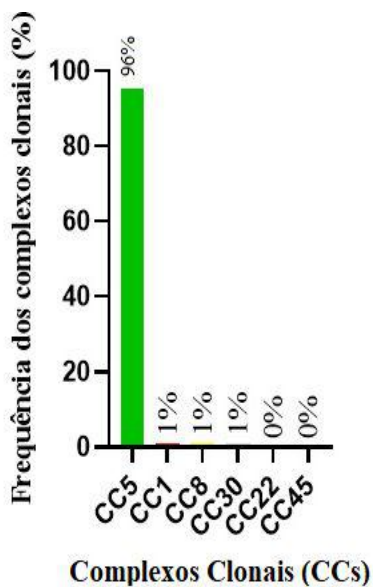


Figura 3 - Distribuição dos complexos clonais nas 74 amostras de MRSA isoladas de bacteremias nas Regiões do Grande Rio e Serrana

5.4 Distribuição das linhagens de amostras de MRSA isoladas de bacteremias

As linhagens mais frequentes dentre as 74 amostras de MRSA isoladas de bacteremias, ocorridas nas Regiões do Grande Rio e Serrana, foram respectivamente: CC5-SCC*mec*II, n=58 amostras (78,4%); CC5-SCC*mec*IV, n=13 amostras (17,6%); CC30-SCC*mec*IV, n=1 amostra (1,3%); CC8-SCC*mec*IV, n=1 amostra (1,3%); e CC1-SCC*mec*IV, n=1 amostra (1,3%) (Figura 4)

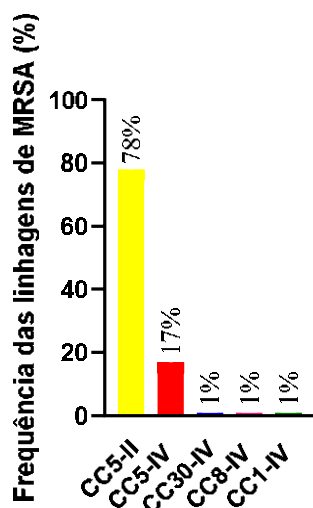


Figura 4 - Distribuição das linhagens nas 74 amostras de MRSA isoladas de bacteremias nas Regiões do Grande Rio e Serrana. CC5-IV = CC5-SCC*mec*IV, CC5-II = CC5-SCC*mec*II, CC30-IV = CC30-SCC*mec*IV, CC8-IV = CC8-SCC*mec*IV, CC1-IV = CC1-SCC*mec*IV. CC=Complexo clonal.

5.5 Distribuição das linhagens de MRSA isoladas de bacteremia de acordo com a localização dos hospitais nas Regiões do Grande Rio e Serrana.

Com base no endereço dos hospitais onde as amostras foram isoladas, e nos testes genotípicos realizados, podemos visualizar a distribuição dessas linhagens de MRSA no Grande Rio e Região Serrana. Tais regiões foram divididas em Baixada Fluminense, Região Metropolitana, Região Serrana. Da Baixada Fluminense foram analisadas 8 amostras, 6 pertencentes à linhagem CC5-SCC*mec*II, representando 75,0% do total, 1 amostra pertencente ao CC5-SCC*mec*IV, representando 12,5% do total, e outra pertencente ao CC1-SCC*mec*IV, representando 12,5% do total das amostras dessa região. Da Região Serrana foram analisadas 15 amostras, 13 pertencentes ao CC5-SCC*mec*II, representando 86,7% do total das amostras

isoladas nessa região, enquanto CC5-SCCmecIV foi menos frequente, ocorrendo em somente 13,3% das amostras (n=2). A Região Metropolitana do Rio de Janeiro (aqui definida como as cidades do Rio de Janeiro, Niterói e São Gonçalo) foi a que englobou um maior número de amostras deste estudo (n = 41). Desse total, 31 amostras foram pertencentes ao CC5-SCCmecII (76,8%), 8 amostras ao CC5-SCCmecIV (19,5%), 1 amostra ao CC8-SCCmecIV (2,4%), e a amostra remanescente ao CC30-SCCmecIV. Não foram recebidas amostras provenientes das regiões, Noroeste, Norte e Sul Fluminense (Figura 5).

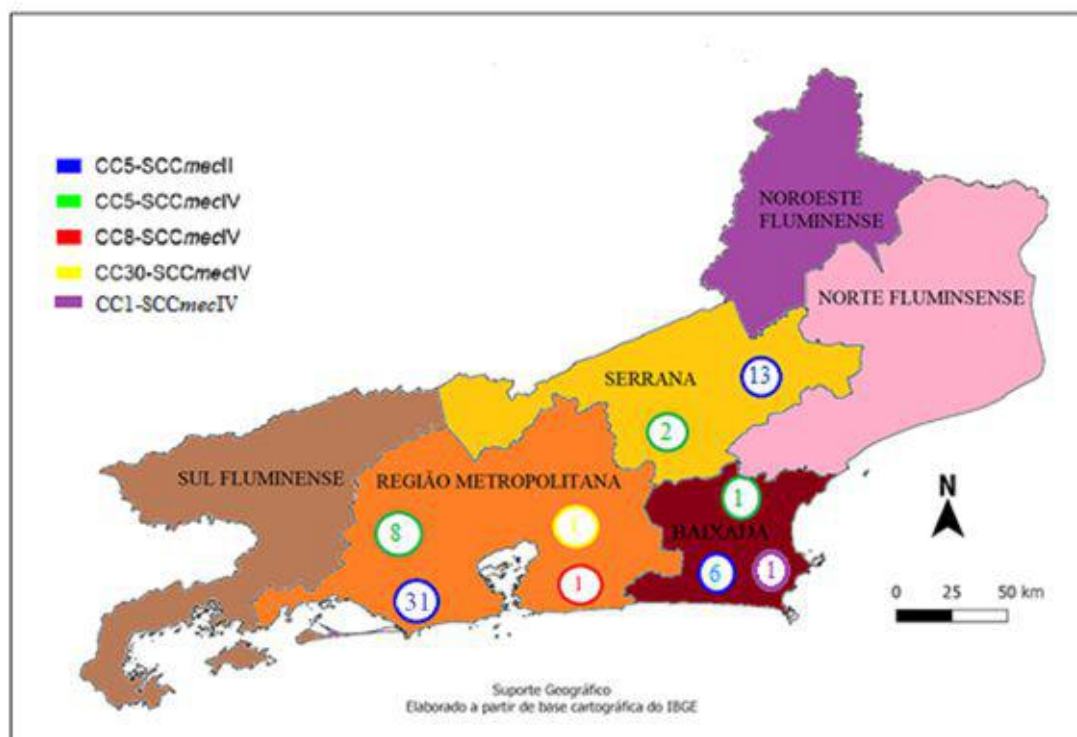


FIGURA 5 - Distribuição das linhagens de MRSA, de acordo com a localização dos hospitais, nas Regiões do Grande Rio e Serrana. Números circulosados: quantidade de amostra.

Também achamos interessante analisar a distribuição das linhagens das 34 amostras isoladas na cidade do Rio de Janeiro. A cidade do Rio de Janeiro é dividida entre Zona Norte, Zona Sul, Zona Oeste e Centro. A Zona Oeste (n=20) apresentou 14 amostras pertencentes ao CC5-SCCmecII (70,0%), 4 amostras pertencentes ao CC5-SCCmecIV (20,0%), 1 amostra pertencente ao CC8-SCCmecIV (5,0%) e 1 amostra pertencente ao CC30-SCCmecIV (5,0%). Na Zona Norte (n=8) foram observadas 6 amostras pertencentes ao CC5-SCCmecII (75,0%) e 2 amostras pertencentes ao CC5-SCCmecIV (25,0%). Na Zona Sul (n=6) foram obtidas, 5 amostras pertencentes ao CC5-SCCmecII (83,3%) e 1 amostra CC5-SCCmecIV (16,7%).

Nenhuma amostra originária do Centro do Rio de Janeiro foi analisada. Para 10 amostras não foram registradas a região de isolamento. Porém, o predomínio do -SCC*mecIV* (10,0%) (Figura 6). CC5-SCC*mecII* foi também observado (90,0%; n=9/10). A amostra remanescente apresentou CC5.

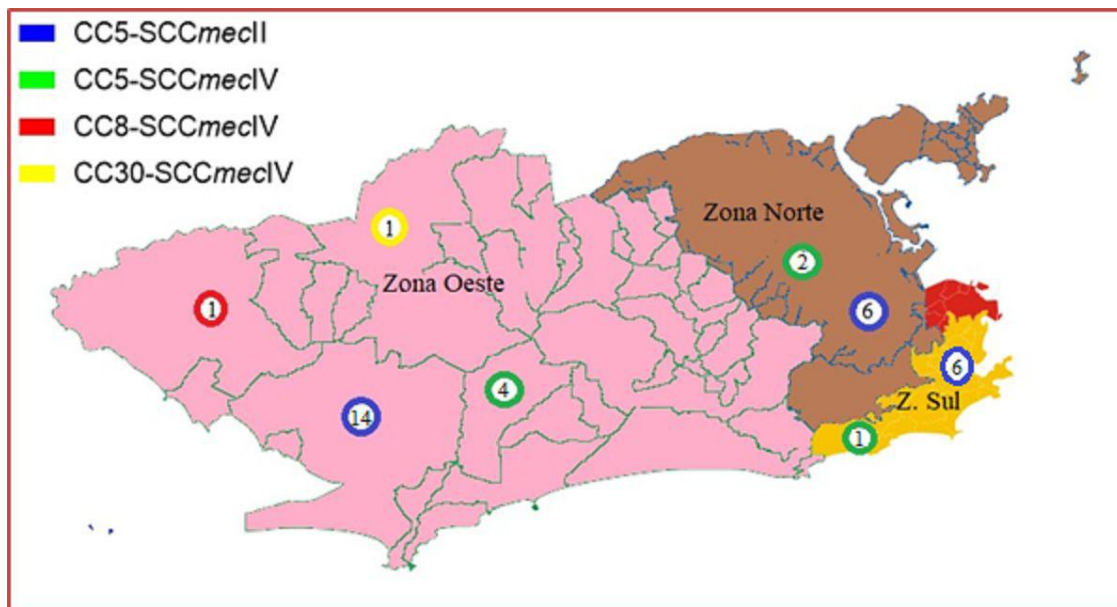


FIGURA 6 - Distribuição das linhagens de MRSA de acordo com a localização dos hospitais, na cidade do Rio de Janeiro. Números circulados: quantidade de amostra.

5.6 Distribuição das linhagens de MRSA isoladas de bacteremias de acordo com as faixas etárias dos pacientes.

As linhagens identificadas foram também analisadas em relação às faixas etárias dos pacientes. Para um total de 68 pacientes as idades foram relatadas. Dentre os pacientes de 0 a 10 anos foram obtidas 5 amostras, 3 (60,0%) eram pertencentes ao CC5-SCC*mecIV* e 2 (40,0%) ao CC5-SCC*mecII*. Entre os pacientes de 11 a 20 anos foram obtidas 4 amostras e todas da linhagem CC5-SCC*mecII*, representando 100,0% das amostras. Entre os pacientes que possuíam entre 21 e 50 anos (n=17) foram isoladas 11 amostras pertencentes à linhagem CC5-SCC*mecII*, representando 74,7%, enquanto 29,4% das amostras foram caracterizadas como CC5-SCC*mecIV* (n=5), e finalmente 5,9% como CC1-SCC*mecIV* (n=1). Já entre os pacientes com mais de 50 anos (n=42), CC5-SCC*mecII* correspondeu a 83,3% (n=35), CC5-SCC*mecIV* a 11,9% (n=5), CC8-SCC*mecIV* a 2,4% (n=1) e CC30-SCC*mecIV* a 2,4% (n=1). Entre as

amostras cujas idades dos pacientes não foram relatadas (n=6), todas pertenciam a linhagem CC5-SCC*mec*II (Figura 7).

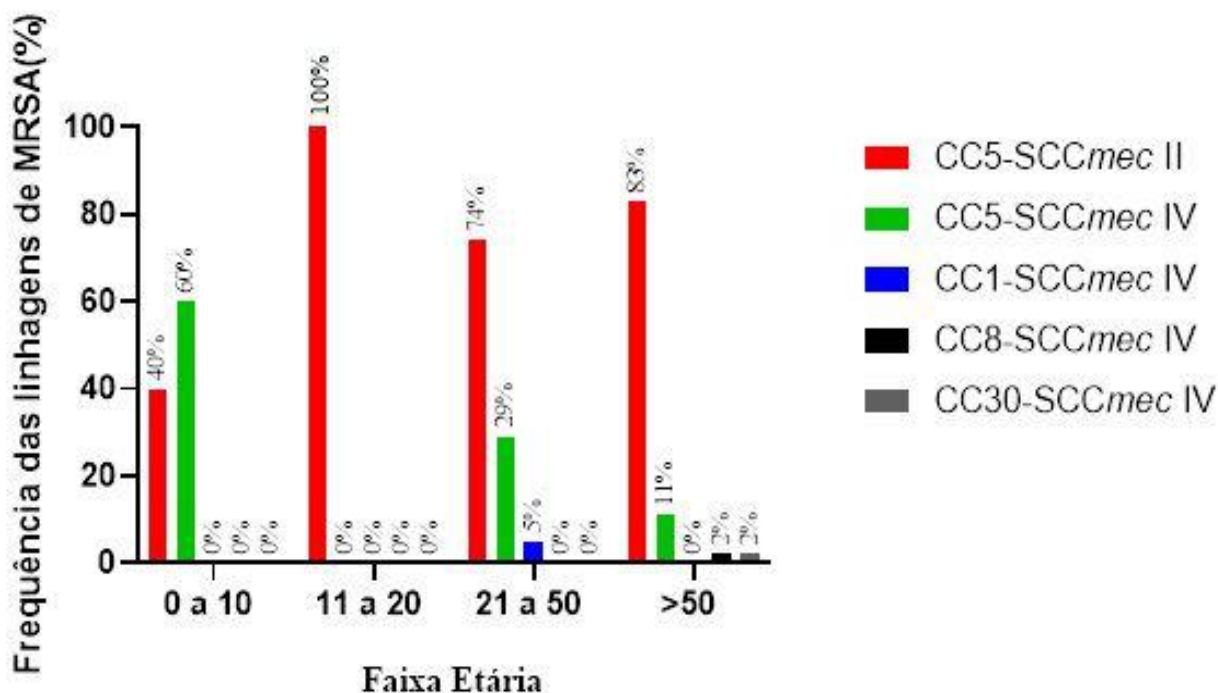


FIGURA 7 - Distribuição das linhagens de MRSA isoladas de bacteremias no Grande Rio e Região Serrana, de acordo com as faixas etárias dos pacientes. A análise estatística entre a distribuição de SCC*mec*II e SCC*mec*IV nas diferentes faixas etárias foi estatisticamente significativa ($p < 0.0001$).

5.7 Distribuição das linhagens de MRSA isoladas de bacteremias de acordo com gênero dos paciente.

Também foi analisada a distribuição das linhagens de acordo com os gêneros dos pacientes. Um total de 43,2% (n=32/74) das amostras foram isoladas do sexo feminino e de 55,4% do sexo masculino (n=41/74). Para 1 amostra, o gênero não foi reportado. Das amostras isoladas do sexo feminino, 71,1% foram caracterizadas como pertencente à linhagem CC5-SCC*mec*II (n=25/32), 15,6% como pertencente à CC5-SCC*mec*IV (n=5/32), 3,1% caracterizada como CC8-SCC*mec*IV (n=1/32) e finalmente 3,1% pertencente à CC30-SCC*mec*IV (n=1/32). Já entre as amostras isoladas de pacientes do gênero masculino, 80,5% (n=33/41) foram caracterizadas como pertencentes à linhagem CC5-SCC*mec*II, 17,1% (n=7/41) foram

classificadas como CC5-SCC*mecIV*, e 2,4% (n=1/41) como CC1-SCC*mecIV*. A única amostra, cujo gênero não havia sido reportado, foi caracterizada como CC5-SCC*mecIV* (Figura 8).

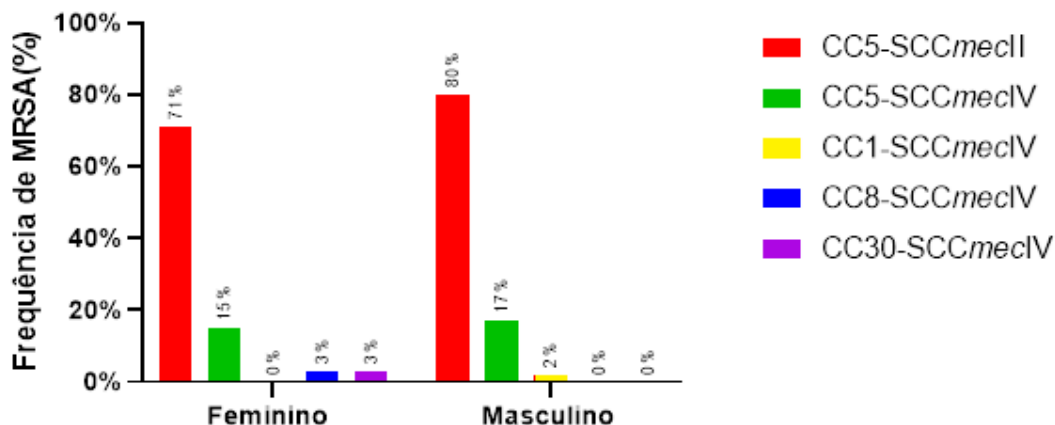


Figura 8. Distribuição das linhagens de MRSA isoladas de bacteremia nas Regiões do Grande Rio e Serra de acordo com o gênero dos pacientes. Não houve diferença significativa ($p=0.0775$).

5.8 Perfil de resistência a antimicrobianos

Observando os dados prévios fornecidos pelo laboratório clínico, um total de 44,6% das amostras (n=33/74) apresentou resistência a três ou mais antimicrobianos não β -lactâmicos e, por esse motivo, foram definidas como multirresistentes (Tabela 2A, em anexo). Dentre o grupo que apresentou resistência a mais de 3 antimicrobianos, a grande maioria apresentou resistência à ciprofloxacina, clindamicina e eritromicina, além da resistência aos antibióticos β -lactâmicos. É importante ressaltar que apenas uma amostra apresentando multirresistência, apresentou também resistência à vancomicina e teicoplanina pelo teste do VITEK-2 (Tabela 2A, em anexo).

6. DISCUSSÃO

A elevada taxa de infecção por MRSA representa uma grande problemática mundial para os órgãos de Saúde Pública. Sem dúvida, MRSA é um dos principais agentes de infecções hospitalares, sendo capaz de causar diversos tipos de infecções, desde uma infecção mais branda e localizada até uma doença grave e sistêmica (Turner *et al.*, 2019). O elevado índice de

resistência aos antimicrobianos, aliado ao enorme potencial de virulência dos MRSA, é um fator complicador. Em pacientes com infecção na corrente sanguínea (ICS) as taxas de morbidade e mortalidade são elevadas, pois esses pacientes estão sujeitos a infecções metastáticas, que podem levar à endocardite infecciosa e osteomielites, ou sepse. Portanto, esses pacientes são submetidos a tratamentos complexos, via endovenosa, frequentemente associados a outros antimicrobianos, e outros tratamento de suporte; sendo assim, são também mais custosos (Hassoun *et al.*, 2017). Algumas cepas de MRSA podem produzir potentes superantígenos, como por exemplo, a toxina da síndrome do choque tóxico-1 (TSST-1) que leva a uma doença de rápida progressão e fatal, conhecida como Síndrome do Choque Tóxico Estafilocócico (TSS) (Schlievert e Davis, 2020).

Com o intuito de uma melhor compreensão da epidemiologia molecular de MRSA em bacteremias, neste estudo analisamos 74 amostras provenientes de ICS, ocorridas em hospitais do Grande Rio e Região Serrana, no período de 2016 a 2018. Atualmente, já são conhecidos diversos fatores de virulência e mecanismos básicos dos *S. aureus* que auxiliam na adesão e invasão de tecidos, danos aos tecidos do hospedeiro, e evasão do sistema imune; bem como, àqueles envolvidos com sistemas reguladores da virulência (Turner *et al.*, 2019). Entretanto, algumas características dessa bactéria ainda intrigam a comunidade científica, como a pequena diversidade clonal de MRSA, a capacidade de clones específicos se disseminarem através de amplas áreas geográficas, e a alternância clonal (*clonal wave*), que ocorre quando um clone consegue suplantam um outro previamente predominante (Figueiredo e Ferreira, 2014). Resultados de nosso grupo com MRSA da linhagem ST239, permitiram levantar a hipótese de que a evolução desses clones parece ter sofrido influência da geolocalização (Botelho *et al.*, 2019).

Cepas carreando *SCCmecI* foram descritas pela primeira vez no Reino Unido, na década de 1960, onde tal cassete *mec* era predominante (Katayama, Ito, e Hiramatsu, 2000). Já os *SCCmec* tipos II e III foram associados pela primeira vez a cepas que eram predominantes durante a década de 1980. Durante a década de 1990, no Brasil, estudos conduzidos por nosso grupo demonstraram que o *SCCmecIII* era o mais frequente no país (Teixeira *et al.*, 1995). Todas essas cepas estavam associadas a infecções hospitalares.

Todavia, durante os anos 2000, pesquisadores no mundo inteiro observaram um aumento na frequência do *SCCmecIV* e *SCCmecV* (clones frequentemente associados a CA-MRSA), até mesmo em casos de bacteremias. No Japão, por exemplo, foi feito um estudo com 1.104 amostras de MRSA, isoladas entre 2011 e 2014, provenientes de bacteremias. Naquele

estudo, SCCmecII foi predominante (87,2%), mas houve uma frequência significativa dos tipos IV (10,1%) e V (1,2%) (Aung *et al.*, 2019). Em estudos realizados por nosso grupo, durante a primeira década do ano 2000, foi demonstrado que, no Rio de Janeiro, cepas que carregam o SCCmecIV chegaram a suplantarem as cepas hospitalares anteriormente predominantes, as quais apresentavam SCCmecIII (Silva-Carvalho *et al.*, 2009).

Em nosso atual estudo as cepas que carregam o SCCmecII foram as mais frequentes, sendo seguidas de cepas que carregam o SCCmecIV que ainda assim, demonstraram frequência significativa. Dados estes que foram semelhantes ao estudo de bacteremias no Japão (Aung *et al.*, 2019). O Complexo clonal mais frequente em nosso estudo foi o CC5. Entretanto, no estudo de Silva-Carvalho e colaboradores (2009) as amostras SCCmecIV predominantes eram pertencentes ao CC1. De acordo com os nossos resultados, o CC1 apareceu em apenas 1 amostra, sendo as amostras pertencentes ao CC5 as mais frequentes, e distribuídas nas linhagens (CC5-SCCmecII (78%) e CC5-SCCmecIV (17%). Isso nos mostra que ocorreu mais uma alternância clonal, no Rio de Janeiro, onde cepas de MRSA CC5 suplantaram as CC1 anteriormente predominantes.

Como já mencionado anteriormente, durante os anos 1990, cepas pertencentes ao CC8 foram as mais frequentes (Teixeira *et al.*, 1995), já nos anos 2000 cepas pertencentes a CC1 emergiram a ponto de suplantarem CC8 em alguns hospitais do Rio de Janeiro. Outros estudos já demonstraram a associação do CC5 com infecções hospitalares no Brasil (Silva-Carvalho *et al.*, 2009, da Silva *et al.*, 2020). Um trabalho conduzido no nordeste do Brasil, caracterizando amostras de *S. aureus* isoladas da microbiota de profissionais de saúde, demonstrou que, dentre as amostras de MRSA encontradas, a grande maioria pertencia ao CC5 (da Silva *et al.*, 2020). Isso representa uma grande problemática, pois esses profissionais possuem contato constante com pacientes debilitados, sendo, portanto, uma fonte reconhecida de disseminação do microrganismo no ambiente hospitalar. Outro estudo realizado em São Paulo, com amostras de pacientes infectados com cepas de MRSA, mostrou que CC5 foi o único complexo clonal identificado (Carmo *et al.*, 2011). No Rio de Janeiro, um trabalho conduzido recentemente por pesquisadores de nosso laboratório, com cepas isoladas de diferentes quadros clínicos, e também de colonização nasal, mostrou que CC5 era o complexo clonal prevalente (seguido do CC30), substituindo o CC1, o qual era dominante alguns anos atrás (Viana *et al.*, 2021). Uma elevada frequência de CC5 tem sido observada não somente no Japão, mas também em outros países. Por exemplo, um estudo realizado na Espanha relatou que o CC5 foi o complexo clonal mais associado com bacteremias, seguido do CC30 (Pérez-Montarelo *et al.*, 2018). Outro

estudo, reunindo dados de 15 países africanos também demonstrou a predominância de CC5 sobre outros CCs (Abdulgader *et al.*, 2015).

Entretanto, o motivo da brusca variação temporal dos clones de MRSA, levando ao predomínio de alguns clones em detrimento de outros, ainda não foi completamente elucidado. Supõe-se que a aquisição de fatores de virulência por alguns clones facilite a sua disseminação. Um bom exemplo disso, é o fato dos genes que codificam a PVL serem expressos com frequência em clones de CA-MRSA isolados de bacteremias (Singh-Moodley *et al.*, 2019). Entretanto, em contraposição a esta premissa, um estudo de pesquisadores de nosso grupo sugere que a perda de genes citotóxicos foi importante na evolução do CC1 no Brasil (Côrtes *et al.*, 2021). Portanto, a enorme plasticidade dos *S. aureus* em sofrer aquisições, deleções e recombinações em seus genomas, aliada às forças evolucionárias como fruto da interação bactéria-hospedeiro, bem como a sua geolocalização, são todos fatores que devem estar envolvidos na alternância clonal.

Sem dúvida, o padrão de resistência aos antimicrobianos deve também influenciar na seleção clonal. Porém, em termos do paciente, o aumento dessa resistência é um fator complicador para o tratamento das infecções por MRSA. Cepas que possuem resistência a um número maior de antimicrobianos podem exigir terapias mais dispendiosas, por vezes injetáveis e demoradas, o que pode dificultar a recuperação dos pacientes. Em relação ao perfil de susceptibilidade das amostras de MRSA de bacteremia, um total de 44.6% das amostras de MRSA isoladas de sangue foram resistentes a pelo menos três antimicrobianos, além dos antibióticos β -lactâmicos; sendo, portanto, consideradas multirresistentes (n=33/74). A vancomicina tem sido a primeira opção para o tratamento de infecções graves por MRSA (Mühlberg *et al.*, 2020). O alvo da vancomicina é a parede celular, onde liga-se com alta afinidade a subunidades de N-ácido acetilmurâmico e N-acetilglucosamina, interrompendo assim a conjugação das cadeias peptídicas ao glicano e, conseqüentemente, a síntese da parede celular. Apesar da droga possuir difícil acesso a alguns tipos de tecidos, a grande maioria das cepas de MRSA ainda são susceptíveis à vancomicina (Hassoun *et al.*, 2017).

Através dos resultados do teste de susceptibilidade aos antimicrobianos, realizados no laboratório de microbiologia que cedeu as amostras de MRSA para este estudo, a grande maioria das amostras, não apresentou resistência à vancomicina. Porém, a amostra BMB 16.026 (CC5-SCC*mecII*) foi a única que apresentou múltipla resistência elevada, ou seja, resistência a 5 antimicrobianos além dos β -lactâmicos, dentre eles à vancomicina e à teicoplanina. Esse dado, necessita ser confirmado por nós, através do teste da concentração mínima inibitória (CMI), e

ainda da pesquisa dos genes *vanA* e *vanB*, que podem conferir resistência aos antibióticos glicopeptídeos em *S. aureus*. Assim pretendemos caracterizar a presença de resistência plena à vancomicina (VRSA; vancomycin-resistant *S. aureus*) ou resistência intermediária (VISA; vancomycin intermediate-resistant *S. aureus*). Casos clínicos, onde cepas de MRSA apresentam resistência à vancomicina, têm sido relatados em alguns países, mas felizmente ainda são relativamente raros. Tal resistência é preocupante visto que a vancomicina é um dos últimos recursos para o tratamento de tais infecções (McGuinness *et al.*, 2017). Cepas de VRSA (portadoras do gene *vanA*) foram relatados nos EUA e alguns países da Ásia (Tenover *et al.* 2004, Whitener *et al.* 2004, Tiwari & Sen 2006, Weigel *et al.* 2007, Saha *et al.* 2008, Askari *et al.* 2013, CDC 2013). Em dezembro 2012, o laboratório de microbiologia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, Brasil, detectou o primeiro caso de VRSA, na América Latina, em uma cepa de MRSA relacionada ao clone USA300 isolada de uma hemocultura (OPAS/OMS 2013). É interessante ressaltar que a maioria dos casos da presença do gene *vanA* em *S. aureus* ocorreu em cepas do CC5 (Viana *et al.*, 2021). Dessa forma, é interessante ressaltar que a cepa BMB 16.026 com resistência à vancomicina e teicoplanina no VITEK-2, ainda não caracterizada por nós, também pertença ao CC5.

A transferência horizontal de genes, com inserção de fragmentos genéticos que podem codificar genes de resistência, parece ter certa influência na disseminação de cepas multirresistentes (Kriegeskorte & Peters 2012).

Como mencionado anteriormente, a suscetibilidade a antimicrobianos auxilia no sucesso do tratamento de infecções e, por isso, espera-se que cepas resistentes sejam mais frequentes. Assim, as cepas que carregam o SCC*mecII*, o qual se encontra mais associado à múltipla resistência (Viana *et al.*, 2021), foram mais frequentes do que as cepas que possuem o SCC*mecIV*, as quais normalmente possuem resistência a menor um número de antimicrobianos (Bride *et al.*, 2019). Outra questão a ressaltar foi a forma com que as linhagens se distribuíram dentre as faixas etárias dos pacientes. A predominância de CC5-SCC*mecII* foi observada em todas as faixas etárias, exceto para crianças de até 10 anos de idade. Em crianças de 0 a 10 anos, CC5-SCC*mecIV* chegou a predominar, representando 60,0% dos casos enquanto CC5-SCC*mecII* esteve presente em 40,0%. CC5-SCC*mecII* começou a predominar a partir dos pacientes de 11 a 20 anos onde esteve presente em 100,0% das amostras, mantendo um alto padrão nas faixas subsequentes [21 a 50 anos (74,7%) e >50 anos (83,3%)]. Como sabemos CC5-SCC*mecII* é uma cepa associada a infecções hospitalares. Porém, pouco se conhece sobre o seu potencial patogênico. O fato de uma maior proporção das cepas presentes em pacientes

pediátricos pertencerem à linhagem CC5-SCC*mecIV*, também é um fator que deve ser abordado no futuro pelo nosso grupo. De fato, CC5-SCC*mecIV* é relatado no mundo inteiro como um clone pediátrico, por sua alta frequência em crianças e adolescentes. Um estudo feito em Israel com pacientes entre 0 e 18 anos, relatou a frequência do clone pediátrico (CC5-SCC*mecIV*) em 35% das amostras, sendo que 82% das infecções causadas por este clone foram adquiridas na comunidade e observadas principalmente em crianças mais jovens (Rokney *et al.*, 2019). Porém, em nosso estudo, os pacientes estavam hospitalizados. Mas cabe aqui ressaltar que reservas há de ser feita pelo fato de termos analisado apenas 5 amostras de crianças menores que 10 anos; porém, esta foi a única faixa etária em que SCC*mecIV* prevaleceu sobre SCC*mecII*.

Quanto a distribuição dos clones entre as regiões do Grande Rio e Serrana, observamos que as principais linhagens (CC5-SCC*mecII* e CC5-SCC*mecIV*) estavam presentes em todas as regiões. Neste trabalho nós também avaliamos a distribuição das linhagens em relação ao gênero dos pacientes e verificamos que CC5-SCC*mecII* também predominava, de forma semelhante, em ambos os gêneros, seguido de CC5-SCC*mecIV*. O mesmo foi observado nos estudos de Viana e colaboradores (2021), que também analisou amostras de MRSA de hospitais localizados nessa mesma região geográfica. Entretanto, em seus estudos aqueles autores utilizaram amostras de diferentes fontes clínicas e não somente de bacteremia.

7. CONCLUSÃO

1. Todas as amostras provenientes dos hospitais foram confirmadas como *S. aureus*. A amplificação do gene *mecA* se mostrou como uma importante ferramenta na identificação de cepas resistentes, uma vez que permitiu um diagnóstico rápido e, em conjunto com os testes de susceptibilidade, permite aos profissionais da saúde a escolha de uma terapia mais adequada.
2. Apesar de termos observado 5 linhagens de MRSA (CC5-SCC*mecIV*, CC5-SCC*mecII*, CC30-SCC*mecIV*, CC8-SCC*mecIV* e CC1-SCC*mecIV*) associadas a casos de bacteremias em hospitais nas Regiões do Grande Rio e Serrana, verificamos o domínio absoluto de CC5-SCC*mecII*, seguido de CC5-SCC*mecIV* sobre as outras linhagens.
3. Dentre as amostras de MRSA isoladas de pacientes com bacteremia, 44,6% apresentaram resistência a pelo menos três tipos de antimicrobianos não β -lactâmicos, ou seja, foram multirresistentes aos antimicrobianos. Dentre as amostras CC5-

SCC*mecII* que apresentaram multirresistência, uma apresentou resistência à vancomicina e teicoplanina no VITEK-2.

4. Não houve diferenças importantes em relação à distribuição das linhagens quanto à região geográfica dos hospitais, ao gênero dos pacientes ou faixa etária. Onde sempre o CC5-SCC*mecII* foi o clone predominante. A única diferença foi para crianças de 0-10 anos. Porém, o total de amostras analisado neste estudo foi pequeno para esta faixa etária.
5. Finalmente, nossos dados confirmam que cepas do complexo clonal 5 (CC5) portando SCC*mecII/IV* predominavam em bacteremias por MRSA em hospitais da Regiões do Grande Rio e Serrana do Estado do Rio de Janeiro, durante o período estudado.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

MRSA é um patógeno hospitalar pandêmico, que pode apresentar um número elevado de fatores de virulência, podendo, por este motivo, infectar qualquer tecido hospedeiro. Além disso, essa bactéria apresenta uma elevada plasticidade genética, podendo adquirir, facilmente, novos genes de resistência aos antimicrobianos. Estudos como este, que buscam investigar a natureza genética e a disseminação de linhagens e clones específicos de MRSA, são extremamente necessários, e servem de base para estudos mais aplicados, como a investigação de novos fatores de virulência e seus mecanismos, e o desenvolvimento de terapias alternativas para o tratamento de infecções causadas pelos MRSA. Além disso, a caracterização das linhagens envolvidas em um determinado processo infeccioso, em uma dada região, tem uma importância imediata para os pacientes, uma vez que cepas dentro de uma mesma linhagem de MRSA tendem a apresentar um perfil semelhante de susceptibilidade aos antimicrobianos. Assim, os médicos poderão ter maior assertividade na escolha do tratamento empírico de infecções hospitalares causadas pelos MRSA. A descoberta de que existe um complexo clonal de MRSA sendo mais frequente em infecções na corrente sanguínea nos leva a questionar como seria o desfecho dessas infecções. Seria o óbito mais elevado entre os pacientes infectados pelo CC5 MRSA em comparação com ICS causadas por exemplo por CC30 ou CC1? Quais seriam os fatores bacterianos envolvidos no predomínio do CC5-SCC*mecII*? Qual seria tipo de resistência à vancomicina da cepa BMB 16-026? Teria o gene *vanA* de *Enterococcus* sido adquirido por esta linhagem? Essas são algumas das perguntas que pretendemos responder no futuro.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdulgader, S.M., Shittu, A.O., Nicol, M.P. e Kaba, M. (2015). Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Africa: a systematic review. *Front Microbiol.* 6, 348.
- Askari, E., Tabatabai, S.M., Arianpoor, A. e Naderi-Nasab M. (2013). *vanA* positive vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: systematic search and review of reported cases. *Infect. Dis. Clin. Pract.* 21, 91-93.
- Aung, M.S, Urushibara, N, Kawaguchiya, M. Sumi, A., Shinagawa, M., Takahashi, S. e Kobayashi N. (2019). clonal diversity and genetic characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from a tertiary care hospital in Japan. *Microb. Drug. Resist.* 8, 1164-1175.
- Baig, S., Johannesen, T.B., Overballe-Petersen, S., Larsen, J., Larsen, A.R. e Stegger, M. (2018). Novel SCCmec type XIII (9A) identified in an ST152 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Infect. Gene. Evol.* 61, 74–76.
- Bidone, N., Giglio, N., Bakir, J., Sheehan, M.G., Arias López, M.P., Rosin, M., Fariás, J., Procopio, A. e Gentile A. (2008). Prescription and use of antibiotics at a pediatric intensive care unit in Buenos Aires City. *Arch. Argent. Pediatr.* 5, 409-15.
- Biomerieux (<https://www.biomerieux-microbio.com/pt-pt/como-e-que-o-vitek-2-cria-valores-de-cmi/>), acessado em 29/03/2022, às 15:30h.
- Biomerieux Brasil (<https://www.biomerieux.com.br/produto/vitekr-2>), acessado em 29/03/2022 às 19:25.
- Bhattacharya, M., Berends, E.T.M., Chan, R., Schwab, E., Roy, S., Sen, C.K., Torres, V.J. e Wozniak, D.J. (2018). *Staphylococcus aureus* biofilms release leukocidins to elicit extracellular trap formation and evade neutrophil-mediated killing. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 28, 7416-7421.
- Botelho, A., Cerqueira E Costa, M.O., Moustafa, A.M., Beltrame, C.O., Ferreira, F.A., Côrtes, M.F., Costa, B., Silva, D., Bandeira, P.T., Lima, N., Souza, R.C., de Almeida, L., Vasconcelos, A., Narechania, A., Ryan, C., O'Brien, K., Kolokotronis, S.O., Planet, P.J., Nicolás, M.F. e Figueiredo, A.M. (2019). Local Diversification of Methicillin- Resistant *Staphylococcus aureus* ST239 in South America After Its Rapid Worldwide Dissemination. *Front. Microbiol.* 10, 82.
- Boye, K., Bartels, M.D., Andersen, I.S., Moller, J.A. e Westh, H. (2007). A new multiplex PCR for easy screening of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* SCCmec types I-V. *J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 7, 725.
- Bride, L.L., Pereira, M.F., Barbosa, M.C., Silva, N.C., Klein, N.M., Nascimento, T.C. e Schuenck, RP. (2019). Differences in resistance profiles and virulence genes among methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* of different lineages at a public tertiary hospital. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 52, e20190095.
- Bukharie H. A. (2010). A review of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* for primary care physicians. *J. of Fam. & Commun. Med.* 17, 117–120.
- Byrd, A.L., Belkaid, Y. e Segre, J.A. (2018). The human skin microbiome. *Nat. Rev. Microbiol.* 16, 143–155.
- Carmo, M.S., Inoue, F., Andrade, S.S., Paschoal, L., Silva, F.M. e Oliveira, V.G.S. (2011). New multilocus sequence typing of MRSA in São Paulo, Brazil. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 44, 1013-1017.
- Cheung, G., Bae, J. S., & Otto, M. (2021). Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence*, 12, 547–569.
- Choo, E.J. (2017). community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in nosocomial infection. *Infect. Chemother.* 2, 158-159.

- Cockfield, J.D., Pathak, S., Edgeworth, J.D. e Lindsay, J.A. (2007). Rapid determination of hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineages. *J. Med. Microbiol.* 56, 614–619.
- Côrtes, M. F., Botelho, A., Bandeira, P. T., Mouton, W., Badiou, C., Bes, M., Lima, N., Soares, A., Souza, R. C., Almeida, L., Martins-Simoes, P., Vasconcelos, A., Nicolás, M. F., Laurent, F., Planet, P. J. e Figueiredo, A. (2021). Reductive evolution of virulence repertoire to drive the divergence between community- and hospital-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of the ST1 lineage. *Virulence* 12, 951–967.
- Cuervo, G., Camoez, M., Shaw, E., Dominguez, M.A., Gasch, O. e Pujol, M. (2015). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) catheter-related bacteraemia in haemodialysis patients. *BMC Infect. Dis.* 15, 1.
- da Silva, L.S.C., Andrade, Y.M.F.S., Oliveira, A.C., Cunha, B.C., Oliveira, E.G., Cunha, T.S., Mafra, S.S., Almeida, J.B., Carvalho, S.P., Nascimento, F.S., Santos Junior, M.N., Chamon, R.C., Santos, K.R.N., Campos, G.B. e Marques, L.M. (2020). Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization among healthcare workers at a tertiary care hospital in northeastern Brazil. *Infect. Prev. Pract.* 2, 100084.
- De Paula, A.O. (2011). Custos com antimicrobianos no tratamento de pacientes com infecção da corrente sanguínea em uma unidade de terapia intensiva. dissertação (Mestrado em Enfermagem). Escola de Enfermagem, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. <http://hdl.handle.net/1843/GCPA-8Q9NB8>.
- Deurenberg, R.H., Vink, C., Kalenic, S., Friedrich, A.W., Bruggeman, C.A. e Stobberingh, E.E. (2007). The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. and Infect.* 13, 222–235.
- Dreyfus, J.G., Yu, H., Begier, E., Gayle, J. e Olsen, M.A. (2021). Incidence and burden of *Staphylococcus aureus* infection after orthopedic surgeries. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* 26:1-8.
- Enright, M.C., Robinson, D.A., Randle, G., Feil, E.J., Grundmann, H. e Spratt B.G. (2002). The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 7687-92.
- Figueiredo, A.M.S. (2017). What is behind the epidemiological difference between community-acquired and health-care associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*? *Virulence*, 8, 640–642.
- Figueiredo, A.M.S. e Ferreira, F.A. (2014). The multifaceted resources and microevolution of the successful human and animal pathogen methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Mem. Inst. Osw. Cruz.* 109, 265–278.
- Fluit, A.C. (2012). Livestock-associated *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Infect.* 18, 735–744.
- García-Álvarez, L., Holden, M.T., Lindsay, H., Webb, C.R., Brown, D.F., Curran, M.D., Walpole, E., Brooks, K., Pickard, D.J., Teale, C., Parkhill, J., Bentley, S.D., Edwards, G.F., Girvan, E.K., Kearns, A.M., Pichon, B., Hill, R.L., Larsen, A.R., Skov, R.L., Peacock, S.J., Maskell, D.J. e Holmes M.A. (2011). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the United Kingdom and Denmark: a descriptive study. *Lancet. Infect. Dis.* 11, 595–603.
- Gerken, T.J. Roberts, M.C., Dykema, P., Melly, G., Lucas, D., De Los Santos, V., Gonzalez, J., Butaye, P. e Wiegner, T.N. (2021). Environmental surveillance and characterization of antibiotic resistant *Staphylococcus aureus* at coastal beaches and rivers on the island of Hawai. *Antibiotics* 10, 980.
- Hassoun, A., Linden, P.K. e Friedman, B. (2017). Incidence, prevalence, and management of MRSA bacteremia across patient populations—a review of recent developments in MRSA management and treatment. *Crit. Care.* 21, 211.

- Jin, Y., Yu, X., Chen, Y., Chen, W., Shen, P., Luo, Q. e Xiao, Y. (2020). characterization of highly virulent community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST9-SCCmec XII causing bloodstream infection in China. *Emerg. Microb. Infect.* 1, 36.
- Katayama, Y., Ito, T. e Hiramatsu, K. (2000). A new class of genetic element, *Staphylococcus aureus* chromosome *mec*, encodes methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Agents. Chemother.* 44, 1549-1555.
- Kateete, D.P., Bwanga, F., Seni, J., Mayanja, R., Kigozi, E., Mujuni, B., Ashaba, F.K., Baluku, H., Najjuka, C.F., Källander, K., Rutebemberwa, E., Asiimwe, B.B. e Joloba, M.L. (2019). CA-MRSA and HA-MRSA coexist in community and hospital settings in Uganda. *Antimicrob. Resist. Infect. Control*, 8, 94.
- Köck, R., Becker, K., Cookson, B., van Gemert-Pijnen, J. E., Harbarth, S., Kluytmans, J., Mielke, M., Peters, G., Skov, R. L., Struelens, M. J., Tacconelli, E., Navarro Torné, A., Witte, W., e Friedrich, A. W. (2010). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): burden of disease and control challenges in Europe. *Euro. Communic. Dis. Bulle.* 15, 19688.
- Kondo, Y., Ito, T., Ma, X. X., Watanabe, S., Kreiswirth, B. N., Etienne, J., e Hiramatsu, K. (2007). Combination of multiplex PCRs for *staphylococcal* cassette chromosome *mec* type assignment: rapid identification system for *mec*, *ccr*, and major differences in *junkyard* regions. *Antimicro. agent. and chemother.*, 51, 264–274.
- Kong, E.F., Johnson, J.K., e Jabra-Rizk, M.A. (2016). Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: An Enemy amidst Us. *PLOS. Pathog.* 12, e1005837.
- Kriegeskorte, A. e Peters, G. (2012). Horizontal gene transfer boosts MRSA spreading. *Nat Med* 18, 662–663.
- Laupland, K.B. (2013). Incidence of bloodstream infection: a review of population-based studies. *Clin. Microbiol. Infect.* 19, 492–500.
- Lakhundi, S. e Zhang, K. (2018). Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. *Clini. Microbiol. Rev.* 31, e00020-18.
- Lauterbach, R., Międzobrodzki, J. e Kosecka-Strojek, M. (2021). Epidemiology and pathogenesis of *Staphylococcus* bloodstream infections in humans: a review. *Pol. J. Microbiol.* 70, 13-23.
- Li, S., Skov, R.L., Han, X., Larsen, A.R., Larsen, J., Sørum, M., Wulf, M., Voss, A., Hiramatsu, K. e Ito, T. (2011). Novel types of staphylococcal cassette chromosome *mec* elements identified in clonal complex 398 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 3046–3050.
- Lindsay, J.A. (2013). Hospital-associated MRSA and antibiotic resistance—What have we learned from genomics? *Internat. J. Med. Microbiol.* 303, 318–323.
- Lisowska-Łysiak, K., Tchouaket, E.N., Beogo, I., Sia, D., Kilpatrick, K., Séguin, C., Baillot, A., Nadar, M., Parisien, N. e Boivin, S. (2020). Protocol for a systematic review of economic analyses of nosocomial infection prevention and control interventions in OECD hospitals. *BMJ Open* 10, e037765.
- Loncaric, I., Kubber-Heiss, A., Posautz, A., Stalder, G.L., Hoffmann, D., Rosengarten, R. e Walzer C. (2013). Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus spp.* carrying the *mecC* gene, isolated from wildlife. *J Antimicrob. Chemother.* 68, 2222–2225.
- McGuinness, W.A., Malachowa, N. e DeLeo, F.R., (2017). Vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus* *Yale. J. Biol. Med.* 2, 269-281.
- Mediavilla, J.R., Chen, L., Mathema, B. e Kreiswirth, B.N. (2012). Global epidemiology of community-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). *Curr. Opinion Microbiol.* 15, 588–595.

- Morris, D.E., Cleary, D.W. e Clarke, S.C. (2017). Secondary Bacterial Infections Associated with *Influenza* Pandemics. *Front. Microbiol*, 8, 1041.
- Mühlberg, E., Umstätter, F., Kleist, C., Domhan, C., Mier, W. e Uhl, P. (2020). Renaissance of vancomycin: approaches for breaking antibiotic resistance in multidrug-resistant bacteria. *Can. J. Microbiol.* 66, 11-16.
- Murray, P.R., Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Tenover, M.A. e Tenover, R.H. (2003). *Staphylococcus*, *Micrococcus* and other catalase-positive cocci that aerobically. *Man. Clin. Microbiol.* 1, 384-404.
- NCBI, Taxonomy (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=1279>, acessado em 23/09/2021, às 13:46h).
- Oliveira, D., Borges, A., e Simões, M. (2018). *Staphylococcus aureus* toxins and their molecular activity in infect diseases. *Toxins* 10, 252.
- Oliveira, D.C. e de Lencastre, H. (2002) Multiplex PCR Strategy for Rapid Identification of Structural Types and Variants of the *mec* Element in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agent. Chemother.* 46, 2155-2161.
- OPAS (2002). Organização Pan- Americana da Saúde. (2013) Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* situation in the Americas. Disponível em: <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2013/27-June-2013-Staphylococcus>.
- Pérez-Montarelo, D., Viedma, E., Larrosa, N., Gómez-González, C., Ruiz de Gopegui, E., Muñoz-Gallego, I., San Juan, R., Fernández-Hidalgo, N., Almirante, B. e Chaves, F. (2018). Molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* bacteremia: association of molecular factors with the source of infection. *Front. Microbiol* 9, 2210.
- Pottumarthy, S., Schapiro, J.M., Prentice, J.L., Houze, Y.B., Swanzy, S.R., Fang, F.C. e Cookson, B.T. (2004). Clinical isolates of *Staphylococcus intermedius* masquerading as methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. of Clin. Microbiol.* 42, 5881–5884.
- Randall, M., Minahan, T., Mesisca, M. e Gnass, S. (2020). Nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia in incarcerated patients with severe COVID-19 infection. *Am. J. Infect. Control.* 48, 1568–1569.
- Ratti, R.P. e Sousa, C.P. (2009). *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (MRSA) e infecções nosocomiais. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.* 30, 9-16.
- Reed, K.D., Stemper, M.E. e Shukla, S.K. (2007). Pulsed-Field Gel Electrophoresis of MRSA. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Methods Mol. Biol.* 391, 59–69.
- Rensing, C., Moodley, A., Cavaco, L.M. e McDevitt, S.F. (2018). Resistance to metals used in agricultural production. *Microbiol. Spectr.* 6, 2.
- Rokney, A., Baum, M., Ben-Shimol, S., Sagi, O., Anuka, E., Agmon, V., Greenberg, D., Valinsky, L. e Danino, D. (2019). Dissemination of the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pediatric clone (ST5-T002-IV-PVL+) as a major cause of community-associated staphylococcal infections in Bedouin children, Southern Israel. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 38, 230–235.
- Rongsanam, P., Yano, T., Yokart, W., Yamsakul, P., Sutammeng, S., Udpaun, R. e Anukool, U. (2020). Acquisition risk factors of the SCC*mec* IX-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in swine production personnel in Chiang Mai and Lamphun provinces, Thailand. *Antibiotics* 9, 651.
- Rozenbaum, R., Sampaio, M.G., Batista, G.S., Garibaldi, A.M., Terra, G.M., Souza, M.J., Vieira, E.M., Silva-Carvalho, M.C., Teixeira, L.A. e Figueiredo A.M. (2009). The first report in Brazil of severe infection caused by community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). *Braz. J. Med. Biol. Res.* 8, 756-60.

Saha, B., Singh, A.K., Ghosh, A. e Bal, M. (2008). Identification and characterization of a vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from Kolkata (South Asia). *J. Med. Microbiol.* 57, 72-79.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. e Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a Laboratory Manual*. Cold. Spring Harb. 2, 545.

Schleifer, K.H. e Bell, J.A. "Family VIII. (2009). *Staphylococcaceae* fam. nov." In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. vol. 3 (The Firmicutes). De Vos, P., Garrity, G.M., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.H. e W.B. Whitman., eds, 2. ed. (Londres, Nova Iorque: Springer), pp. 392.

Schlievert, P.M. e Davis, C.C. (2020). Device-associated menstrual toxic shock syndrome. *Microbiol. Rev.* 27, 19-32.

Schlotter, K., Huber-Schlenstedt, R., Gangl, A., Hotzel, H., Monecke, S., Muller, E., Reissig, A., Proft, S. e Ehrlich R. (2014). Multiple cases of methicillin-resistant CC130 *Staphylococcus aureus* harboring *mecC* in milk and swab samples from a Bavarian dairy herd. *J. Dairy. Sci.* 97, 2782–2788.

Shore, A.C., Deasy, E.C., Slickers, P., Brennan, G., O'Connell, B., Monecke, S. e Coleman, D.C. (2011). Detection of *staphylococcal cassette chromosomemec* type xi carrying highly divergen *mecA*, *mecI*, *mecR1*, *blaZ*, and *ccr* genes in human clinical isolates of clonal complex 130 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 3765–3773.

Silva-Carvalho, M.C., Bonelli, R.R., Souza, S., Moreira, L.C., Galvão dos Santos, M.S., Conceição, S.J., Mello Jr, J.M., Carballido, P.N., Rito, V.V., Vieira, L., Teixeira, A. e Figueiredo A.M.S, (2009). Emergence of multiresistant variants of the community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineage ST1-SCC*mecIV* in 2 hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 65, 300-305.

Singh-Moodley, A., Strasheim, W., Mogokotleng, R., Ismail, H. e Perovic, O. (2019). Unconventional *SCCmec* types and low prevalence of the Pantone-Valentine Leukocidin exotoxin in South African blood culture *Staphylococcus aureus* surveillance isolates, 2013-2016. *PLOS ONE* 14, e0225726.

Teixeira, L.A., Resende, C.A., Ormonde, L.R., Rosenbaum, R., Figueiredo, A.M.S., de Lencastre, H. e Tomasz, A. (1995). Geographic spread of epidemic multiresistant *Staphylococcus aureus* clone in Brazil. *J. Clin. Microbiol.* 33, 2400-2404.

Teixeira, M.M., Araújo, M.C., Silva-Carvalho, M.C., Beltrame, C.O., Oliveira, C.C.H.B., Figueiredo, A.M.S. e Oliveira, A.G. (2012). 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.* 45, 637–643.

Tenover, F.C., Weigel, L.M., Appelbaum, P.C., McDougal, L.K., Chaitram, J., McAllister, S., Clark, N., Killgore, J., O'Hara, C.M., Jevitt, L., Patel, J.B. e Bozdogan, B. (2004). Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate from a patient in Pennsylvania. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 275-280.

Tiwari, H.K. e Sen, M.R. (2006). Emergence of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) from a tertiary care hospital from northern part of India. *BMC Infect. Dis.* 6, 156.

Turner, N.A., Sharma-Kuinkel, B.K., Maskarinec, S.A., Eichenberger, E.M., Shah, P.P., Carugati, M., Holland, T.L. e Fowler, V.G., Jr (2019). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. *Nature Rev. Microbiol.* 17, 203–218.

Tzagoloff, H. e Novick, R. (1977). Geometry of cell division in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 129, 343-350.

Vestergaard, M., Cavaco, L.M., Sirichote, P., Unahalekhaka, A., Dangsakul, W., Svendsen, C.A. e Hendriksen, R. S. (2012). *SCCmec* type IX element in methicillin resistant *Staphylococcus aureus spa* type t337 (cc9) isolated from pigs and pork in Thailand. *Front. Microbiol.* 3, 103.

Viana, A.S., Nunes Botelho, A.M., Moustafa, A.M., Boge, C.L.K., Pires Ferreira, A.L., da Silva Carvalho M.C., Guimarães, M.A., Costa, B.S.S., de Mattos, M.C., Maciel, S.P., Echevarria-Lima, J., Narechania, A., O'Brien, K., Ryan, C., Gerber, J.S., Carvalho, B.T.F., Figueiredo, A.M.S. e Planet, P.J. (2021). Multidrug-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with bacteremia and monocyte evasion, Rio de Janeiro, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 27, 2825-2835.

Wang, W., Hu, Y., Baker, M., Dottorini, T., Li, H., Dong, Y., Bai, Y., Fanning, S., & Li, F. (2022). Novel SCCmec type XV (7A) and two pseudo-SCCmec variants in foodborne MRSA in China. *J. antimicro. chemothe.*, dkab500. Advance online publication

Weigel, L.M., Donlan R.M., Shin, DH., Jensen B., Clark, N.C., Mcdugal, L.K., Zhu, W., Musser, K.A., Thompson, J., Kohlerschmidt, D., Dumas, N., Limberger, R.J. e Patel, J.B. (2007). High-level vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with a polymicrobial biofilm. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 231-238.

Wenyuan, Z., Xinhui, L., Todd, O., Lei, S., Jiaoyan, R. e He, Y. (2018). WGS analysis of ST9-MRSA-XII isolates from live pigs in China provides insights into transmission among porcine, human and bovine hosts. *J. Antimicrob. Chemother.* 73, 2652–2661.

Whitener, C.J., Park, S.Y., Browne, F.A., Parent, L.J., Julian, K., Bozdogan, B., Appelbaum, P.C., Chaitram, J., Weigel, L.M., Jernigan, J., Mcdougal, L.K., Tenover, F.C. e Fridkin, S.K. (2004).

Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in the absence of vancomycin exposure. *Clin. Infect. Dis.* 38, 1049-1055. Wright, A. J. (1999). The Penicillins. *Mayo. Clinic. Proc.* 74, 290–307.

ANEXOS

Tabela 1A - Relação das 74 amostras de bacteremia utilizadas neste estudo.

Amostra	Data da Coleta	Hospital	Região	Idade	Gênero
BMB 16.001	07/03/2016	A ^a	NR ^b	3	NR
BMB 16.006	01/09/2016	B	Baixada Fluminense	NR	M ^c
BMB 16.007	06/09/2016	B	Baixada Fluminense	NR	F
BMB 16.009	01/09/2016	B	Fluminense	NR	M
BMB 16.010	15/09/2016	C	Zona Oeste Baixada	NR	M
BMB 16.011	20/09/2016	B	Fluminense	NR	F
BMB 16.015	11/10/2016	D	Zona Oeste Baixada	43	F
BMB 16.016	16/10/2016	E	Fluminense	22	M
BMB 16.017	19/10/2016	F	Zona Norte	42	M
BMB 16.018	27/10/2016	G	Zona Oeste	17	F
BMB 16.019	27/10/2016	G	Zona Oeste	17	M
BMB 16.021	04/11/2016	V	Costa Verde Região	72	F
BMB 16.022	08/11/2016	X	Metropolitana	58	M
BMB 16.023	14/11/2016	G	Zona Oeste	45	F
BMB 16.024	16/11/2016	F	Zona Norte Região	NR	F
BMB 16.025	18/11/2016	H	Metropolitana	73	M
BMB 16.026	19/11/2016	I	Região Serrana	58	M
BMB 16.027	14/12/2016	F	Zona Norte	69	F
BMB 16.028	07/12/2016	J	NR	NR	M
BMB 16.029	18/12/2016	D	Zona Oeste	79	F
BMB 17.001	05/01/2017	D	Zona Oeste Região	76	F
BMB 17.006	08/01/2017	H	Metropolitana	75	F
BMB 17.007	12/01/2017	L	Zona Sul	20	M
BMB 17.011	30/01/2017	F	Zona Norte	80	M
BMB 17.012	30/01/2017	F	Zona Norte	80	M
BMB 17.013	27/01/2017	D	Zona Oeste Região	79	F
BMB 17.015	06/02/2017	H	Metropolitana	59	F
BMB 17.019	06/03/2017	M	NR	38	M
BMB 17.020	09/03/2017	J	NR Baixada	95	F
BMB 17.021	11/03/2017	E	Fluminense	58	F
BMB 17.022	12/03/2017	F	Zona Norte Baixada	48	F
BMB 17.024	16/03/2017	E	Fluminense	40	M
BMB 17.025	22/03/2017	J	NR	64	F
BMB 17.027	07/04/2017	J	NR	64	F
BMB 17.032	25/04/2017	I	Região Serrana	67	M

BMB 17.033	02/05/2017	J	NR	86	M
BMB 17.034	02/05/2017	J	NR	4 M	M
BMB 17.038	16/05/2017	D	Zona Oeste	85	F
			Região		
BMB 17.039	25/05/2017	H	Metropolitana	24	F
BMB 17.042	14/06/2017	J	NR	86	M
BMB 17.047	15/08/2017	N	Zona Oeste	81	M
BMB 17.048	01/09/2017	I	Região Serrana	83	M
BMB 17.049	30/08/2017	J	NR	7 M	M
BMB 17.053	27/09/2017	D	Zona Oeste	71	M
BMB 17.055	03/10/2017	D	Zona Oeste	46	F
BMB 17.057	17/10/2017	O	Região Serrana	59	F
			Região		
BMB 17.058	17/11/2017	P	Metropolitana	30	F
BMB 17.059	20/11/2017	I	Região Serrana	82	F
BMB 17.060	16/11/2017	I	Região Serrana	84	F
BMB 18.001	22/12/2017	I	Região Serrana	87	M
BMB 18.002	28/12/2017	O	Região Serrana	51	F
BMB 18.004	21/12/2017	D	Zona Oeste	37	M
BMB 18.005	22/12/2017	I	Região Serrana	87	M
BMB 18.006	12/12/2017	D	Zona Oeste	81	M
			Baixada		
BMB 18.008	07/12/17	E	Fluminense	40	M
BMB 18.010	14/12/2017	D	Zona Oeste	82	M
BMB 18.011	18/01/2018	O	Região Serrana	83	M
BMB 18.013	06/01/2018	Q	Zona Sul	63	M
BMB 18.019	17/01/2018	F	Zona Norte	54	F
BMB 18.020	22/01/2018	D	Zona Oeste	37	M
BMB 18.022	22/01/2018	L	Zona Sul	20	F
BMB 18.023	28/01/2018	D	Zona Oeste	37	M
BMB 18.024	29/01/2018	I	Região Serrana	82	F
BMB 18.025	08/02/2018	I	Região Serrana	82	F
BMB 18.026	04/02/2018	D	Zona Oeste	37	M
BMB 18.028	14/03/2018	D	Zona Oeste	3	F
BMB 18.029	11/03/2018	R	Zona Sul	85	M
BMB 18.030	13/03/2018	S	Zona Sul	67	M
BMB 18.033	26/04/2018	T	Região Serrana	65	M
BMB 18.035	07/05/2018	T	Região Serrana	41	M
BMB 18.037	15/06/2018	U	Zona Sul	75	M
BMB 18.038	15/06/2018	I	Região Serrana	23	M
			Região		
BMB 18.039	03/07/2018	H	Metropolitana	78	F
BMB 18.046	17/09/2018	F	Zona Norte	81	M

^aCada letra representa um hospital diferente; NR-não reportado na ficha do paciente.

^cM-masculino, C-feminino.

BMB17.049	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	5	II
BMB17.053	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	5	II
BMB17.055	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	5	II
BMB17.057	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	5	II
BMB17.058	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	5	II
BMB17.059	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	5	II
BMB17.060	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	5	II
BMB18.001	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	5	IV
BMB18.002	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	5	II
BMB18.004	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	5	II
BMB18.005	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	5	IV
BMB18.006	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	5	II
BMB18.008	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	5	II
BMB18.010	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	5	II
BMB18.011	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	5	II
BMB18.013	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	5	II
BMB18.019	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	5	II
BMB18.020	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	5	II
BMB18.022	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	5	II
BMB18.023	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	5	II
BMB18.0024	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	5	II
BMB18.0025	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	5	II
BMB18.0026	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	5	II
BMB18.028	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	5	IV
BMB18.029	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	5	II
BMB18.030	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	5	IV
BMB18.0033	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	5	II
BMB18.0035	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	5	II
BMB18.037	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	5	II
BMB18.038	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	5	II
BMB18.0039	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	5	II
BMB18.0046	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	5	II

^aPEN-penicilina; CLI-clindamicina; ERI-eritromicina; OXA-oxacilina; GEN-gentamicina; LIN-linezolida; TEI- teicoplanina; VAN-Vancomicina; CIP-ciprofloxacina; TET-tetraciclina; RIF-rifampicina; AMP-ampicilina; MOX-moxfloxacina.^bCC-complejo clonal. ^cS-sensível; R-Resistente.