

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DILAIR CAMARGO DE SOUZA

DETECÇÃO DE COLÔNIAS PEQUENAS VARIANTES DE *Staphylococcus aureus* EM AMOSTRAS RESPIRATÓRIAS DE PACIENTES COM FIBROSE CÍSTICA

CURITIBA

2017

DILAIR CAMARGO DE SOUZA

DETECÇÃO DE COLÔNIAS PEQUENAS VARIANTES DE *Staphylococcus aureus* EM AMOSTRAS RESPIRATÓRIAS DE PACIENTES COM FIBROSE CÍSTICA

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Medicina Interna e Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna, Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Nelson Augusto Rosário Filho
Co-orientadora: Dra. Laura Lúcia Cogo

CURITIBA

2017

S729 Souza, Dilair Camargo de

Detecção de colônias pequenas variantes de *Staphylococcus aureus* em amostras respiratórias de pacientes com fibrose cística. / Dilair Camargo de Souza. -- Curitiba, 2017.

81 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Nelson Augusto do Rosário Filho

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Laura Lúcia Cogo

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

1. *Staphylococcus aureus*. 2. Fibrose cística.
3. Timidina. I. Rosario Filho, Nelson Augusto do. II. Cogo, Laura Lúcia. III. Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

NLMC: WI 820



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor CIÊNCIAS DA SAÚDE
Programa de Pós-Graduação MEDICINA INTERNA

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MEDICINA INTERNA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **DILAIR CAMARGO DE SOUZA** intitulada: "**DETECÇÃO DE COLÔNIAS PEQUENAS VARIANTES DE *Staphylococcus aureus* EM AMOSTRAS RESPIRATÓRIAS DE PACIENTES COM FIBROSE CÍSTICA**", após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

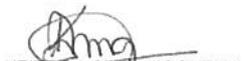
A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 15 de Agosto de 2017.



NELSON AUGUSTO ROSÁRIO FILHO

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)



KEITE DA SILVA NOGUEIRA

Avaliador Externo (UFPR)



CARLOS ANTONIO RIEDI

Avaliador Externo (FPP)

*Dedico este trabalho aos
meus pais, Gercino e
Carolina por todo o amor,
orientação e incentivo que
sempre me deram.*

AGRADECIMENTOS

Um caminho se faz caminhando, e nele vamos encontrando muitos companheiros de jornada que nos incentivam sempre a ir em frente.

Agradeço de todo o meu coração a Deus e aos meus pais pelo dom da vida. Aos anjos do universo físicos e espirituais que nos protegem e auxiliam nos momentos difíceis, dando-nos coragem para seguir.

Agradeço aos meus irmãos, cunhados e sobrinhos por todo o amor, carinho e por compartilharem os momentos difíceis, assim como os momentos felizes com o surgimento de algum “fruto” na realização deste trabalho. Agradeço especialmente às minhas irmãs Dilma e Marli sempre presentes, e à Silvana que em alguns momentos ocupava o lugar de minha mãe, dizendo “cuidado, você tem que descansar um pouco” ou “se você está inspirada, vai em frente”. Aos meus sobrinhos Robson e Alessandra, que contribuíram de forma direta quando encontrei alguns “probleminhas” de informática e na correção do inglês.

Ao meu orientador Dr. Nelson Augusto Rosário Filho, pela oportunidade, confiança depositada em mim e ensinamentos que contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal.

À minha co-orientadora Laura Lúcia Cogo e pela colaboração de Jussara Kasuko Palmeiro, colegas de trabalho e amigas, me incentivando, ensinando e contribuindo em todas as etapas deste trabalho.

Ao meu amigo Roberto Ribeiro dos Santos pela contribuição com seus conhecimentos técnicos.

À Helena Aguilar Peres Homem de Mello de Souza pelo primeiro “empurrão”; Libera Maria Dalla Costa pelas sugestões importantes e apresentação do Trabalho no European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases - 2017, na

Áustria; Adriane Ceschin Maestri, através de atitudes e palavras de estímulo e Keite da Silva Nogueira, pelas observações que muito contribuíram para esta dissertação.

Aos colegas do laboratório, Ana Paula de Oliveira Tomaz, Adriana Beatriz Pagnussat, Gislene Maria Botão Kussen, Alessandro Rogerio Rosa, Angela Maria de Souza e Divandrea Martins Matoski, sempre prontos a ajudar.

Aos demais colegas do laboratório de Bacteriologia, que através da realização de suas funções com qualidade e profissionalismo em muito contribuíram com este trabalho.

Aos colegas, das Seções de Micologia e Central de Soluções e Meios de Cultura da Unidade de laboratório do Hospital de Clínicas da UFPR, pela colaboração.

À Dra. Marisol Dominguez Muro, responsável pela Unidade de Laboratório de Análises Clínicas do Hospital de Clínicas da UFPR, pelo apoio e por ter permitido a realização da pesquisa neste serviço.

À coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna/UFPR Prof^a. Dr^a. Iara José Messias Reason, à secretária Valéria Knapp, aos professores pelo conhecimento transmitido, e aos colegas de turma com os quais compartilhei importantes momentos.

Os meus sinceros agradecimentos ao Dr. Carlos Antonio Riedi e demais profissionais dos ambulatórios de Fibrose Cística.

A todos os profissionais que, direta ou indiretamente participaram deste estudo, entre eles, Rafaella Miravalhes, Tamilly Christina da Silva Lemos, Milena Hadad, Tânia Valéria Pirolo Assad, Alessandra Daur, Lavinia Nery Villa Stangler Arend, Danieli Conte e Victor Soares de Oliveira Vaz.

“Seja você quem for, seja qual for a posição social que você tenha na vida, a mais alta ou a mais baixa, tenha sempre como meta muita força, muita determinação e sempre faça tudo com muito amor e com muita fé em Deus, que um dia você chega lá. De alguma maneira você chega lá.”

Ayrton Senna

RESUMO

Em pacientes com fibrose cística (FC) ocorre a produção de secreção respiratória viscosa, que aumenta a probabilidade de infecções bacterianas. *Staphylococcus aureus* é o primeiro patógeno capaz de colonizar e promover infecções nas vias aéreas nestes pacientes. Variantes de colônias pequenas (SCVs) têm surgido em *S. aureus* relacionadas a infecções crônicas e recorrentes. SCVs são um desafio para o laboratório, principalmente porque são mutantes auxotróficos, que necessitam de substratos específicos para seu crescimento. Os objetivos deste trabalho foram avaliar as técnicas de diagnóstico para a detecção das colônias pequenas variantes de *S. aureus* (SCVs) em infecções pulmonares de pacientes com Fibrose Cística, atendidos nos ambulatórios do HC-UFPR, assim como determinar a prevalência deste fenótipo e o melhor método para a detecção da suscetibilidade aos agentes antimicrobianos. Foram coletadas e semeadas em Ágar Manitol, amostras respiratórias de 246 pacientes com FC atendidos entre 2014 e 2016. Colônias pequenas suspeitas de SCVs foram identificadas usando ágar com 7,5% de NaCl, teste da catalase e da coagulase, painel de identificação do Vitek[®]2 Compact, MALDI-TOF MS (Vitek[®] MS - bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) e PCR para o gene *nuc*. Foi determinada a dependência nutricional à hemina, menadiona ou timidina em Mueller Hinton Agar (MHA) por dois métodos: 1) MHA suplementado com estes substratos antes da semeadura e, 2) adição de discos contendo estes substratos sobre a superfície do MHA previamente semeado. O teste de suscetibilidade antimicrobiana foi realizado por disco difusão e microdiluição em caldo, e os meios utilizados nos testes foram suplementados com timidina. Determinantes de resistência aos beta-lactâmicos e macrolídeos foram pesquisados por PCR. Dos 246 pacientes, *S. aureus* foi isolado em 182 (74%) pacientes. SCVs foram isolados em 11 pacientes (4,5%) e todos foram timidina-dependentes. O antibiograma demonstrou que 91% dos isolados eram resistentes a múltiplos fármacos, 9% eram resistentes à oxacilina (MRSA) e rifampicina, e todos eram suscetíveis à vancomicina e linezolida. Os genes *mecA* (1), *ermA* (1), *ermB* (1), *ermC* (2) e *msrB* (11) foram encontrados entre os isolados. Esta pesquisa indica um alerta para os microbiologistas sobre a dificuldade no reconhecimento e identificação de SCVs de *S. aureus* na rotina laboratorial. Além disso, mostra uma preocupação com o tratamento, uma vez que a maioria dos isolados demonstrou ser multirresistente.

Palavras-chave: *S. aureus*; Variantes de colônias pequenas; Dependente de timidina; SCVs

ABSTRACT

In patients with cystic fibrosis (CF) the production of viscous respiratory secretion occurs, which increases the probability of bacterial infections. *Staphylococcus aureus* is the first pathogen able to colonize and promote infections in the airways in these patients. Variants of small colonies (SCVs) have arisen in *S. aureus* related to chronic and recurrent infections. SCVs are a large challenge for the laboratory, mainly because they are auxotrophic mutants, which require specific substrates for their growth. The objectives of this study were to evaluate the diagnostic techniques for detection of *S. aureus* small colony variants (SCVs) in pulmonary infections of patients with cystic fibrosis attended at HC-UFPR ambulatory, as well as to determine the prevalence and the best method for detection of susceptibility to antimicrobial agents. Respiratory samples from 246 patients with CF were collected and inoculated in Mannitol Agar from 2014 to 2016. Small colonies suspected of SCV were identified using 7,5% NaCl agar, catalase and coagulase tests, Vitek®2 Compact identification panel, MALDI-TOF (Vitek® MS - bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) and PCR for the *nuc* gene. Nutritional dependence was determined to hemin, menadione or thymidine in Mueller Hinton Agar (MHA) by two methods: 1) MHA supplemented with these substrates before inoculation; and 2) addition of disks containing these substrates on the surface of the MHA previously inoculated. The antimicrobial susceptibility test was performed by disk diffusion technique and broth microdilution technique, both supplemented with thymidine. Determinants of resistance to beta-lactams and macrolides were investigated by PCR. Of the 246 patients *S. aureus* was isolated in 182 (74%) patients. SCVs were isolated in 11 patients (4,5%) and all were thymidine-dependent. The antibiogram showed that 91% of the isolates were resistant to multiple drugs, 9% were resistant to oxacillin (MRSA) and rifampicin, and all were susceptible to vancomycin and linezolid. The *mecA* (1), *ermA* (1), *ermB* (1), *ermC* (2) and *msrB* (11) genes were found among the isolates. This research indicates an alert for the microbiologists about the difficulty in the recognizing and identifying of SCVs of *S. aureus* in the laboratory routine. In addition, it is concern with treatment, since the majority of the isolates proved to be multiresistant.

Keywords: *S. aureus*; small colony variants; Thymidine dependent; SCVs

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	FLUXOGRAMA DA SEMEADURA E INCUBAÇÃO DOS MATERIAIS RESPIRATÓRIOS.....	30
FIGURA 2 -	DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES DE ACORDO COM O GÊNERO E IDADE	39
FIGURA 3 -	DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES DE ACORDO COM A REGIÃO DEMOGRÁFICA.....	40
FIGURA 4 -	MORFOLOGIA MICROSCÓPICA DE ISOLADOS NORMAIS (A) E DOS SCVs (B) CARACTERIZADA ATRAVÉS DA COLORAÇÃO DE GRAM.....	42
FIGURA 5 -	COLÔNIAS DE FENÓTIPOS NORMAL E SCV DE <i>S. aureus</i> EM ÁGAR MANITOL SALGADO.....	43
FIGURA 6 -	COLÔNIAS DE FENÓTIPOS SCVs E NORMAL EM ÁGAR SANGUE.....	43
FIGURA 7 -	TESTES DE DEPENDÊNCIA NUTRICIONAL EM MHA SUPLEMENTADO COM TIMIDINA.....	44
FIGURA 8 -	TESTE DE DEPENDÊNCIA NUTRICIONAL EM MHA E DISCO IMPREGNADOS COM OS SUBSTRATOS TIMIDINA, HEMINA E MENADIONA	44
FIGURA 9 -	PERFIL DE SUSCETIBILIDADE POR DISCO DIFUSÃO EM SCVs.....	46
FIGURA 10 -	RESISTÊNCIA INDUZIDA À CLINDAMICINA ATRAVÉS DA TÉCNICA DE D-TEST.....	47
FIGURA 11 -	COMPARAÇÃO DO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE POR MICRODILUIÇÃO ENTRE O FENÓTIPO NORMAL E SCVs.....	48
FIGURA 12 -	ANTIBIOGRAMA EM MHA PARA FENÓTIPO NORMAL (ESQUERDA) E MHA SUPLEMENTADO COM TIMIDINA PARA O FENÓTIPO SCV (DIREITA).....	49
FIGURA 13 -	ANTIBIOGRAMA DO FENÓTIPO SCV EM MHA SUPLEMENTADO COM TIMIDINA E SANGUE.....	49
FIGURA 14 -	MICRODILUIÇÃO EM CALDO PARA O FENÓTIPO SCV.....	50

LISTA DE QUADROS E TABELAS

QUADRO 1 - INTERPRETAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE SEGUNDO O CLSI PARA OS ANTIMICROBIANOS DE ACORDO COM A TÉCNICA DE DISCO DIFUSÃO.....	34
QUADRO 2 - PONTOS DE CORTE PARA CEPAS CONTROLE PARA O TESTE DE DISCO DIFUSÃO DE ACORDO COM O CLSI.....	35
QUADRO 3 - INTERPRETAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE SEGUNDO O CLSI E DILUIÇÕES TESTADAS PARA CADA ANTIMICROBIANO.....	36
QUADRO 4 - REATIVOS USADOS NO PREPARO DA MISTURA DE PCR PARA 16 REAÇÕES.....	77
QUADRO 5 - OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIALIZADORES USADOS NO ESTUDO.....	79
TABELA 1 - DISTRIBUIÇÃO DO FENÓTIPO NORMAL E SCV DE <i>S. aureus</i> EM RELAÇÃO À IDADE E GÊNERO DOS PACIENTES.....	41
TABELA 2 - MEDIANA DE IDADE DE PACIENTES COM <i>S. aureus</i> NORMAL (n=171) E SCV (n=10).....	41
TABELA 3 - ANÁLISE DO FENÓTIPO SCV E GÊNERO DOS PACIENTES.....	42
TABELA 4 - TESTES FENOTÍPICOS, GENOTÍPICOS E DE DEPENDÊNCIA NUTRICIONAL DOS ISOLADOS DE SCVs.....	45
TABELA 5 - PERFIL FENOTÍPICO E GENOTÍPICO DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS.....	51

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACHB	- Ágar chocolate com bacitracina
ATP	- Adenosina trifosfato
BCSA	- Ágar seletivo para <i>Burkholderia cepacia</i>
BHI	- Brain Heart Infusion (Caldo-infuso de cérebro e coração)
CAMHB	- Caldo Mueller Hinton cátion ajustado
CDC	- <i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CEP-HC	- Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná
CFF	- <i>Cystic Fibrosis Foundation</i> (EUA)
CFT	- <i>Cystic Fibrosis Trust</i> (Reino Unido)
CFTR	- Proteína reguladora de condutância transmembrânica
CIM	- Concentração Inibitória Mínima
CLSI	- <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DD	- Disco-difusão
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
FAD	- Flavina-adenina-dinucleotídeo
FC	- Fibrose cística
Hem	- hemina
HMHA	- Ágar Mueller Hinton suplementado com hemina
HQNO	- 4-hidroxi-2-heptilquinolina-N-óxido
LBA	- Lavado brônquico alveolar
MALDI -TOF	- Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight
MC	- Ágar MacConkey
Men	- menadiona
MHA	- Ágar Mueller Hinton
MMHA	- Ágar Mueller Hinton suplementado com menadiona
MRSA	- <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
MSA	- Mannitol Salt Agar (Ágar manitol salgado)
MSSA	- <i>Staphylococcus aureus</i> sensível à meticilina
NaCl	- Cloreto de sódio
NAD	- Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo
PBP2a	- Penicillin binding protein 2a

PBS	- Tampão salina fosfatada
PCR	- Reação em cadeia da polimerase
PFGE	- Pulsed Field Gel Electrophoresis (Eletroforese em campo pulsado)
RNA	- Ácido ribonucleico
SSH	- Solução salina hipertônica
SCVs	- Small colony variants (Colônias pequenas variantes)
TMHA	- Ágar Mueller Hinton suplementado com timidina
Tim	- timidina
TSB	- Tryptic Soy Broth (Caldo trípico de soja)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	17
2.1	OBJETIVO GERAL	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3	REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1	MICROBIOLOGIA.....	18
3.2	CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS.....	19
3.3	FATORES DE PATOGENICIDADE	21
3.4	RESPOSTA IMUNOLÓGICA.....	22
3.5	EPIDEMIOLOGIA.....	23
3.6	OBTENÇÃO E PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS RESPIRATÓRIAS.....	24
3.7	TESTE DE SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS.....	25
3.8	RESISTÊNCIA DE SCVs AOS ANTIMICROBIANOS.....	26
3.9	TRATAMENTO.....	28
4	MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1	CASUÍSTICA.....	29
4.2	COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	29
4.3	IDENTIFICAÇÃO.....	31
4.3.1	Identificação fenotípica.....	31
4.3.2	Dependência nutricional.....	31
4.4	TESTE DE SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS.....	32
4.4.1	Disco difusão em ágar.....	32
4.4.2	Microdiluição em caldo.....	35

4.5	PESQUISA DO GENE DE IDENTIFICAÇÃO E DOS GENES DE RESISTÊNCIA.....	38
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
5	RESULTADOS	39
5.1	PREVALÊNCIA.....	39
5.2	IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA.....	42
5.3	PERFIL DE SUSCETIBILIDADE E GENES DE RESISTÊNCIA.....	46
6	DISCUSSÃO	52
7	CONCLUSÕES	57
	REFERÊNCIAS	59
	ANEXOS	69

1 INTRODUÇÃO

Fibrose Cística (FC) é uma doença genética autossômica recessiva, de ocorrência mais comum na população caucasiana (SOUZA; COGO; ROSÁRIO, 2016). Ela é causada por mutações no gene *Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator* (CFTR), localizado no braço longo do cromossoma 7 (ROMMENS *et al.*, 1989). A proteína codificada por este gene é responsável entre outros fatores, pela produção de secreção respiratória viscosa, que aumenta a probabilidade de infecções bacterianas (MELTER; RADOJEVIC, 2010).

As colônias variantes pequenas (do inglês *small colony variants* - SCVs) são variações morfológicas encontradas em várias espécies bacterianas (MELTER; RADOJEVIC, 2010) e Swingle, em 1935, descreveu a ocorrência em *S. aureus*. No caso de *S. aureus* apresentam em cultura colônias não pigmentadas e não hemolíticas, com cerca de um décimo do tamanho quando comparadas com o tipo normal. Acreditava-se a princípio que esta característica fazia parte do ciclo de crescimento normal (PROCTOR *et al.*, 2006). Porém, nas últimas duas décadas tem se observado que este fenótipo está associado com infecções persistentes e recorrentes, podendo ocorrer após anos de aparente cura, como em infecções respiratórias de pacientes com FC (KAHL, 2014), osteomielite, endocardite, rinosinose, bronquites crônicas, infecções persistentes da pele, feridas, abscessos recorrentes e em próteses (BESIER *et al.*, 2007; NIELSEN *et al.*, 2009; DEAN *et al.*, 2014).

Infecções crônicas por SCVs de *S. aureus* estão relacionadas à sua capacidade de persistir dentro das células dos hospedeiros, além da capacidade de formar biofilme (MITCHELL *et al.*, 2013), o que faz com que se tornem resistentes às defesas do hospedeiro e à ação dos antimicrobianos (DELGADO-VALVERDE *et al.*, 2014).

SCVs são um grande desafio para os laboratórios de Microbiologia, principalmente porque são mutantes auxotróficos, que necessitam de substratos específicos como menadiona, hemina ou timidina para seu crescimento, necessitando de suplementação dos meios de cultivo (PROCTOR *et al.*, 2006). Esse morfotipo de colônia tem sido relacionado à multirresistência aos antimicrobianos

(KAHL; BECKER; LÖFFLER, 2016; YAGCI *et al.*, 2013) e o uso de antibióticos, como Trimetoprim/Sulfametoxazol e gentamicina está associado ao surgimento de SCVs (KRIEGESKORTE, 2015; GARCIA *et al.*, 2013).

A descoberta e a caracterização de *S. aureus* SCVs forneceram uma nova percepção sobre o entendimento da patogênese das infecções crônicas pulmonares em pacientes com FC (YAGCI *et al.*, 2013).

Devido à dificuldade de isolamento deste micro-organismo, até o momento poucos estudos foram realizados. No Brasil ainda não há relatos na literatura sobre o isolamento em pacientes com FC, o que mostra a relevância desta pesquisa.

O assunto é atual e relata a importância da detecção deste fenótipo de *S. aureus* denominado SCVs, quando isolado de amostras respiratórias de pacientes com FC, que requerem adequação ao tratamento. O estudo trata da caracterização dessas variantes, métodos de detecção e avaliação da sensibilidade a antimicrobianos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as técnicas de diagnóstico para a detecção das colônias pequenas variantes de *S. aureus* (SCVs) em infecções pulmonares de pacientes com Fibrose Cística atendidos no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, assim como determinar o melhor método para detecção da suscetibilidade aos agentes antimicrobianos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a prevalência de SCVs de *S. aureus* em pacientes com Fibrose Cística.
- Identificar, através do uso de substratos nutricionais, o tipo de auxotrofismo presente nos isolados de *S. aureus* com o fenótipo SCV.
- Verificar o perfil de suscetibilidade dos SCVs de *S. aureus*, pelos métodos de disco difusão em Ágar e microdiluição em caldo.
- Detectar através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), os genes envolvidos na resistência a antimicrobianos nos isolados de *S. aureus* normal e com o fenótipo SCV incluídos no estudo.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 MICROBIOLOGIA

A espécie *Staphylococcus aureus* pertencente à família *Micrococcaceae* é uma bactéria imóvel, não formadora de esporo, que na morfologia microscópica se apresenta na forma de células cocóides, isoladas, em pares, tétrades, cadeias curtas ou agrupadas de maneira semelhante a cachos de uva (JORGENSEN *et al.*, 2015; NORVILLE, 2011). Porém, na coloração de Gram as SCVs podem ser observadas como cocos pleomórficos, e na microscopia eletrônica observa-se o alargamento dos cocos com paredes incompletas ou transversais múltiplas, indicando que a separação celular foi prejudicada (PROCTOR *et al.*, 2006).

As SCVs têm características fenotípicas próprias que as diferenciam de suas linhagens normais, e que dificultam sua identificação (DELGADO-VALVERDE *et al.*, 2014). Como o nome indica, a característica mais marcante é a formação de colônias com cerca de um décimo do tamanho das colônias normais. A diminuição no tamanho das colônias está relacionada com o crescimento lento destas estirpes, muitas vezes devido à característica auxotrófica dependente de fatores de crescimento como menadiona, hemina ou timidina (PROCTOR *et al.*, 2006; GARCIA *et al.*, 2013). Estas colônias apresentam uma diminuição na pigmentação e redução ou ausência de hemólise em ágar sangue (KAHL, 2014; GARCIA *et al.*, 2013). O crescimento destas colônias fastidiosas ocorre após 24-72 horas de incubação em ágar sangue (MELTER; RADOJEVIC, 2010). Devido ao crescimento excessivo de microbiota comensal ou de *S. aureus* de tipo normal, sugere-se a diluição do material clínico antes da inoculação em meio de cultura, assim como a utilização de meios diferenciais tais como ágar manitol salgado (MSA) com 7,5% de NaCl para detectá-los (MELTER; RADOJEVIC, 2010).

Para a correta identificação deve-se utilizar métodos que permitam a detecção destas variantes, como os ensaios de dependência nutricional, e as provas da catalase e da coagulase para a confirmação da espécie (YAGCI *et al.*, 2013).

As SCVs podem também sofrer alterações bioquímicas, como o possível enfraquecimento das reações da catalase e da coagulase, assim como a não utilização do manitol (DELGADO-VALVERDE *et al.*, 2014; CHAVES, 2014). Os isolados suspeitos de serem *S. aureus* SCVs com o teste de coagulase falso-negativo, devem ter sua identificação confirmada por PCR para a detecção dos genes espécie-específicos *nuc* e *coa*, ou por sequenciamento do 16S rDNA. Sistemas comerciais de detecção de coagulase combinado com a detecção de proteína A (Pastorex Staph, Biorad) pode dar resultado negativo em uma pequena porção de linhagens analisadas. Os sistemas automatizados nem sempre identificam e distinguem este fenótipo (MELTER; RADOJEVIC, 2010).

Dependendo do substrato, um mecanismo para a emergência de alguns SCVs tem sido proposto. O conhecimento do auxotrofismo pela dependência de SCVs a menadiona hemina e timidina auxilia no entedimento do mecanismo subjacente causador do aparecimento de SCVs, que pode ser determinado através do sequenciamento dos respectivos genes ou *operons*. No entanto existem muitos SCVs, nos quais ainda não foi detectado um auxotrofismo apropriado (KAHL, 2014). Novas tecnologias como o sequenciamento do genoma (TAKEUCHI *et al.*, 2005) e sequenciamento de RNA (BEAUME *et al.*, 2011) são ferramentas promissoras para elucidar os mecanismos subjacentes até agora indeterminados quando comparados com cepas do tipo selvagem isogênica (KAHL, 2014).

3.2 CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS

As características fisiológicas de SCVs quando determinadas pelo auxotrofismo, são devidas a mutações genéticas que os tornam deficientes de substratos (KAHL, 2014; TUCHSCHERR *et al.*, 2011).

Os dois grupos com maior frequência encontrados de defeitos metabólicos em isolados clínicos SCVs, são os auxotróficos para menadiona ou hemina, substratos requeridos para a biossíntese de componentes da cadeia de transporte de elétrons, e os auxotróficos deficientes na biossíntese da timidina (PROCTOR *et*

al., 2006), essencial para a síntese do DNA, causando alterações na virulência e resistência de *S. aureus* (KRIEGESKORTE *et al.*, 2014).

Várias mutações genéticas podem produzir defeitos na cadeia de transporte de elétrons. As mutações no gene *menD* bloqueiam a biossíntese da menadiona, e no gene *hemB* a biossíntese da hemina (ferro), tornando as bactérias incapazes de sintetizar menaquinona e citocromos, respectivamente (PROCTOR *et al.*, 2006; GARCIA *et al.*, 2013). A menaquinona é um aceptor de elétrons de nicotinamida-adenina-dinucleotídeo (NADH)/flavina-adenina-dinucleotídeo (FADH₂) na cadeia de transporte de elétrons. Interrupção no transporte de elétrons afeta a fosforilação oxidativa e a geração de adenosina trifosfato (ATP). Grandes quantidades de ATP são necessárias para a biossíntese da parede celular, portanto o crescimento lento leva ao desenvolvimento de pequenas colônias. O transporte de elétrons também está diretamente ligado à biossíntese de pigmentos carotenóides, tornando as colônias não pigmentadas. A redução da expressão da hemólise e, a reação lenta para coagulase estão em parte relacionadas com a diminuição da biossíntese de aminoácidos (MELTER; RADOJEVIC, 2010; PROCTOR *et al.*, 2006; ATALLA; GYLES; BONNIE, 2011).

S. aureus SCVs dependentes de timidina estão relacionadas com infecção crônica das vias aéreas em pacientes com FC (YAGCI *et al.*, 2013). Acredita-se que timidina é abundante em secreções das vias respiratórias destes pacientes, devido à presença de necrose de células que liberam o DNA, que por sua vez são digeridos pela enzima DNase de *S. aureus* (PROCTOR *et al.*, 2006). SCVs dependente de timidina só podem sobreviver na presença de timidina externa (KAHL, 2014). SCVs auxotróficas para timidina carregam mutações no gene da timidilato-sintase (*thyA*). Esta enzima, responsável pela conversão de timidina a partir da uracila (dUMP), requer ácido tetrahidrofólico como cofator para catalisar a última etapa da biossíntese da via da timidina (dTMP) (MELTER; RADOJEVIC, 2010).

3.3 FATORES DE PATOGENICIDADE

A interação entre hospedeiro e micro-organismo, é influenciada por fatores de virulência produzidos pelo micro-organismo. *S. aureus* possui vários fatores de virulência, que promovem a colonização e infecção (ATALLA; GYLES; BONNIE, 2011). A diferença entre colonização e infecção é regulada pela expressão de fatores de virulência e a qualidade e intensidade da resposta imunológica provocada no hospedeiro. Um exemplo, para esta adaptação ao hospedeiro é a formação de pequenas colônias variantes (SCVs) (HILMI *et al.*, 2013).

Assim como ocorre com as cepas do tipo selvagem, a adesão e internalização de SCVs pelas células hospedeiras parecem ser mediadas pela interação de fibrinogênio com proteínas de ligação à fibronectina (Fn-FnBP). Em SCVs, as adesinas de superfície tal como FnBP e as proteínas de ligação de fibrinogênio são expressas sob a influência de um aumento da atividade do fator de transcrição sigma B (*sigB*) e a baixa regulação do locus *agr* em relação às linhagens selvagens; a expressão aumentada promove adesão e internalização eficientes nas células dos hospedeiros (MITCHELL, 2013; ATALLA; GYLES; BONNIE, 2011).

Admite-se que a persistência de SCVs é devida à diminuição da produção de α -toxina (MELTER; RADOJEVIC, 2010). A redução da produção seletiva resulta em duas populações de organismos: uma subpopulação agressiva (produtora de α -toxina), que provoca destruição aguda de tecidos do hospedeiro e uma subpopulação de latência que pode persistir no ambiente de proteção das células hospedeiras e causar doença recorrente quando a cadeia de transporte de elétrons é reconstituída (SINHA; FRAUNHOLZ, 2010).

A maioria dos estudos sobre SCVs foca em sua persistência intracelular, porém o papel dos biofilmes em infecções crônicas não deve ser esquecido, principalmente no contexto de infecções pulmonares em pacientes com FC. Os mecanismos envolvidos na formação de biofilme por SCVs não estão bem compreendidos, apesar de alguns resultados sugerirem que a adesina, um polissacarídeo intercelular faz parte da composição da matriz do biofilme (MITCHELL *et al.*, 2013).

Fugère *et al.* (2014) sugerem que o fator *sigB* pode desempenhar importante papel na capacidade do *S. aureus* adaptar-se à presença de *P. aeruginosa*. Foi mostrado que em *S. aureus*, *sigB* promove a colonização, o surgimento de SCVs e a formação de biofilme em resposta ao tratamento com antibióticos, à presença da molécula 4-hidroxi-2-heptilquinolina-N-óxido (HQNO) e à produção de piocianina por *P. aeruginosa* (BISWAS *et al.*, 2009; HOFFMAN *et al.*, 2006). HQNO reduz a produção da toxina *hla* aumentando a expressão de *SigB*, levando a uma expressão aumentada de *sarA* e uma diminuição da expressão de *agr*. Redução da expressão das toxinas ajuda *S. aureus* a permanecer no meio intracelular e assim aumenta as suas chances de sobrevivência no hospedeiro (HOTTERBEEKX *et al.*, 2017). As estirpes de SCVs auxotróficas de menadiona são capazes de crescer em altas concentrações de piocianina. A resistência a este pigmento está relacionada com a inativação combinada pela mutação no gene *qsrR* e do *menD* (NOTO *et al.*, 2017). Os estudos de Fugère *et al.* (2014), Biswas *et al.* (2009) e Hoffman *et al.* (2006) corroboram a perspectiva emergente de uma co-adaptação e de cooperação entre as duas espécies bacterianas.

3.4 RESPOSTA IMUNOLÓGICA

O desenvolvimento do fenótipo SCV fornece uma estratégia de sobrevivência para *S. aureus*, que se mantém dentro das células hospedeiras, sem provocar forte resposta do hospedeiro, atuando como reservatório para a infecção persistente (KAHL, 2014).

Tuchscher *et al.* (2011) demonstraram que SCVs induzem resposta menos intensa do hospedeiro, em relação ao tipo selvagem de *S. aureus* após a infecção e invasão de células eucarióticas *in vitro*. SCVs intracelulares provocam resposta significativamente atenuada do hospedeiro, com diminuição da liberação de quimiocinas tais como CCL5 (RANTES), CXCL10 (IP-10), CXCL11 (ITAC), e diminuição da adesão da molécula ICAM-1 após infecção de células endoteliais, em comparação com o tipo selvagem. Outro mecanismo de defesa contra o sistema

imunológico é a não indução de trombina pelas plaquetas, uma proteína com atividade microbicida (KAHL, 2014).

O fator-1 hipóxia induzível (HIF- 1) tem sido descrito recentemente sendo ativado em resposta à infecção bacteriana, onde é essencial para a ação bactericida dos fagócitos. Mas foi mostrado que SCVs não consomem oxigênio e nem ativam HIF-1, ao contrário das estirpes de tipo selvagem (WERTH *et al.*, 2010). Assim, existem várias vantagens para *S. aureus* no estado SCV em relação à resposta imunológica do hospedeiro, representando importante estratégia de evasão, pela reduzida indução de quimiocinas e falta da ativação de HIF-1 (KAHL, 2014).

3.5 EPIDEMIOLOGIA

Em humanos, aproximadamente 20-30% da população são portadores de *S. aureus* (NORVILLE, 2011), uma bactéria versátil, que pode causar graves infecções, mas também é capaz de colonizar a mucosa respiratória na ausência de manifestação de doença (HILMI *et al.*, 2013).

A bactéria *S. aureus*, geralmente se estabelece precocemente nos pacientes com FC (BESIER *et al.*, 2007). Em um estudo conduzido por Abman *et al.* (1991) com 42 crianças diagnosticadas com a doença, a idade média dos pacientes colonizados com *S. aureus* foi de 12,4 meses. Souza *et al.* (2006) isolaram *S. aureus* em amostras respiratórias de 25 crianças (76%) com idade média de 14,3 meses para meninos e de 15,5 meses para meninas. Dados americanos obtidos pela *Cystic Fibrosis Foundation* (CFF) assim como pelo Grupo Brasileiro de Estudos de Fibrose Cística (GBFEC) mostram *S. aureus* em percentuais acima de 70% das secreções obtidas de crianças entre 6 a 10 anos de idade. Nos pacientes adultos, os índices ficam em torno de 35% (CFF, 2009; GBFEC, 2014).

Os resultados de um estudo prospectivo de 6 anos de duração, em doentes com FC demonstraram que as vias aéreas de 72% dos pacientes estavam infectadas com o tipo normal de *S. aureus* e SCVs, com uma persistência mediana de 37 meses (variando de 6 a 70 meses) (KAHL *et al.*, 2006). Observou-se também

que em alguns pacientes o fenótipo SCVs prevaleceu em relação ao fenótipo de estirpe normal que desapareceu, indicando assim uma vantagem de adaptação deste fenótipo ao meio hostil das vias aéreas (PROCTOR *et al.*, 2006).

Estudos realizados na Europa indicam que a prevalência de colonização/infecção por SCVs em pacientes com FC oscila entre 8 e 33% (KAHL *et al.*, 1998; YAGCI *et al.*, 2013). Mais recentemente, Morelli *et al.* (2015), na Itália, isolaram o fenótipo SCV em 13 pacientes com FC dos 42 que estavam colonizados cronicamente com *S. aureus*, com idades variando entre 5 e 53 anos. Wolter *et al.* (2013) ao avaliar crianças e adolescentes de até 16 anos com FC, observaram uma prevalência de 24% de SCVs de *S. aureus*, incluindo MRSA.

3.6 OBTENÇÃO E PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS RESPIRATÓRIAS

O material considerado padrão ouro para o isolamento de microorganismos do trato respiratório inferior é o lavado brônquico alveolar (LBA), porém o escarro expectorado é de mais fácil obtenção. Em pacientes, incapazes de expectorar o “swab de tosse” embora menos indicado que o escarro pode ser utilizado (CYSTIC FIBROSIS TRUST, 2010; ZAMPOLI *et al.*, 2016).

De forma simplificada, para a coleta de LBA um broncoscópio é introduzido através das cordas vocais, após anestesia local da faringe posterior com lidocaína e sedação intravenosa. Em seguida o lobo pulmonar onde se encontra a inflamação é lavado com soro fisiológico estéril, e o material é aspirado para um recipiente estéril e enviado para cultura (SEIDLER *et al.*, 2016).

A coleta do escarro pode ser realizada de modo espontâneo, preferencialmente pela manhã, para obter a secreção acumulada durante a noite. Deve-se orientar o paciente para enxaguar a boca com água, evitar o uso de enxaguatório bucal ou creme dental, e em seguida tossir diretamente em recipiente estéril de boca larga. Fechar o recipiente com a tampa (*Centers for Disease Control and Prevention – CDC*).

A técnica de coleta com swab consiste em colocar o swab estéril na garganta do paciente e solicitar que ele tussa, e coletar a secreção expectorada sem tocar a faringe posterior (SOUZA, 2012).

Culturas de orofaringe quando comparadas com cultura de lavado brônquico apresentaram alta especificidade (92%) e valor preditivo positivo (91%) para *S. aureus* (RAMSEY *et al.*, 1991). Fisioterapia antes da coleta de swab de orofaringe aumenta a probabilidade do isolamento de *S. aureus* (KABRA *et al.*, 2004). O uso de salina hipertônica de 3 a 7% auxilia na expectoração, tanto para coleta de escarro quanto para coleta com swab (HO *et al.*, 2004; SUBBARAO *et al.*, 2007; DELLON *et al.*, 2008). O swab deve ser transportado em tubos de ensaio estéreis contendo tampão salina fosfatado (PBS) com gelatina bacteriológica a 0,1% (RAMSEY *et al.*, 1991).

O ideal é processar a amostra respiratória logo após a coleta para a melhor recuperação das bactérias (CYSTIC FIBROSIS TRUST, 2010). A amostra pode ser mantida à temperatura de 4°C por até 24 horas, se necessário (GILLIGAN, 2010).

Para o cultivo de amostras respiratórias de pacientes com FC recomenda-se o uso dos seguintes meios de cultura: ágar MacConkey (MC), para o isolamento de bactérias gram negativas; ágar seletivo para isolamento de bactérias do complexo *Burkholderia cepacia* (BCSA); ágar manitol salgado (MSA) para isolamento de *S. aureus* e ágar sangue de cavalo ou ágar chocolate suplementado com bacitracina (ACHB) para isolamento de *Haemophilus influenzae* (GILLIGAN; KISKA; APPLEMAN, 2006). As placas de MC, MSA e BCSA devem ser incubadas a 35-37°C, em ar ambiente, e o ACHB ou ágar sangue de cavalo em 5% de CO₂ por até 48 horas; as placas de BCSA devem ser incubadas por até 5 dias e examinadas diariamente (CYSTIC FIBROSIS TRUST, 2010; SOUZA, 2012).

3.7 TESTE DE SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS

A realização de testes de suscetibilidade *in vitro* dos SCVs é de difícil execução porque foge dos procedimentos de rotina, é necessário o uso de

estratégias que busquem favorecer o crescimento. A suplementação de vitamina K (menadiona) para restaurar o crescimento, antes de realizar o teste de suscetibilidade aos antibióticos tem atraído o interesse em infecções por mutantes dependentes de menadiona (GARCIA *et al.*, 2013). Para a detecção do perfil de suscetibilidade de SCVs dependentes de timidina e hemina é necessário utilizar meios ricos como ágar sangue Columbia (BESIER *et al.*, 2007), no caso da dependência da timidina pode ser utilizado Ágar Mueller Hinton suplementado com 10 a 200 µg/ml de timidina (HORIUCHI *et al.*, 2015; DELGADO-VALVERDE *et al.*, 2014). Precit *et al.* (2016) utilizaram MHA suplementados com 1 µg/ml de menadiona, 1 µg/ml de hemina e 5 µg/ml de timidina.

Métodos de disco difusão e microdiluição podem apresentar resultados com falsa sensibilidade à meticilina. Alternativas que podem ser utilizadas para a detecção da resistência à meticilina, são a detecção do gene *mecA* por PCR ou pesquisa da aglutinação PBP2a por látex, utilizando um elevado inóculo bacteriano nos isolados SCVs de MRSA (MELTER; RADOJEVIC, 2010; CHAVES, 2014).

3.8 RESISTÊNCIA DE SCVs AOS ANTIMICROBIANOS

Assim como o fenótipo normal, SCV também pode adquirir e expressar todos os mecanismos clássicos de resistência aos agentes antimicrobianos observados em bactérias gram positivas (GARCIA *et al.*, 2013), sendo mais resistentes a algumas classes de antibióticos que a linhagem selvagem (MELTER; RADOJEVIC, 2010).

As cepas de *S. aureus* SCVs com mutações ou deleções no gene *menB*, envolvido na biossíntese da menadiona, mostram uma reduzida sensibilidade à gentamicina. Bactérias SCVs resistentes à gentamicina, na ausência de pressão antibiótica, mudam o seu fenótipo para o tipo normal, servindo como um reservatório constante capaz de persistir em tecidos dos hospedeiros (EDWARDS, 2012). O tratamento com gentamicina tem sido relacionado com a seleção de SCVs, que

podem também mostrar resistência associada ao ácido fusídico (KAHL, 2014; GARCIA *et al.*, 2013).

O aminoglicosídeo tobramicina geralmente é usado no tratamento de infecções por *P. aeruginosa* em pacientes com FC, e testes *in vitro* indicam que *S. aureus* e *P. aeruginosa* isolados destes pacientes são geralmente tobramicina suscetíveis. Hoffman *et al.* (2006) observaram os efeitos em curto prazo de HQNO produzido por *P. aeruginosa* sobre *S. aureus*. Na presença de níveis de tobramicina acima da concentração inibitória mínima (CIM de 0,4 g/mL) *S. aureus* cresceu ao redor de colônias de *P. aeruginosa*. Portanto, o uso da tobramicina para o tratamento de infecções das vias aéreas causadas por *P. aeruginosa*, em pacientes com FC, pode explicar o aumento da prevalência de SCVs, em pacientes com mais idade e em piores condições clínicas (KAHL, 2014).

O uso de trimetoprim-sulfametazol está relacionado com o surgimento de SCVs dependentes de timidina (KRIEGESKORTE *et al.*, 2015). Wolter *et al.* (2013) levantaram a possibilidade de que o tratamento com este antibiótico era em si um fator de risco para a piora da função pulmonar. Além disso, variantes morfológicas timidina-dependentes são hipermutáveis, favorecendo a aquisição de resistência e de persistência (CHAVES, 2014).

A resistência a antibióticos ativos na parede celular, como os β -lactâmicos, ocorre devido à redução da taxa de crescimento e metabolismo da parede celular de SCVs (NORVILLE, 2011; TUBBY *et al.*, 2013).

Em relação às quinolonas, trabalhos mostraram que o fenótipo SCV é mais resistente à ciprofloxacino do que no fenótipo normal de *S. aureus* isolados de amostras clínicas (YAGCI *et al.*, 2013).

A azitromicina vem sendo utilizada de forma contínua em pacientes com FC por apresentar ação anti-inflamatória (BLACK *et al.*, 1997) e também tem sido associada com resistência a macrolídeos (PHAFF *et al.*, 2006). A resistência a macrolídeos, clindamicina e estreptogramina B, constitutiva ou induzida (MLS_b), está associada com modificações no alvo de ligação no ribossomo, codificados pelo gene *erm* (*erythromycin ribosomal methylase*), os genes *ermA*, *ermB* ou *ermC*, são os mais frequentemente encontrados (COUTINHO *et al.*, 2010). A resistência também pode ser mediada por bombas de efluxo, codificadas pelos genes *msrA* e *msrB* (proteína *msr* - *methionine sulfoxide reductase*), conferindo resistência aos macrolídeos e estreptogramina B (SINGH *et al.*, 2015).

3.9 TRATAMENTO

O tratamento de infecções causadas por SCVs é um desafio, e continua sendo um campo mal explorado com relação às opções terapêuticas mais adequadas para impedir o seu surgimento bem como a sua erradicação (GARCIA *et al.*, 2013). Por se tratar de infecções persistentes, a resistência aos antimicrobianos tem aumentado (TUBBY *et al.*, 2013), assim como a possibilidade de recorrência das infecções. A recidiva da infecção pode ocorrer com intensidade semelhante à infecção inicial, muitas vezes não respondendo mais ao tratamento com os mesmos antibióticos (ALRESHIDI *et al.*, 2013).

Uma vez que SCVs persistem intracelularmente, recomenda-se o uso de rifampicina por apresentar atividade anti-estafilocócica intracelular. Como o uso deste antibiótico em monoterapia gera resistência rapidamente, é recomendável sua associação com beta-lactâmico para o tratamento de SCVs sensíveis à meticilina ou com vancomicina para os resistentes à meticilina (CHAVES, 2014).

Lenhard *et al.* (2015) observaram que o uso isolado de vancomicina para o tratamento de MRSA, pode estar relacionado com a seleção do fenótipo SCV, sugerindo, assim, que se faça seu uso associado a outro antibiótico.

A daptomicina também tem demonstrado *in vitro* maior atividade do que a vancomicina contra SCVs, e combinações de daptomicina e beta-lactâmicos podem ser uma nova opção de tratamento. Estudos com macrófagos revelaram também que oritavancin, moxifloxacina e quinupristina/dalfopristina são ativos contra SCVs intracelulares (LENHARD *et al.*, 2015).

Casos de infecções associadas com colonização anterior das narinas por SCVs de *S. aureus* foram relatados na literatura. Além da terapia tradicional, a terapia fotodinâmica tem sido proposta para a descontaminação das narinas de portadores de MRSA (TUBBY *et al.*, 2013).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CASUÍSTICA

No período de janeiro de 2014 a setembro de 2016, um total de 246 pacientes provenientes dos estados do Paraná e Santa Catarina foram atendidos nos ambulatórios adulto e pediátrico de Fibrose Cística do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná.

Entre todos os pacientes atendidos nos ambulatórios, houve o desenvolvimento do micro-organismo *S. aureus* nas amostras respiratórias de 182 pacientes. Para cada paciente foi incluído apenas um isolado bacteriano obtido no período do estudo.

Este estudo foi caracterizado como observacional de corte transversal e o projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas em Seres Humanos (CEP) do HC-UFPR sob o registro nº CAAE 45.063115.90000.0096 (ANEXO 1), seguindo as normas da Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde.

4.2 COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

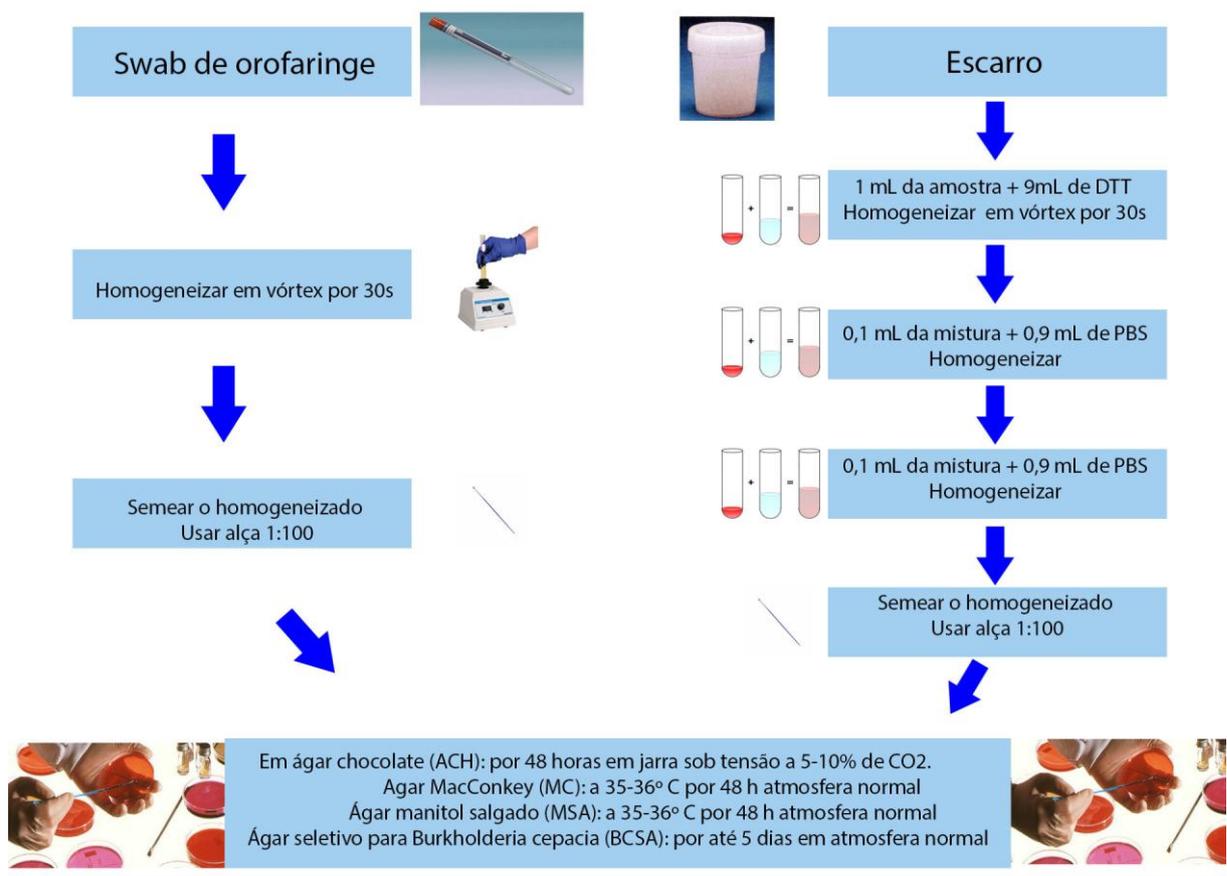
Para a coleta de escarro, quando não foi possível a obtenção espontânea da amostra, esta foi obtida de forma induzida, após nebulização com solução salina hipertônica a 6% (SSH) (SOUZA, 2012). As amostras de escarro foram transportadas ao laboratório em frascos estéreis de boca larga. Nos casos dos pacientes que não conseguiram expectorar, foi utilizada a técnica para a coleta de swab de “tosse”. O swab com o material biológico coletado da orofaringe, foi

transportado em tubos com 1 ml de tampão salina fosfatada (PBS) contendo 0,1% de gelatina bacteriológica, em caixa isotérmica (SOUZA, 2012).

Todas as amostras de escarro e de swab de orofaringe foram encaminhadas para o laboratório logo após a coleta, e processadas para a semeadura assim que chegaram ao laboratório.

Para a semeadura e incubação dos materiais respiratórios, foi utilizado o fluxograma a seguir.

FIGURA 1 - FLUXOGRAMA DA SEMEADURA E INCUBAÇÃO DOS MATERIAIS RESPIRATÓRIOS



ELABORADO POR: Dilair Camargo de Souza e Keite da Silva Nogueira (2017)

4.3 IDENTIFICAÇÃO

4.3.1 Identificação fenotípica

A Identificação fenotípica foi realizada a partir do isolamento das colônias em MSA, observando a morfologia, cor e tamanho. As colônias puntiformes foram subcultivadas em ágar sangue. De todas as colônias com características de Estafilococo (grandes ou puntiformes) foi realizada a coloração de Gram para observação da morfologia microscópica, e as provas de crescimento em ágar com 7,5% de NaCl, catalase e coagulase, as quais quando positivas caracterizaram *S. aureus*.

Para confirmação da identificação de SCVs foi utilizado o sistema automatizado Vitek[®]2 Compact (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), e espectrometria de massa (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight - MALDI-TOF) com Vitek[®] MS (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) (MASOUD - LANDGRAF *et al.*, 2016).

Os isolados identificados como *S. aureus*, com morfologia normal e/ou de SCVs, de uma mesma amostra foram armazenados em criotubo contendo caldo tríptico de soja (TSB) com adição de 15% de glicerol, mantidas em freezer à temperatura de -80°C, e posteriormente subcultivados em ágar sangue para demais análises fenotípicas e genotípicas.

4.3.2 Dependência nutricional

Para determinar a dependência nutricional das colônias SCVs de *S. aureus*, foram utilizados dois métodos. Após suspender o isolado bacteriano na escala tubo 0,5 de McFarland:

- as colônias foram subcultivadas em ágar Mueller Hinton (MHA) suplementado com hemina (20 µg/ml), menadiona (20 µg/ml) ou timidina (200µg/ml) (Sigma Aldrich®).

- discos impregnados com 15µL destes substratos foram depositados sobre a superfície do MHA semeado.

Os meios foram incubados em atmosfera aeróbia a 35-37°C durante 24 horas, sendo reincubadas até 72 horas no caso de ausência de crescimento (DELGADO-VALVERDE *et al.*, 2014).

O isolado foi considerado dependente nutricionalmente quando cresceu no meio contendo o substrato ou ao redor do disco impregnado com o substrato.

4.4 TESTE DE SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS

O perfil de suscetibilidade das SCVs foi determinado através do método de disco difusão em ágar, utilizando ágar Mueller Hinton suplementado com timidina (MHAT) (200µg/mL) (DELGADO-VALVERDE *et al.*, 2014; PRECIT *et al.*, 2016) e MHA suplementado com timidina e 5% de sangue de carneiro (MHATS) (BESIER *et al.*, 2008). A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada, pelo método de microdiluição em caldo Mueller Hinton cátion-ajustado (CAMHB) para o isolado de *S. aureus* normal, seguindo a padronização do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2016) e em caldo Brain Heart Infusion (BHI) suplementado com timidina para o fenótipo SCV (200µg/mL) (YAGCI, *et al.*, 2013; PRECIT *et al.*, 2016).

4.4.1 Disco difusão em ágar

Uma suspensão bacteriana com turvação equivalente à do tubo 0,5 da escala de McFarland foi preparada para cada isolado bacteriano a ser testado, e em seguida a mesma foi inoculada na superfície do ágar. Os discos impregnados com os antimicrobianos ciprofloxacino (5 µg), clindamicina (2 µg) eritromicina (15 µg), cefoxitina (30 µg), rifampicina (5 µg), linezolida (30 µg), gentamicina (10 µg) e trimetoprim/sulfametoxazol (1,25/23,75 µg) foram depositados na superfície do meio com auxílio de uma pinça estéril.

Os discos de clindamicina e eritromicina foram depositados a uma distância de 25 mm entre si, para avaliação da resistência induzida. O aparecimento de um achatamento da zona de inibição da clindamicina adjacente ao disco de eritromicina (referido como zona - D) foi considerado como resistência à clindamicina induzida.

As placas foram incubadas a 35°C durante 24 horas para a oxacilina e 16 a 18 horas para demais antimicrobianos. Para isolados com pouco desenvolvimento o período de incubação foi aumentado para 48 horas. Os halos de inibição foram medidos e interpretados segundo o documento do CLSI (2016).

O teste não foi realizado para vancomicina por não terem sido estabelecidos pontos de corte para este antimicrobiano através da técnica de disco difusão.

No Quadro 1 se encontram os pontos de corte utilizados para a interpretação dos resultados do teste de Disco Difusão.

QUADRO 1 - INTERPRETAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE SEGUNDO O CLSI PARA OS
ANTIMICROBIANOS DE ACORDO COM A TÉCNICA DE DISCO DIFUSÃO

Antimicrobiano	Interpretação dos pontos de corte (mm)		
	S	I	R
Ciprofloxacino	≥ 21	16 - 20	≤ 15
Clindamicina	≥ 21	15 - 20	≤ 14
Eritromicina	≥ 23	14 - 22	≤ 13
Gentamicina	≥ 15	13 - 14	≤ 12
Linezolida	≥ 21	-	≤ 20
Trimetoprim/Sulfametaxazol	≥ 16	11 - 15	≤ 10
Vancomicina	-	-	-
Oxacilina (disco de cefoxitina)	≥ 22	-	≤ 21
Rifampicina	≥ 22	-	≤ 21

Fonte: CLSI (2016)

LEGENDA: Sensível (S), Intermediário (I), Resistente (R)

O controle de qualidade dos discos de antimicrobianos e do meio de cultura foi realizado para cada lote através da cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Quadro 2).

QUADRO 2 – PONTOS DE CORTE PARA CEPAS CONTROLE PARA O TESTE DE DISCO
DIFUSÃO DE ACORDO COM O CLSI

Antimicrobianos	Pontos de corte (mm)
	<i>S. aureus</i> ATCC 25923
Ciprofloxacina	22 – 30
Clindamicina	24 – 30
Eritromicina	22 – 30
Gentamicina	19 – 27
Linezolida	25 – 32
Trimetoprim/Sulfametaxazol	24 – 32
Vancomicina	17 – 21
Oxacilina (disco de cefoxitina)	23 – 29
Rifampicina	26 – 34

Fonte: CLSI (2016)

4.4.2 Microdiluição em caldo

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada para os antimicrobianos ciprofloxacino, oxacilina, eritromicina, clindamicina, trimetoprim/sulfametoxazol e vancomicina. Os antimicrobianos linezolida, gentamicina e rifampicina não foram avaliados por não haver no momento, disponibilidade dos sais.

A técnica consistiu em utilizar um pequeno volume de caldo (0,1 mL) de CAMHB para o isolado de *S. aureus* normal, e em caldo BHI suplementado com timidina para o fenótipo SCV, dispensado em placa de Elisa estéril, contendo 96 poços de fundo redondo.

As placas foram preparadas com o número de diluições sucessivas necessárias para cada antimicrobiano, sendo a maior diluição três concentrações acima do ponto de corte para resistência e a última diluição contendo os pontos de corte das cepas padrão (Quadro 3). Os pontos de corte para as cepas *S. aureus* ATCC 29213 utilizada no controle do teste de microdiluição estão inseridas no Quadro 3.

QUADRO 3 - INTERPRETAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE SEGUNDO O CLSI E DILUIÇÕES TESTADAS PARA CADA ANTIMICROBIANO

Antimicrobianos	Pontos de corte ($\mu\text{g/mL}$)			Pontos de corte ($\mu\text{g/mL}$)	Diluições testadas ($\mu\text{g/mL}$)
	S	I	R	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	
Ciprofloxacino	≤ 1	2	≥ 4	0.12 - 0.5	0,03 - 16
Clindamicina	≤ 0.5	1 - 2	≥ 4	0.06 - 0.25	0,03 - 16
Eritromicina	≤ 0.5	1 - 4	≥ 8	0.25 - 1	0,06 - 32
Trimetoprim/Sulfametaxazol	$\leq 2/38$	-	$\geq 4/76$	$\leq 0.5/9.5$	0,03 - 0,6/16 - 304
Vancomicina	≤ 2	4 - 8	≥ 16	0.5 - 2.0	0,12 - 64
Oxacilina	≤ 2	-	≥ 4	0.12 - 0.5	0,03 - 16

Fonte: CLSI (2016)

LEGENDA: Sensível (S), Intermediário (I), Resistente (R)

A quantidade em mg do antimicrobiano necessária para preparar as soluções foi calculada usando a seguinte fórmula:

$$\text{Peso (mg)} = \frac{\text{Vol. do Solvente (mL)} \times \text{Conc. da Solução Estoque } (\mu\text{g/mL})}{\text{Potência do antimicrobiano } (\mu\text{g/mL})}$$

A solução-estoque foi realizada vinte vezes mais concentrada que a primeira diluição a ser utilizada e, a partir desta, foram feitas diluições sucessivas até atingir a menor concentração. As informações fornecidas pelo fabricante da droga foram consideradas na determinação da solubilidade dos antimicrobianos. No preparo da solução-estoque de oxacilina foi acrescentada uma solução de NaCl 2%. Em seguida as mesmas foram esterilizadas por filtração utilizando membrana com poros de 0,22 μm de diâmetro e armazenadas em frascos estéreis a -80°C até o momento do uso.

Para o preparo do inóculo, uma suspensão de concentração referente ao tubo 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) foi acertada com o auxílio de turbidímetro. Em seguida a suspensão bacteriana foi diluída 1:10 em solução salina estéril, com concentração final de $1,5 \times 10^7$ UFC/mL e, com auxílio de pipeta multicanal, uma alíquota de 5 μL da suspensão foi inoculada em todas as cavidades da placa que continham as diluições seriadas do antimicrobiano, obtendo-se cerca de 10^4 UFC por poço.

Em cada placa de microdiluição em caldo foi incluído um controle de crescimento em meio basal, sem agente antimicrobiano, a fim de avaliar a viabilidade dos isolados testados e um controle do meio, sem adição de microorganismos.

As placas foram tampadas e colocadas em saco plástico para evitar possível evaporação antes de serem incubadas na estufa a 35°C durante 24 horas para a oxacilina e vancomicina e 16 a 10 horas para demais antimicrobianos. Para isolados com pouco desenvolvimento o período de incubação foi aumentado para 48 horas.

Após a incubação foi realizada a leitura das placas e interpretação dos resultados. A quantidade de crescimento nos poços contendo o antimicrobiano foi

comparada com a quantidade de crescimento nos poços controle de crescimento (sem antimicrobiano) em cada teste, para determinar os pontos finais de crescimento. Foi considerada como CIM a menor concentração do antimicrobiano capaz de inibir completamente o crescimento bacteriano.

4.5 PESQUISA DO GENE DE IDENTIFICAÇÃO E DOS GENES DE RESISTÊNCIA

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi realizada em todos os isolados SCVs para pesquisa dos genes *ermA*, *ermB*, *ermC*, *msrA* e *msrB*, para determinação da resistência aos antimicrobianos eritromicina e clindamicina; do gene *mecA* para resistência aos β -lactâmicos; e do gene *nuc* para confirmação da identificação do gênero *Staphylococcus*. As técnicas e os inicializadores utilizados na reação estão contidos no Anexo 2.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

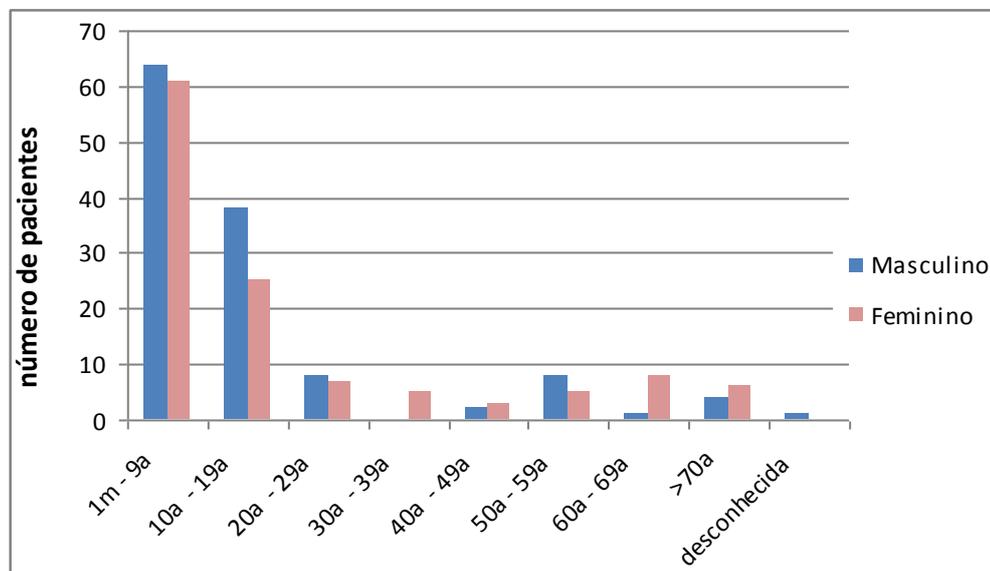
Para análise dos dados foram utilizadas porcentagens e para determinação das demais variáveis foi utilizado o programa de computador SPSS versão 22.0.

5 RESULTADOS

5.1 PREVALÊNCIA

Dentre os 246 pacientes incluídos na pesquisa, 120 (48,8%) eram do gênero masculino, com idades variando entre 1 mês e 83 anos e mediana de 9 anos (Figura 2)

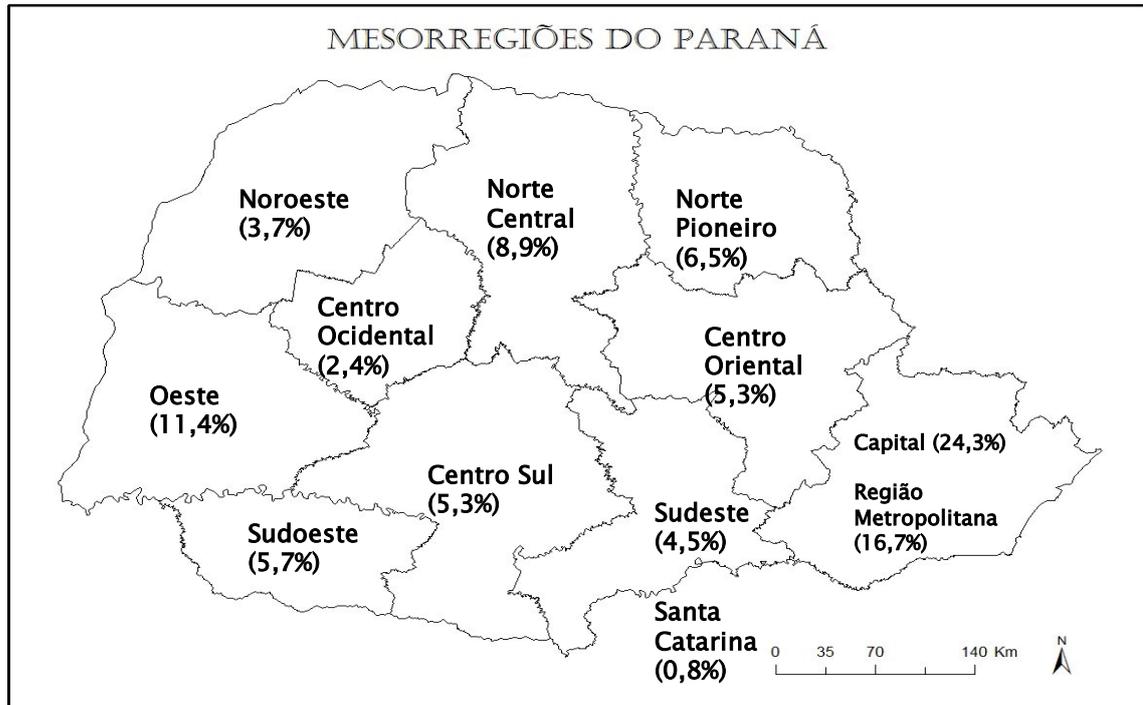
FIGURA 2 – DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES DE ACORDO COM O GÊNERO E IDADE (n=246)



Fonte: A autora, (2017)

O mapa demográfico a seguir representa a origem dos pacientes que foram inseridos na pesquisa (Figura 3). A maioria dos pacientes está localizada em Curitiba e região metropolitana (41%), sendo os demais distribuídos em outras regiões do Paraná e no estado de Santa Catarina.

FIGURA 3 – DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES DE ACORDO COM A REGIÃO DEMOGRÁFICA



Fonte: A autora, (2017)

O patógeno *S. aureus* foi isolado em amostras respiratórias de 182 (74%) pacientes, apresentando uma maior prevalência nos primeiros anos de vida (1 mês a 9 anos) em 103 (56,6%) pacientes. Dos pacientes em que se isolou *S. aureus*, SCVs foram identificados em 11 (6,0%), totalizando 4,5% em todos os pacientes atendidos (Tabela 1).

Das 11 amostras em que o fenótipo SCV esteve presente, em 7 (63,7%) também se isolou o fenótipo normal.

TABELA 1 - DISTRIBUIÇÃO DO FENÓTIPO NORMAL E SCV DE *S. aureus* EM RELAÇÃO À IDADE E GÊNERO DOS PACIENTES (n=182)

idade (anos)	<i>S. aureus</i> normal		<i>S. aureus</i> SCV		total
	Masculino	Feminino	Masculino	Feminino	
1mês - 9a	52	51	0	0	103
10 - 19	30	22	3	2	57
20 - 29	3	1	3	1	8
30 - 39	0	4	0	0	4
40 - 49	0	1	0	0	1
50 - 59	1	1	0	1	3
60 - 69	0	2	0	0	2
>70	1	2	0	0	3
Desconhecida	0	0	1	0	1
total	87	84	7	4	182

Fonte: A autora (2017)

A tabela a seguir apresenta as medianas de idade dos pacientes nos quais se isolaram o fenótipo normal e SCV de *S. aureus*.

TABELA 2 - MEDIANA DE IDADE DE PACIENTES COM *S. aureus* NORMAL (N=171) E SCV (n=10)

Fenótipo <i>S. aureus</i>	N	Mediana (anos)	p (teste t)
normal	171	7,00	0,033
SCV	10	19,00	
total	181	8,00	

Fonte: A autora (2017)

A análise estatística demonstrou diferença significativa com relação às medianas de idade entre o total de pacientes nos quais se isolou *S. aureus* com fenótipo normal e fenótipo SCV.

A tabela 3 contém o valor de qui-quadrado entre o fenótipo SCV e o gênero dos pacientes.

TABELA 3 – ANÁLISE DO FENÓTIPO SCV E GÊNERO DOS PACIENTES

GÊNERO	SCV		total	p (qui-quadrado)
	Não	Sim		
Feminino	84	4	88	0,287
Masculino	87	7	94	
total	171	11	182	

Fonte: A autora (2017)

Conforme demonstrado na tabela 3, a prevalência de SCVs no gênero masculino foi superior ao feminino, porém sem diferença significativa ($p= 0,287$).

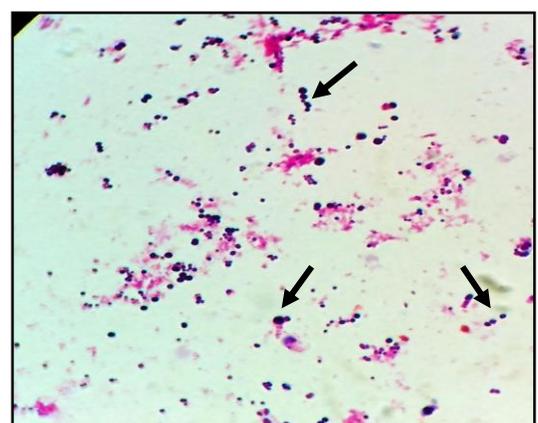
5.2 IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA

As figuras a seguir representam as características microscópicas e macroscópicas dos isolados normais de *S. aureus* e dos SCVs. Na figura 4 a, observa-se a morfologia celular característica de *S. aureus*, arranjados aos pares, tétrades e cachos de uva, já na figura 4b, os cocos se apresentam de forma irregular, aos pares ou pequenos agrupamentos.

FIGURA 4 – MORFOLOGIA MICROSCÓPICA DE ISOLADOS NORMAIS (A) E DOS SCVs (B) CARACTERIZADA ATRAVÉS DA COLORAÇÃO DE GRAM



(a)

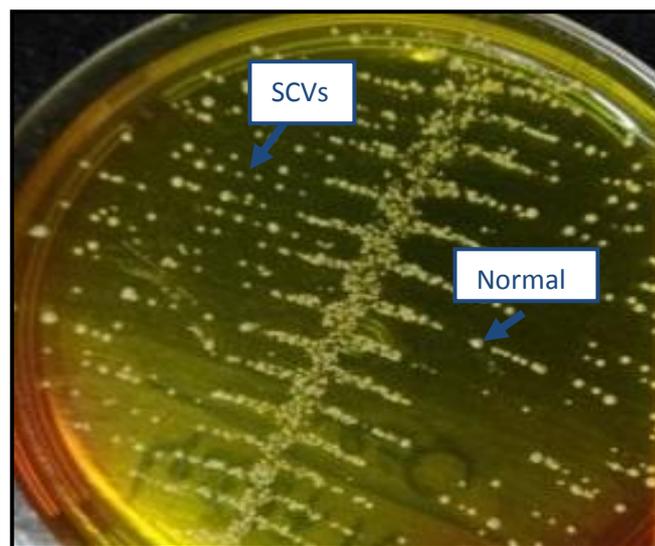


(b)

FONTE: (a) e (b) A autora (2017)

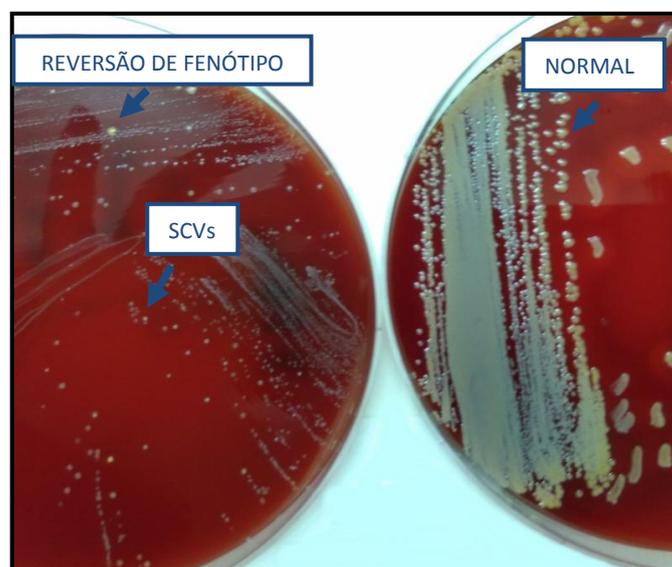
Na placa de MSA na figura 5 observa-se o crescimento concomitante de colônias de *S. aureus* normal, e de SCVs que apresentam colônias de tamanho inferior quando comparadas com o fenótipo normal. Na figura 6 observa-se o crescimento dos fenótipos normal e SCV em ágar sangue, sendo que na placa com crescimento das colônias SCVs, algumas colônias começam a reverter para o fenótipo normal.

FIGURA 5 - COLÔNIAS DE FENÓTIPOS NORMAL E SCV DE *S. aureus* EM ÁGAR MANITOL SALGADO



FONTE: A autora (2017)

FIGURA 6 - COLÔNIAS DE FENÓTIPOS SCVs (ESQUERDA) E NORMAL (DIREITA) EM ÁGAR SANGUE

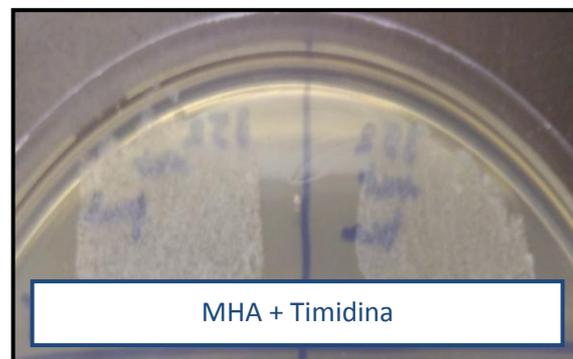


FONTE: A autora (2017)

Todos os isolados SCVs apresentaram teste positivo para as provas de catalase e coagulase e não cresceram em ágar NaCl 7,5% e ágar Mueller Hinton não suplementado. Pelo sistema automatizado Vitek[®]2 Compact, os isolados SCVs de *S. aureus* foram identificados como *S. aureus* em 7 (63,6%), *S. capitis/warneri* em 1 (9,1%) e *S. lentus* em 3 (27,3%). Todos os isolados foram identificados como *S. aureus* pelo MALDI-TOF e confirmados molecularmente pela detecção do gene *nuc* (Tabela 4).

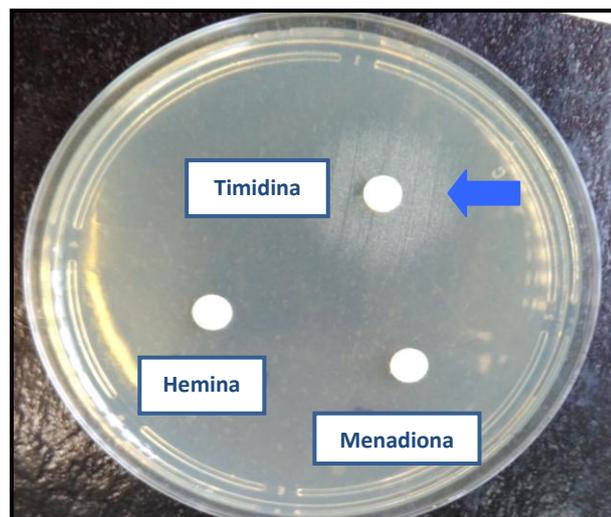
No teste de dependência nutricional, todos os 11 isolados SCVs foram dependentes de timidina (Figura 7 e 8), e nenhum deles apresentou dependência para menadiona e hemina (Tabela 4).

FIGURA 7 – CRESCIMENTO DE COLÔNIAS SCVs NO TESTE DE DEPENDÊNCIA NUTRICIONAL EM MHA SUPLEMENTADO COM TIMIDINA



FONTE: A autora (2017)

FIGURA 8 - CRESCIMENTO DE COLÔNIAS SCVs NO TESTE DE DEPENDÊNCIA NUTRICIONAL EM MHA UTILIZANDO DISCOS IMPREGNADOS COM OS DIFERENTES SUBSTRATOS



FONTE: A autora (2017)

TABELA 4 - TESTES FENOTÍPICOS, GENOTÍPICOS E DE DEPENDÊNCIA NUTRICIONAL DOS ISOLADOS DE SCVs

Isolado ID	Identificação bacteriana					Dependência nutricional				
	Testes bioquímicos			sistemas automatizados		PCR				
	Catalase	NaCl 7,5%	Coagulase	Vitek	MALDI- TOF	gene <i>nuc</i>	MHA	TMHA	HMHA	MMHA
Sa1	+	-	+	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	+	-	+	-	-
Sa2	+	-	+	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	+	-	+	-	-
Sa3	+	-	+	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	+	-	+	-	-
Sa4	+	-	+	<i>S. capitis/warneri</i>	<i>S. aureus</i>	+	-	+	-	-
Sa5	+	-	+	<i>S. lentus</i>	<i>S. aureus</i>	+	-	+	-	-
Sa6	+	-	+	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	+	-	+	-	-
Sa7	+	-	+	<i>S. lentus</i>	<i>S. aureus</i>	+	-	+	-	-
Sa8	+	-	+	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	+	-	+	-	-
Sa9	+	-	+	<i>S. lentus</i>	<i>S. aureus</i>	+	-	+	-	-
Sa10	+	-	+	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	+	-	+	-	-
Sa11	+	-	+	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	+	-	+	-	-

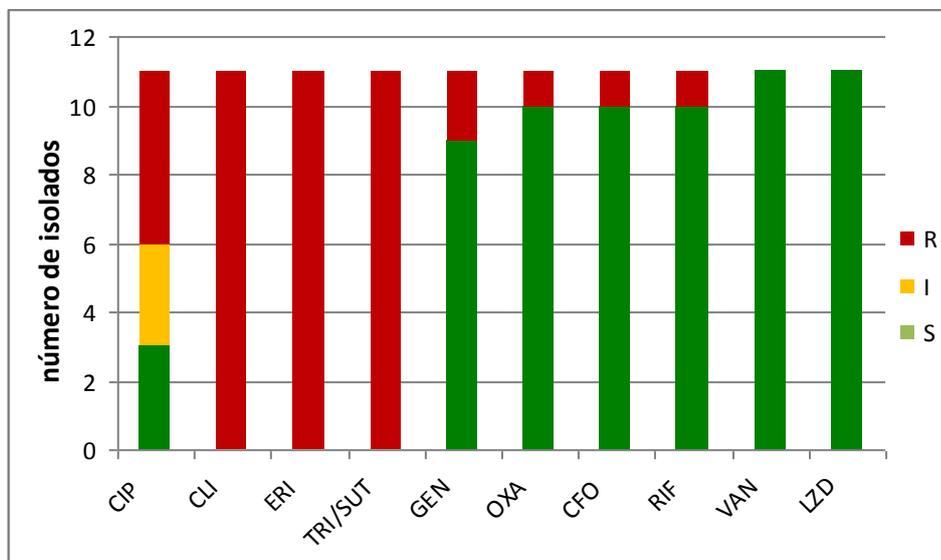
Fonte: A autora (2017)

NOTA: NaCl 7,5% (Ágar em tubo inclinado); MHA (Ágar Mueller Hinton); TMHA (Ágar Mueller Hinton suplementado com timidina); HMHA (Ágar Mueller Hinton suplementado com hemina); MMHA (Ágar Mueller Hinton suplementado com menadiona).

5.3 PERFIL DE SUSCETIBILIDADE E GENES DE RESISTÊNCIA

Pelo método de disco difusão, o perfil de suscetibilidade dos 11 isolados SCVs demonstrou que todos foram resistentes a clindamicina, eritromicina e trimetoprim-sulfametoxazol. Para ciprofloxacino houve suscetibilidade intermediária em 3 (27,3%) dos isolados e 5 (54,5%) foram resistentes. Em 2 (18,2%) foi detectada resistência à gentamicina e em 1 (9%) à oxacilina e rifampicina. Todos os isolados foram suscetíveis à vancomicina e linezolida (Figura 9).

FIGURA 9 – PERFIL DE SUSCETIBILIDADE POR DISCO DIFUSÃO EM SCVs (n=11)



FONTE: A autora (2017)

LEGENDA: CIP = Ciprofloxacino; CLI = Clindamicina; ERI = Eritromicina;
 T/S = trimetoprim/Sulfametoxazol; VAN = Vancomicina; OXA = Oxacilina
 (testado com cefoxitina); GEN = Gentamicina; RIF = Rifampicina;
 LZD = Linezolida; R = Resistente; I = Intermediário; S = Sensível.

Em 5 isolados SCVs (45,5%) a resistência à clindamicina foi do tipo induzível. A Figura 10 representa a resistência induzida à clindamicina em SCVs pelo D-test.

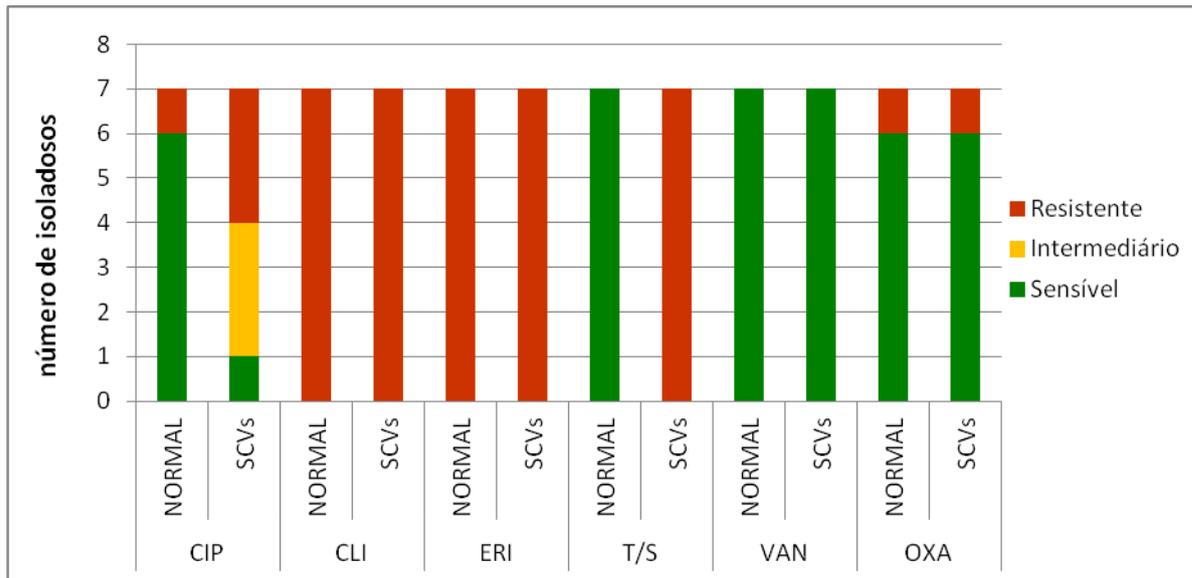
FIGURA 10 – RESISTÊNCIA INDUZIDA À CLINDAMICINA ATRAVÉS DA TÉCNICA DE D-TEST



FONTE: A autora (2017)

Das 11 amostras em que se isolou SCVs, em 7 amostras também se isolou *S. aureus* com fenótipo normal. Pelo teste de microdiluição em caldo, os SCVs foram 100% resistentes a trimetoprim-sulfametoxazol enquanto os isolados de fenótipo normal foram todos sensíveis. A resistência a ciprofloxacino em SCVs foi de 42,8% e no fenótipo normal foi de 14,3%. Os antibióticos clindamicina, eritromicina e vancomicina apresentaram o mesmo perfil de suscetibilidade tanto para o fenótipo normal quanto para o fenótipo SCV (Figura 11).

FIGURA 11 – COMPARAÇÃO DO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE POR MICRODILUIÇÃO ENTRE O FENÓTIPO NORMAL E SCVs (n = 7)



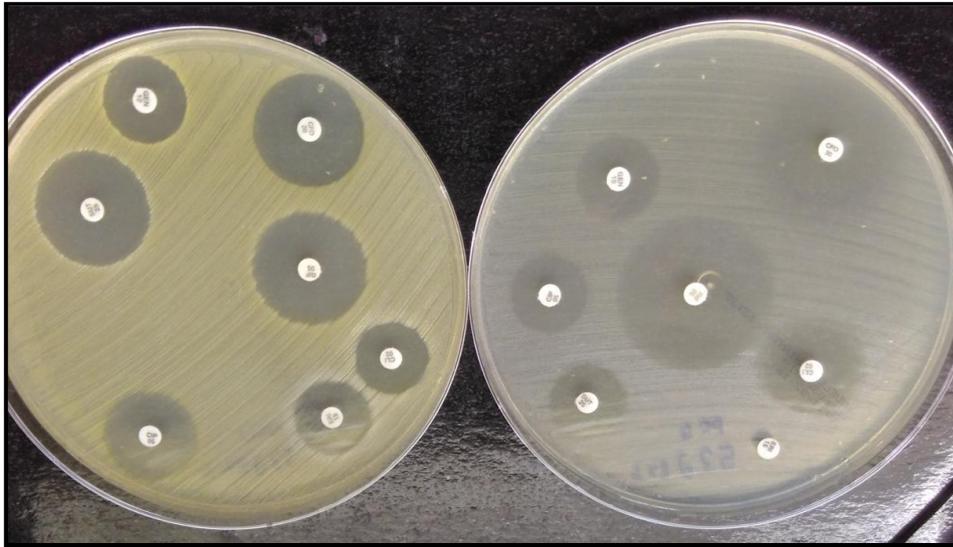
FONTE: A autora (2017)

NOTA: CIP = Ciprofloxacina; CLI = Clindamicina; ERI = Eritromicina; T/S = trimetoprim/Sulfametoxazol; VAN = Vancomicina; OXA = Oxacilina; R =

Todos os isolados SCVs foram multirresistentes, e tanto o antibiograma realizado pela técnica de disco difusão quanto por microdiluição em caldo apresentaram o mesmo perfil de suscetibilidade.

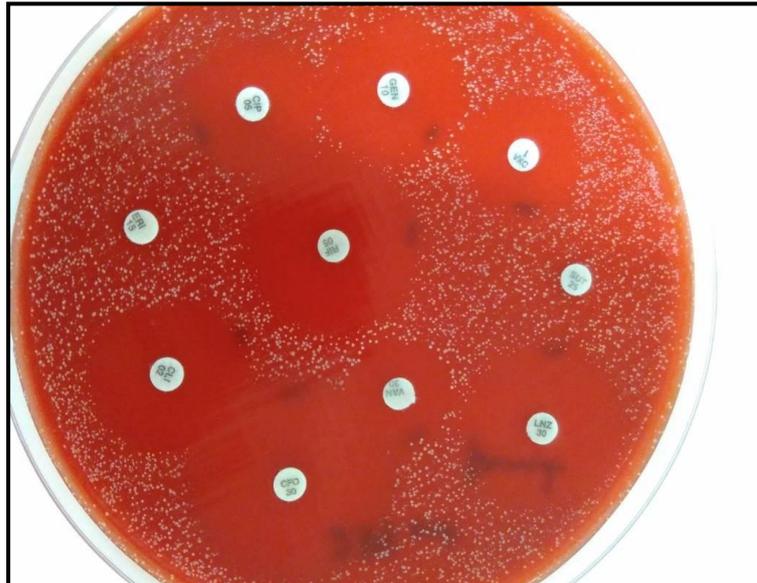
As Figuras 12 e 13 representam a técnica de DD, na figura 12 do lado esquerdo está representado por antibiograma utilizando MHA testado para o fenótipo normal e do lado direito MHA suplementado com 200µg/mL de timidina para o fenótipo SCV. Na figura 13 o antibiograma para SCVs foi realizado em MHA suplementado com sangue de carneiro e timidina.

FIGURA 12 - ANTIBIOGRAMA EM MHA PARA FENÓTIPO NORMAL (ESQUERDA) E MHA SUPLEMENTADO COM TIMIDINA PARA O FENÓTIPO SCV (DIREITA)



Fonte: A autora (2017)

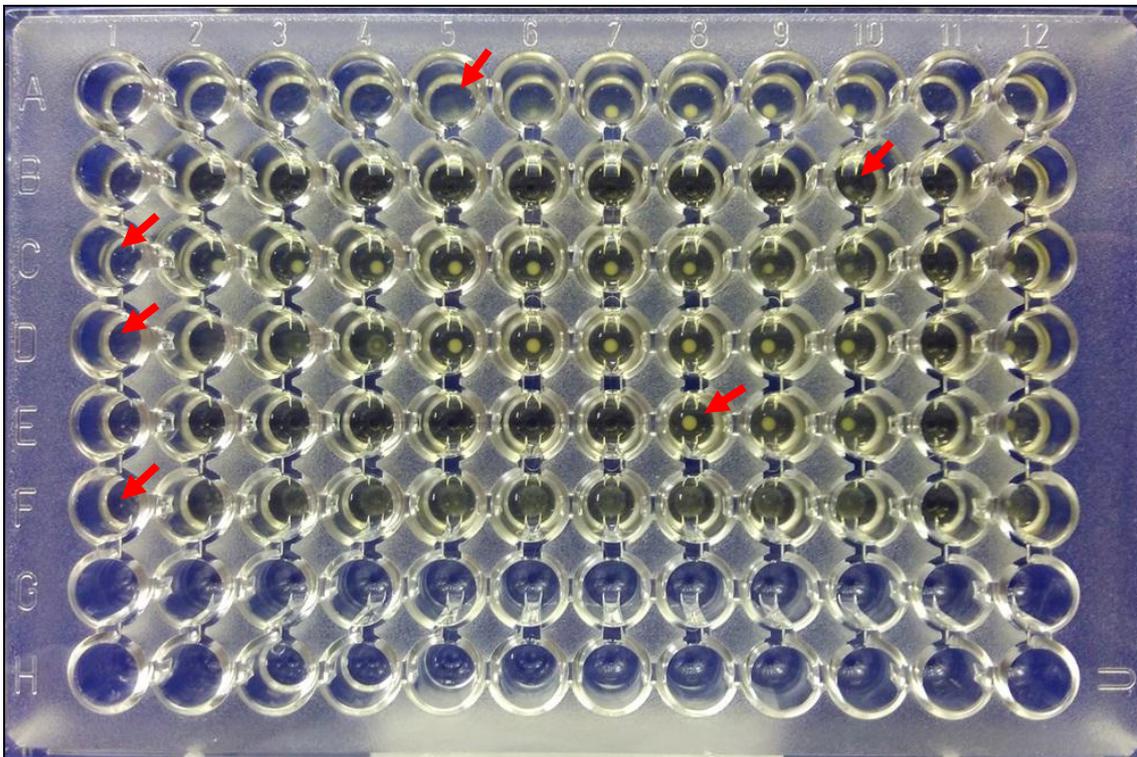
FIGURA 13 - ANTIBIOGRAMA DO FENÓTIPO SCV EM MHA SUPLEMENTADO COM TIMIDINA E SANGUE



FONTE: A autora (2017)

Na Figura 14 está representada a técnica de microdiluição em caldo. As setas indicam o último poço onde houve crescimento bacteriano. Os poços límpidos, anteriores aos indicados pela seta, representam as diferentes CIM.

FIGURA 14 – MICRODILUIÇÃO EM CALDO PARA O FENÓTIPO SCV



FONTE: A autora (2017)

LEGENDA: A - Ciprofloxacino (2 µg/mL).; B - Clindamicina (0,06 µg/mL).; C - Eritromicina (≥32 µg/mL).; D - trimetoprim/Sulfametoxazol (≥16/304 µg/mL).; E - Vancomicina (1 µg/mL).; F - Oxacilina (≥16 µg/mL).

Colunas 1 a 10 - concentrações decrescentes dos diferentes antimicrobianos.

Coluna 11 - controle negativo; coluna 12 - controle de crescimento.

Através da pesquisa genotípica da resistência bacteriana, o gene *mecA* foi encontrado em 1 isolado. Os genes *ermA* (1), *ermB* (1), *ermC* (2) foram encontrados entre os 11 isolados. Pelos genes *erm* foi possível detectar a resistência constitutiva (cMLS_b) em 2 isolados e a resistência induzida (iMLS_b) em outros 2 isolados. Nos 11 isolados foi encontrado o gene *msrB* que confere resistência mediada por bomba de

efluxo. Com relação ao teste fenotípico induzível MLS_b o D-test foi positivo em 5 isolados (Tabela 5).

TABELA 5 – PERFIL FENOTÍPICO E GENOTÍPICO DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS

Isolado	Concentração Inibitória Mínima (µg/mL)						Teste fenotípico induzível MLS _b	Determinantes gênicos de resistência		
	CIP	CLI	ERI	TRI/SUT	VAN	OXA	D-test	β-Lactâmico	MLS _b	
								<i>mecA</i>	<i>erm</i>	<i>msr</i>
Sa1	2	0,06	≥32	≥16/304	1	≥16	+	+	C	B
Sa2	8	≥16	≥32	≥16/304	0,5	0,25	-	-	B	B
Sa3	2	0,06	32	≥16/304	2	0,25	+	-	A	B
Sa4	4	≥16	≥32	≥16/304	0,25	0,125	-	-	-	B
Sa5	1	0,125	≥32	16/304	2	0,5	+	-	-	B
Sa6	4	≥16	≥32	≥16/304	1	1	-	-	-	B
Sa7	1	4	16	≥16/304	1	0,5	-	-	-	B
Sa8	2	≥16	≥32	≥16/304	2	1	-	-	-	B
Sa9	8	≥16	≥32	≥16/304	1	2	+	-	C	B
Sa10	4	≥16	≥32	≥16/304	1	1	-	-	-	B
Sa11	1	0,06	≥32	≥16/304	1	0,125	+	-	-	B

Fonte: A autora (2017)

LEGENDA: CIP - ciprofloxacino, CLI - clindamicina, ERI - eritromicina, TRI/SUT - trimetoprim/sulfametaxazol, VAN – vancomicina, OXA – oxacilina. MLS_b – Resistência induzida ou constitutiva para Macrolídeos, Lincosaminas e Estreptograminas.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo caracterizou as colônias pequenas variantes (SCVs) de *S. aureus* isoladas de pacientes dos ambulatórios de Fibrose Cística do HC-UFPR. O fenótipo SCV de *S. aureus* tem chamado a atenção da comunidade científica nas duas últimas décadas por estar relacionado a infecções crônicas e de difícil tratamento (PROCTOR *et al.*, 2014).

Com relação aos dados encontrados por gênero, tanto o fenótipo normal quanto SCV de *S. aureus* foram isolados com prevalência similar. No gênero masculino e feminino foi encontrado o fenótipo normal em 87 (47,8%) e 84 (46,1%) e para o fenótipo SCV 7 (3,8%) e 4 (2,2%) respectivamente. Apesar da prevalência de SCVs no gênero masculino ter sido superior ao feminino, não houve diferença significativa ($p= 0,287$), o que pode estar relacionado com o número pequeno da amostra.

Embora *S. aureus* tenha sido isolado com maior frequência nos primeiros anos de vida (103 pacientes), como relatado por GBEFC (2014) e CFF (2016), o fenótipo SCV foi isolado em pacientes a partir dos 10 anos, o que está de acordo com os dados encontrados por Yagci *et al.* (2013). Neste estudo a idade mediana encontrada para o total de pacientes com FC foi de 9 anos, sendo que entre os que se isolou *S. aureus* com fenótipo normal foi de 7 anos e com fenótipo SCV foi de 19 anos. No estudo de Besier *et al.* (2007), no total de pacientes a idade mediana foi de 16 anos, e nos pacientes que se isolou SCVs foi 21 anos. Yagci *et al.* (2013) encontraram no total de pacientes a idade mediana de 9,9 anos, e nos pacientes que se isolou SCVs 14,4 anos. Pakasticali *et al.* (2016) a idade mediana do total de pacientes foi de 11,3 anos, *S. aureus* com o fenótipo normal e SCV foram de 11 e 15 anos respectivamente. Assim, o fenótipo SCV em nosso estudo foi isolado em pacientes com mediana de idade superior aos demais pesquisadores acima citados.

O fenótipo SCV foi identificado em 11 (4,5%) do total de pacientes. A prevalência mundial de SCVs tem se distribuído diferentemente nos países europeus, variando de 4 a 33% (KAHL *et al.*, 1998; VERGISON *et al.*, 2007; BESIER *et al.*, 2007; SCHENEIDER *et al.*, 2008; MORELLI *et al.*, 2015; MASOUD-LANDGRAF *et al.*, 2016). Nos Estados Unidos, a prevalência variou de 6 a 24% (GILLIGAN *et al.*, 1987; GREEN *et al.*, 2011; WOLTER *et al.*, 2013). Já na Turquia

foram encontrados por Yagci *et al.* (2013) e Pakasticali *et al.* (2016) a prevalência de 8 e 21%, respectivamente.

A presença concomitante dos fenótipos normal e SCV de *S. aureus* foram observadas. Dos 11 pacientes em que se isolou o fenótipo SCV, em 7 também se isolou o fenótipo normal. Yagci *et al.* (2013) isolaram o fenótipo SCV em amostras respiratórias de 19 pacientes, e destes isolaram concomitantemente *S. aureus* com fenótipo normal em 18 pacientes. Besier *et al.* (2007), dos 20 pacientes em que isolaram o fenótipo SCV em 15 isolaram também *S. aureus* com fenótipo normal, Masoud-Landgraf *et al.* (2016), dos 12 pacientes nos quais isolaram o fenótipo SCV, em 2 isolaram também *S. aureus* com fenótipo normal.

Devido às alterações metabólicas observadas em *S. aureus*, que determinam o surgimento das colônias SCVs, a identificação deste fenótipo é dificultada pelas características morfológicas das colônias, que são muito pequenas, com tamanho 10 vezes menores que o fenótipo normal, não pigmentadas, não hemolíticas e algumas vezes aderentes ao ágar. As alterações bioquímicas que ocorrem, segundo Kahl *et al.* (2016), podem levar a reações demoradas ou negativas para os testes de catalase e coagulase. No presente estudo todos os isolados SCVs apresentaram teste positivo para as provas de catalase e coagulase, e não cresceram em ágar NaCl 7,5% e ágar Mueller Hinton não suplementado. Garcia *et al.* (2015) também encontraram resultados positivos para os testes de catalase e coagulase. Delgado-Valverde *et al.* (2014) encontraram SCVs coagulase negativa em seu estudo. Quando as provas clássicas de identificação não correspondem aos resultados esperados, mas observa-se pela morfologia que pode se tratar de um *S. aureus* SCVs, devem-se utilizar outras metodologias para a identificação como a pesquisa do gene *nuc*.

A ausência de crescimento em ágar Mueller Hinton não suplementado é uma característica de SCVs (BESIER *et al.*, 2007; DELGADO-VALVERDE *et al.*, 2014). Não foram encontrados relatos do uso de ágar NaCl 7,5% como utilizado nesta pesquisa, já que o teste é uma modificação do meio de Chapman (fórmula em Anexo 3 - não contém manitol e indicador de pH vermelho de fenol), utilizado no laboratório e que auxiliou na suspeita de estar frente a um SCVs, por não crescer neste meio específico para *S. aureus*. Embora, alguns pesquisadores relatam que SCVs podem não crescer em ágar manitol salgado (PROCTOR *et al.*, 2006).

O sistema automatizado Vitek[®]2 Compact, utilizado para confirmar a identificação da espécie, identificou corretamente como *S. aureus* apenas 7 (63,6%) dos 11 isolados. Estes dados demonstram que, devido às características de crescimento de SCVs, o uso de automação para a identificação da espécie é limitado. A detecção de genes espécie-específicos (*nuc*, *coa* e *spa*) pode ser utilizada para a confirmação de SCVs de *S. aureus* (NIELSEN *et al.*, 2009). Por PCR, o gene *nuc*, que codifica a enzima termonuclease em *S. aureus*, foi detectado em todas as amostras deste estudo, assim como relatado por Vergison *et al.* (2007).

Uma alternativa para confirmar a identificação fenotípica seria a utilização da espectrometria de massa (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight - MALDI-TOF). Neste trabalho todas as amostras SCVs foram identificadas corretamente, com este método, assim como no trabalho de Ota *et al.* (2015).

Com relação à dependência nutricional, todos os isolados SCVs no estudo foram dependentes de timidina, e nenhum deles apresentou dependência para os substratos menadiona e hemina. Estudos demonstrando somente dependência à timidina foram realizados por Gilligan *et al.* (1987), Morelli *et al.* (2015) e Junge *et al.* (2016), onde encontraram 10%, 13% e 43% respectivamente. Estudos realizados por Wolter *et al.* (2013) encontraram em seus isolados, além da dependência à timidina (95%), também dependência à hemina (7%) e menadiona (1%). No estudo de Masoud-Landgraf *et al.* (2016) dos 12 SCVs encontrados, (76,4%) foram dependentes de timidina e (11,7%) de hemina. Como demonstrado em nosso estudo e dos autores acima, SCVs dependentes de timidina são mais frequentemente encontrados em amostras respiratórias de pacientes com FC.

Testes convencionais de antibiograma como disco difusão (DD) e testes quantitativos de diluição foram elaborados para bactérias de crescimento rápido, portanto recomenda-se uma avaliação criteriosa destes testes quando se trata dos SCVs, que têm crescimento lento, sendo necessário o uso de meios suplementados e incubação por 48 horas (KAHL *et al.*, 2016). Neste estudo tanto o antibiograma realizado pela técnica de DD em MHA quanto por microdiluição em caldo BHI, ambos suplementados com timidina (200µg/mL), apresentaram o mesmo perfil de suscetibilidade. Precit *et al.* (2016), em sua pesquisa concluíram que o uso dos dois meios de cultura são adequados para a detecção da suscetibilidade a antimicrobianos, porém a suplementação dos meios com timidina foi de 5µg/mL. No presente estudo foram utilizadas as técnicas sugeridas por

Delgado-Valverde *et al.* (2014), Precit *et al.* (2016) e Yagci, *et al.* (2013), pois até o presente momento o CLSI (2017) padronizou a técnica apenas para a cefoxitina.

No presente estudo 100% dos SCVs foram resistentes a trimetoprim/sulfametoxazol, assim como no estudo de Precit *et al.* (2016). Já Yagci *et al.* (2013) encontraram uma resistência de 16,5%. O antimicrobiano trimetoprim/sulfametoxazol costuma ser ativo contra *S. aureus*, tanto MSSA quanto para MRSA, sendo o tratamento de escolha para infecções em pacientes com FC. Entretanto, a exposição continuada ao antimicrobiano está associada ao surgimento de SCVs timidina-dependentes (KRIEGESKORTE *et al.*, 2015). Por este motivo, SCVs dependente de timidina costumam ser resistentes a esta droga (BESIER *et al.*, 2007).

Neste estudo foi encontrada uma resistência de 18,2% para gentamicina, 54,5% para ciprofloxacino e 9,0% para rifampicina. No estudo de Yagci *et al.* (2013) encontraram uma resistência de 6,3% para gentamicina e 14,6% para ciprofloxacino, já no trabalho de Pakasticali *et al.* (2016) os índices de resistência foram de 8% para gentamicina e rifampicina.

O macrolídeo azitromicina possui propriedade anti-inflamatória (BLACK *et al.*, 1997), sendo utilizado em pacientes com FC visando uma melhora da função pulmonar. Entretanto o uso deste antibiótico tem sido associado com a resistência encontrada a eritromicina e clindamicina (PHAFF *et al.*, 2006). Foi encontrado nos SCVs uma resistência de 100% à eritromicina e clindamicina no presente trabalho, sendo que em 45,5% a resistência à clindamicina foi induzida por eritromicina. Masoud-Landgraf *et al.* (2016) encontraram uma resistência de 52,9% para clindamicina e eritromicina, e Pakasticali *et al.* (2016) uma resistência de 10% para clindamicina, mas não testaram eritromicina.

Os genes *ermA* (1), *ermB* (1), *ermC* (2), foram encontrados em 2 isolados com resistência constitutiva (cMLS_b) e em 2 com resistência induzida (iMLS_b) aos antibióticos clindamicina e eritromicina. Dois isolados (iMLS_b) com teste fenotípico (D-test) positivo foram negativos para o genotípico, assim como nos estudos de Ghanbari *et al.* (2016) e Coutinho *et al.* (2010). Outros genes menos frequentemente isolados porém, não foram testados neste trabalho, como os genes *ermf*, *ermv* (MATSUOKA *et al.*, 2002) e *ermt* (CHROBOCZEK *et al.*, 2013).

Em todos os isolados foi encontrado o gene *msrB* e não foi encontrado o gene *msrA*. Os dois genes estão relacionados com a expressão de bomba de

efluxo, um mecanismo adicional relacionado com a resistência aos macrolídeos, porém este mecanismo de resistência não está associado com a resistência induzida à clindamicina, podendo esta ser utilizada como tratamento, desde que não existam outros mecanismos de resistência presentes (ELKAMMOSHI *et al.*, 2016).

Neste estudo a resistência à oxacilina dos *S. aureus* SCVs foi de 9%, confirmada pela pesquisa do gene *mecA*. Valores semelhantes foram relatados por Yagci *et al.* (2013), e Masoud-Landgraf *et al.* (2016), onde a resistência para oxacilina foi de 10,4% e 11,7% respectivamente. O isolamento de *S. aureus* resistente à metilicina está relacionado com piora da função pulmonar e risco de morte em pacientes com FC (DASENBROOK *et al.*, 2010). O isolamento de SCVs de *S. aureus* MRSA pode ser mais um agravante para os pacientes infectados (GARCIA, 2015).

Todos os isolados foram sensíveis para vancomicina e linezolida. Masoud-Landgraf *et al.* (2016) também encontraram 100% de sensibilidade para estes antibióticos. A alta sensibilidade à vancomicina pode estar relacionada ao uso estritamente hospitalar. Em relação à linezolida, por ser uma droga relativamente nova e de custo elevado, ainda existem poucos relatos de resistência na literatura (ENDIMIANI *et al.*, 2011).

Entre as 11 amostras em que se isolou SCVs, em 7 amostras também se isolou *S. aureus* com fenótipo normal, que apresentaram perfis de suscetibilidade diferentes. Besier *et al.* (2008), Yagci *et al.* (2013), Morelli *et al.* (2015) e Pakasticali *et al.* (2016) também encontraram uma maior resistência aos antimicrobianos para SCVs. Não identificar o SCVs pode induzir ao tratamento inadequado, uma vez que os mesmos apresentaram maior resistência aos antimicrobianos, quando comparados com o fenótipo normal.

7 CONCLUSÕES

- A prevalência de SCVs encontrada em pacientes com FC (4,5%) em nossa comunidade ainda é baixa.
- Todos os isolados no estudo foram dependentes de timidina, não sendo encontrado auxotrofismo para hemina e menadiona.
- Não foram encontradas diferenças na interpretação da suscetibilidade pelos diferentes métodos utilizados, embora tenha havido dificuldades na determinação do perfil de suscetibilidade em SCVs devido ao crescimento lento, sendo necessária, muitas vezes, a incubação dos isolados por um tempo maior.
- Todos os isolados SCVs foram considerados multirresistentes, apresentando resistência a, no mínimo, três classes diferentes de antimicrobianos.
- Todos os isolados foram sensíveis aos antimicrobianos vancomicina e linezolida, demonstrando que estas drogas ainda continuam ativas contra SCVs e podem ser usadas em pacientes com Fibrose Cística.
- Em um isolado SCVs, através da pesquisa genotípica da resistência bacteriana foi encontrado o gene *mecA* que caracteriza resistência à oxacilina para *S. aureus*.
- Através da pesquisa dos genes de resistência *ermA*, *ermB* e *ermC* foi possível a detecção de resistência constitutiva (cMLS_b) e induzida (iMLS_b), aos antimicrobianos eritromicina e clindamicina. Em todos os isolados foi

encontrado o gene *msrB*, o qual está associado ao mecanismo de resistência aos macrolídeos através de bombas de efluxo.

- Em dois isolados não houve concordância entre a pesquisa gênica da resistência para macrolídeos e clindamicina por PCR e os testes fenotípicos (D-test), sugerindo que outros métodos são necessários para a confirmação dos resultados, como a utilização de outros marcadores de resistência ou sequenciamento dos genes.
- Os dados obtidos neste trabalho alertam os microbiologistas sobre as dificuldades no reconhecimento e identificação de SCVs de *S. aureus* na rotina laboratorial. Além disso, os resultados suscitam preocupação com o tratamento, uma vez que todos os isolados demonstraram perfil de resistência mais elevado quando comparados ao fenótipo normal de *S. aureus*.

REFERÊNCIAS

ABMAN, S. H., OGLE, J. W.; HARBECK, R. J.; BUTLER-SIMON, N.; HAMMOND, K. B.; ACCURSO, F. J. Early bacteriologic, immunologic, and clinical courses of young infants with cystic fibrosis identified by neonatal screening. **J. Pediatr**, v.119, p.211-217, 1991.

ALRESHIDI, M. M.; DUNSTAN, R. H.; ONYANGO, L. A.; ROBERTS, T. K. Staphylococcal phenomics: metabolomic and proteomic responses to environmental stressors. **FORMATEX**, p.690-701, 2013.

ATALLA, H.; GYLES, C.; BONNIE, M. *Staphylococcus aureus* small colony variants (SCVs) and their role in disease. **Anim Health Res Rev**, v.12, n.1, p.33-45, 2011.

BEAUME, M.; HERNANDEZ, D.; DOCQUIER, M.; DELUCINGE-VIVIER, C.; DESCOMBES, P.; FRANCOIS, P. Orientation and expression of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* small RNAs by direct multiplexed measurements using the nCounter of nanoString technology. **J Microbiol Methods**, v.84, n.2, p.327-334, 2011.

BESIER, S.; SMACZNY, C.; VON MALLINCKRODT, C.; KRAHL, A.; ACKERMANN, H.; BRADE, V. *et al.* Prevalence and Clinical Significance of *Staphylococcus aureus* Small-Colony Variants in Cystic Fibrosis Lung Disease. **J Clin Microbiol**, v.45, n.1, p.168-172, 2007.

BESIER, S.; ZANDER, J.; KAHL, B. C.; KRAICZY, P.; BRADE, V.; WICHELHAUS, T. T. The Thymidine-Dependent Small-Colony-Variant Phenotype Is Associated with Hypermutability and Antibiotic Resistance in Clinical *Staphylococcus aureus* Isolates. **Antimicrob Agents Chemother**, v.52, n.6, p.2183-2189, 2008.

BISWAS, L.; BISWAS, R.; SCHLAG, M.; BERTRAM, R.; GÖTZ, F. Small-Colony Variant Selection as a Survival Strategy for *Staphylococcus aureus* in the Presence of *Pseudomonas aeruginosa*. **Appl Environ Microbiol**, v.75, n.21, p.6910-6912, 2009.

BLACK P. N. Anti-inflammatory effects of macrolide antibiotics. **Eur Respir J**, v.10, p. 971–972, 1997.

CDC. *Centers for Disease Control and Prevention*. Specimen collection guidelines. Available from www.cdc.gov

CHAVES, F. Infecciones por variantes de colonias pequeñas de *Staphylococcus aureus*: implicaciones clínicas y microbiológicas. **Enferm Infecc Microbiol Clin**, v.32, n.2, p.67-69, 2014.

CHEN, J.; YU, Z.; MICHEL, F. C.; WITTUM, T.; MORRISON, M. Development and Application of Real-Time PCR Assays for Quantification of *erm* Genes Conferring Resistance to Macrolides-Lincosamides-Streptogramin B in Livestock Manure and Manure Management Systems. **Appl Environ Microbiol**, v.73, n.14, p.4407-4416, 2007.

CHROBOCZEK, T; BOISSET, S; RASIGADE, J. P.; TRISTAN, A.; BES, M.; MEUGNIER, H.; *et al.* Clonal complex 398 methicillin susceptible *Staphylococcus aureus*: a frequent unspecialized human pathogen with specific phenotypic and genotypic characteristics. **PLoS One**, v.8, n.11, 2013.

CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 26th ed. CLSI supplement M100S. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2016.

CYSTIC FIBROSIS FOUNDATION. Patient Registry Annual Data Report 2009. Cystic Fibrosis Foundation, Bethesda, MD. Available from www.cff.org.

CYSTIC FIBROSIS FOUNDATION. Patient Registry Annual Data Report 2016. Cystic Fibrosis Foundation, Bethesda, MD. Available from www.cff.org.

CYSTIC FIBROSIS TRUST. **Report of the UK Cystic Fibrosis Trust Microbiology Laboratory Standards Working Group**. Kent: Cystic Fibrosis Trust, 2010.

COUTINHO, V. L. S.; PAIVA, R. M.; REITER, K. C.; PARIS, S.; BARTH, A. L.; MOMBACH, A. B. *et al.* Distribution of *erm* genes and low prevalence of inducible resistance to clindamycin among *staphylococci* isolates. **Braz J Infect Dis**, v.14, n.6, p.564-568, 2010.

DASENBROOK, E. C.; CHECKLEY, W.; MERLO, C. A.; KONSTAN, M. W.; LECHTZIN, N.; BOYLE, M.P. Association Between Respiratory Tract Methicillin-

Resistant *Staphylococcus aureus* and Survival in Cystic Fibrosis. **JAMA**, v.303, n.23, p.2386-2392, 2010.

DEAN, M. A., OLSEN, R. J., LONG, S. W., ROSATO, A. E.; MUSSER, J. M. Identification of Point Mutations in Clinical *Staphylococcus aureus* Strains That Produce Small-Colony Variants Auxotrophic for Menadione. **Infection and Immunity**, v.82, n.4, p. 1600–1605, 2014.

DELGADO-VALVERDE, M.; FERNÁNDEZ-ECHAURIA, P.; BATISTA-DÍAZAY, N.; PASCUAL-HERNÁNDEZA, Á. Small-colony variants of *Staphylococcus aureus*: Usefulness of various test for diagnosis and susceptibility study. **Enferm Infecc Microbiol Clin**, v.32, n.2, p.96-98, 2014.

DELLON, E. P.; DONALDSON, S. H.; JOHNSON, R.; DAVIS, S. D. Safety and tolerability of inhaled hypertonic saline in young children with cystic fibrosis. **Pediatr Pulmonol**, v.43, n.11, p.1100-1106, 2008.

EDWARDS, A. M. Phenotype Switching Is a Natural Consequence of *Staphylococcus aureus* Replication. **J Bacteriol**, v.194, n.19, p.5404-5412, 2012.

ELKAMMOSHI, A. M.; GHASEMZADEH-MOGHADDAM, H.; NORDIN, S. A.; TAIB, N. M.; SUBBIAH, S. K.; NEELA, V. *et al.* A Low Prevalence of Inducible Macrolide, Lincosamide, and Streptogramin B Resistance Phenotype among Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Isolated from Malaysian Patients and Healthy Individuals. **Jundishapur J Microbiol**. v.9, n.10, 2016, e37148.

ENDIMIANI, A.; BLACKFORD, M.; DASENBROOK, E. C.; REED, M. D.; BAJAKSOUSZIAN, S.; HUJER, A. M. *et al.* Emergence of Linezolid-Resistant *Staphylococcus aureus* after Prolonged Treatment of Cystic Fibrosis Patients in Cleveland, Ohio. **Antimicrob Agents Chemother**, v.55, n.44, p.1684-1692, 2011.

FUGÈRE, A.; SÉGUIN, D. L.; MITCHELL, G.; DÉZIE, E.; DEKIMPE, V.; CANTIN, A. M. *et al.* Interspecific Small Molecule Interactions between Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* from Adult Cystic Fibrosis Patients. **PLOS ONE**, v.9, n.1, 2014 e86705. Available from: <http://www.plosone.org>

GARCIA, L. G.; LEMAIRE, S.; KAHL, B. C.; BECKER, K.; PROCTOR, R. A.; DENIS, O. *et al.* Antibiotic activity against small-colony variants of *Staphylococcus aureus*: review of in vitro, animal and clinical data. **J Antimicrob Chemother**, v.68, p.1455–1464, 2013.

GARCIA, L. G.; GONZALES, R. G.; TORRES, A. R.; ALBOR, A. R. R.; SCHETTINO, P. M. S. *Staphylococcus aureus* small colony variants in diabetic foot infections. Citation: **Diabetic Foot & Ankle** 2015, 6: 26431 - <http://dx.doi.org/10.3402/dfa.v6.26431>.

GHANBARI, F.; GHAJAVAND, H.; HAVAEI, R.; JAMI, M. S.; KHADEMI, F.; LEILA HEYDARI, L. *et al.* Distribution of *erm* genes among *Staphylococcus aureus* isolates with inducible resistance to clindamycin in Isfahan, Iran. **Adv Biomed Res**, v.5, n.62, 2016.

GILLIGAN, P. H.; GAGE, P. A.; WELCH, D. F.; MUSZYNSKI, R. W.; Prevalence of Thymidine-Dependent *Staphylococcus aureus* in Patients with Cystic Fibrosis. **J Clin Microbiol**, v.25, n.7, p.1258-1261, 1987.

GILLIGAN, P. H.; KISKA, D. L.; APPLEMAN, M. D. **Cumitech 43, Cystic Fibrosis Microbiology**. Washington, DC: ASM Press, 2006.

GILLIGAN, P. Respiratory Cultures from Cystic Fibrosis Patients. In: ISENBERG, H. D. (Ed.). **Clinical Microbiology Procedures Handbook**. Washington, DC: ASM Press, 2010. p.3.11.3.1-3.11.3.9.

GREEN, N.; BURNS, J. L.; MAYER-HAMBLET, N.; KLOSTER, M.; LANDS, L. C.; ANSTEAD, M. Lack of Association of Small-Colony-Variant *Staphylococcus aureus* Strains with Long-Term Use of Azithromycin in Patients with Cystic Fibrosis. **J Clin Microbiol**, v.49, n.7, p.2772-2773, 2011.

GRUPO BRASILEIRO DE ESTUDOS DE FIBROSE CÍSTICA. **Registro Brasileiro de Fibrose Cística**. Relatório Anual de 2014. Disponível em www.portalgbefc.org.br

HILMI, D.; PARCINA, M.; BODE, K.; OSTROP, J.; SCHUETT, S.; HEEG, K. *et al.* Functional variation reflects intra-strain diversity of *Staphylococcus aureus* small colony variants in the host-pathogen interaction. **Int J Med Microbiol**, v.303, p.61-69, 2013.

HO, S. A.; BALL, R.; MORRISON, L. J.; BROWNLEE, K. G.; CONWAY, S. P. Clinical value of obtaining sputum and cough swab samples following inhaled hypertonic saline in children with cystic fibrosis. **Pediatr Pulmonol**, v.38, n.1, p.82-87, 2004.

HOFFMAN, L. R.; DÉZIEL, E.; D'ARGENIO, D. A.; LÉPINE, F.; EMERSON, J.; MCNAMARA, S. *et al.* Selection for *Staphylococcus aureus* small-colony variants due to growth in the presence of *Pseudomonas aeruginosa*. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.103, n.52, p.19890-19895, 2006.

HORIUCHI, K.; MATSUMOTO, T.; OTA, Y.; KASUGA, E.; NEGISHI, T.; YAGUCHI, T. *et al.* Addition of thymidine to culture media for accurate examination of thymidine-dependent small-colony variants of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a pilot study. **J Microbiol Methods**, v.110, p.40–44, 2015.

HOTTERBEEKX, A.; KUMAR-SINGH, S.; GOOSSENS, H.; MALHOTRA-KUMAR, S. *In vivo* and *In vitro* Interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus* spp. **Front Cell. Infect. Microbiol**, v.7, n.106, 2017.

INOUE, F. M. Infecções da corrente sanguínea por *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina no Hospital São Paulo (2002-2005): fatores de risco e diversidade genética. Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina para obtenção do Título de Mestre em Ciências. 2008

JORGENSEN, J. H.; PFALLER, M. A.; CARROLL, K. C.; FUNKE, G.; LANDRY, M. L.; RICHTER, S. S. *et al.* **Manual of Clinical Microbiology**. 11 ed, ASM press, Washington D.C., 2015.

JUNGE, S.; GORLICH, D.; REIJER, M.; WIEDEMANN, B.; TUMMLER, B.; ELLEMUNTER, H. *et al.* Factors Associated with Worse Lung Function in Cystic Fibrosis Patients with Persistent *Staphylococcus aureus*. **PLoS ONE** 11(11):2016 e0166220. doi:10.1371/journal.pone.0166220.

KABRA, S. K.; ALOK, A.; KAPIL, A.; AGGARWAL, G.; KABRA, M.; LODHA, R.; PANDEY, R. M.; SRIDEVI, K.; MATHEWS, J. Can throat swab after physiotherapy replace sputum for identification of microbial pathogens in children with cystic fibrosis? **Indian J Pediatr**, v.71, n.1, p.21-23, 2004.

KAHL, B. C.; Herrmann, M.; Everding, A. S.; Koch, H. G.; Becker, K.; Harms, E. *et al.* Persistent Infection with Small Colony Variant Strains of *Staphylococcus aureus* in Patients with Cystic Fibrosis. **The Journal of Infectious Diseases**, v.177, p.1023-1029, 1998.

KAHL, B. C. DUEBBERS, A.; LUBRITZ, G.; HAEBERLE, J.; KOCH, H. G.; RITZERFELD, BARBARA.; *et al.* Population dynamics of persistent *Staphylococcus*

aureus isolated from the airways of cystic fibrosis patients during a 6-year prospective study. **J. Clin. Microbiol**, v.41, p.4424-4427, 2003.

KAHL, B. C. Small colony variants (SCVs) of *Staphylococcus aureus* - A bacterial survival strategy. **Infect Genet Evol**, v.21, p.515-522, 2014.

KAHL, B. C.; BECKER, K.; LÖFFLER, B. Clinical Significance and Pathogenesis of Staphylococcal Small Colony Variants in Persistent Infections. **Clin Microbiol Rev**, v.29, n.2, p.401-427, 2016.

KRIEGESKORTE, A.; BLOCK, D.; DRESCHER, M.; WINDMÜLLER, N.; MELLMANN, A.; BAUM, C. *et al.* Inactivation of *thyA* in *Staphylococcus aureus* Attenuates Virulence and Has a Strong Impact on Metabolism and Virulence Gene Expression. **M bio**, v.5, n.4, 2014.

KRIEGESKORTE, A.; LORÉ, N. I.; BRAGONZI, A.; RIVA, C.; KELKENBERG, M.; BECKER, K.; *et al.* Thymidine-Dependent *Staphylococcus aureus* Small-Colony Variants Are Induced by Trimethoprim-Sulfamethoxazole (SXT) and Have Increased Fitness during SXT Challenge. **Antimicrob Agents Chemother**, v.59, n.12, p.7265-72, 2015.

LENHARD, J. R.; VON EIFF, C.; HONG, I. S.; HOLDEN, P. N.; BEAR, M. D.; SUEN, A. *et al.* Evolution of *Staphylococcus aureus* under Vancomycin Selective Pressure: the Role of the Small-Colony Variant Phenotype. **Antimicrob Agents Chemother**, v.59, n.2, p.1347-1352, 2015.

MASOULD LANDGRAF, L. ; ZARFEL, G.; KASCHNIGG, T.; FRIEDL, S.; FEIERL, G.; EIBEL, U. W.; *et al.* Analysis and Characterization of *Staphylococcus aureus* Small Colony Variants Isolated From Cystic Fibrosis Patients in Austria. **Curr Microbiol**, v.72, p.606-611, 2016.

MATSUOKA, M.; INOUE, M.; NAKAJIMA, Y.; ENDO, Y. New *erm* Gene in *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates. **Antimicrob Agents Chemother**, v.46, n. 1, p.211-215, 2002.

MCDUGAL, L. K.; FOSHEIM, G. E.; NICHOLSON, A.; BULENS, S. N.; LIMBAGO, B. M.; SHEARER, J. E. S. Emergence of Resistance among USA300 Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates Causing Invasive Disease in the United States. **Antimicrob Agents Chemother**, v.54, n.9, p.3804-3811, 2010.

MELTER, O.; RADOJEVIC, B. Small Colony Variants of *Staphylococcus aureus*-review. **Folia Microbiol**, v.55, n.6, p.548-558, 2010.

MITCHELL, G.; FUGÈRE, A.; GAUDREAU, K. P.; BROUILLETTE, E.; FROST, E. H.; CANTIN, A. M.; MALOUIN, F. SigB Is a Dominant Regulator of Virulence in *Staphylococcus aureus* Small-Colony Variants. **PLOS ONE**, v.8, n.5, 2013.

MORELLI, P.; ALESSANDRI, A.; MANNO, G.; MARCHESE, A.; BANDETTINI, R.; BASSI, M. *et al.* Characterization of *Staphylococcus aureus* small colony variant strains isolated from Italian patients attending a regional cystic fibrosis care centre. **New Microbiol**, v.38, p.235-243, 2015.

NIELSEN, X. C.; NIELSEN, F.T.; KURTZHALS, J. A. L.; MOSER, C.; BOYE, K.; CHRISTENSEN, J. J. *et al.* Management of recurrent pacemaker-related bacteraemia with small colony variant *Staphylococcus aureus* in a haemodialysis patient. **BMJ** . Published online 2009 Aug 20.

NORVILLE, P. J. Small colony variants in *Staphylococcus aureus* and other species: antibiotic selection, antimicrobial susceptibility, and biofilm formation. Thesis presented for the Degree of Philosophiae Doctor by. Cardiff School of Biosciences Cardiff University. 2011 Sep.

NOTO, M. J.; BURNS, W. J.; BEAVERS, W. N.; SKAAR, E. P. Mechanisms of pyocyanin toxicity and genetic determinants of resistance in *Staphylococcus aureus*. **J. Bacteriol**, disponível on line 12 Jun 2017. doi: 10.1128/JB.00221-17

OLIVEIRA, D. C.; LENCASTRE, H. Multiplex PCR Strategy for Rapid Identification of Structural Types and Variants of the *mec* Element in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.46, n.7, p.2155–2161, 2002.

OTA, Y.; MATSUMOTO, T.; Sugano, M.; HONDA, T.; Identification of Clinical Thymidine-Dependent Small-Colony Variants of *Staphylococcus aureus* by Using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. **Rincho Byori**, v.63, n. 6, p.683-687, 2015.

PAKASTICALI N.; KAYA G.; SENEL U.; KIPRITCI O.; TAMAY Z.; GULER N.; *et al.* Prevalence, antibiotic and pulsed-field gel electrophoresis patterns of

Staphylococcus aureus small-colony variants in cystic fibrosis patients. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**, v.47, n.3, p.475-484, 2016.

PHAFF S. J.; TIDDENS H. A.; VERBRUGH H. A.; *et al.* Macrolide resistance of *Staphylococcus aureus* and Haemophilus species associated with long-term azithromycin use in cystic fibrosis. **J Antimicrob Chemother**, v.57, p.741-746, 2006.

PRECIT, M. R.; WOLTER, D. J.; GRIFFITH, A.; EMERSON, J.; BURNS, J. L.; HOFFMAN, L. R. Optimized *In Vitro* Antibiotic Susceptibility Testing Method for Small-Colony Variant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.60, n.3, p.1725-1735, 2016.

PROCTOR, R. A.; VON EIFF, C.; KAHL, B. C.; BECKER, K.; MCNAMARA, P.; HERRMANN, M.; PETERS, G. Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. **Nat Rev Microbiol**, v.4, p.295-305, 2006.

PROCTOR R. A.; KRIEGESKORTE A.; KAHL B. C.; BECKER K.; LÖFFLER B.; PETERS G. *Staphylococcus aureus* Small colony variants (SCVs): A Road map for the metabolic pathways involved in persistent infections. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v.4, 2014.

RAMSEY, B. W.; WENTZ, K. R.; SMITH, A. L.; RICHARDSON, M.; WILLIAMS WARREN, J.; HEDGES, D. L.; *et al.* Predictive value of oropharyngeal cultures for identifying lower airway bacteria in cystic fibrosis patients. **Am Rev Respir Dis**, v.144, n.2, p.331-337, 1991.

ROMMENS, J. M.; IANNUZZI, M. C.; KEREM, B. S.; DRUMM, M. L.; MELMER, G.; DEAN, M. *et al.* Identification of Cystic Fibrosis Gene: Chromosome Walking and Jumping. **Science**, v.245, p.1059-1065, 1989.

SCHNEIDER, M.; MÜHLEMANN, K.; DROZ, S.; COUZINET, S.; CASALTA, C.; ZIMMERLI, S. Clinical Characteristics Associated with Isolation of Small-Colony Variants of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* from Respiratory Secretions of Patients with Cystic Fibrosis. **J Clin Microbiol**, v.46, n.5, p.1832-1834, 2008.

- SEIDLER, D.; GRIFFIN, M.; NYMON, A.; KOEPPEN, K.; ASHARE, A. Throat Swabs and Sputum Culture as Predictors of *P. aeruginosa* or *S. aureus* Lung Colonization in Adult Cystic Fibrosis Patients. **PLoS ONE**, v.11, n.10, 2016. e0164232. doi:10.1371/journal.pone.0164232.
- SINGH, V. K.; VAISH, M.; JOHANSSON, T. R.; BAUM, K. R.; RING, R. R.; SINGH, S. *et al.* Significance of Four Methionine Sulfoxide Reductases in *Staphylococcus aureus*. **PLOS ONE**, 2015.
- SINHA, B.; FRAUNHOLZ, M. *Staphylococcus aureus* host cell invasion and post-invasion events. **Internat J Med Microbiol**, v.300, n.2-3, p.170-175, 2010.
- SOUZA, H. A. P. H. M.; NOGUEIRA, K. S.; MATOS, A. P.; VIEIRA, R. P.; RIEDI, C. A.; ROSÁRIO, N. A. *et al.* Early microbial colonization of cystic fibrosis patients identified by neonatal screening with emphasis on *Staphylococcus aureus*. **J Pediatr (Rio J)**, v.82, p. 377-382, 2006.
- SOUZA, H. A. P. H. M. S. **Detecção precoce e monitoração da colonização por *Pseudomonas aeruginosa* em crianças com fibrose cística.** Tese (Doutorado em Medicina Interna e Ciências da Saúde) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.
- SOUZA, D. C.; COGO, L. L.; ROSÁRIO, N. A. Colônias variantes pequenas de *Staphylococcus aureus*: um novo alvo em Fibrose Cística. **Rev Panam Infectol**, v.18, n.1, p. 39-45, 2016.
- SUBBARAO, P.; BALKOVEC, S.; SOLOMON, M.; RATJEN, F. Pilot study of safety and tolerability of inhaled hypertonic saline in infants with cystic fibrosis. **Pediatr Pulmonol**, v.42, n.5, p.471-476, 2007.
- SWINGLE, E. L. Studies on small colony variants of *Staphylococcus aureus*. **J. Bacteriol.** v.29, n.5, p.467-489, 1935.
- TAKEUCHI, F.; WATANABE, S.; BABA, T.; YUZAWA, H.; ITO, T.; MORIMOTO, Y. *et al.* Whole-genome sequencing of *Staphylococcus haemolyticus* uncovers the extreme plasticity of its genome and the evolution of human-colonizing staphylococcal species. **J Bacteriol**, v.187, n.21, p.7292-7308, 2005.

TUBBY, S.; WILSON, M.; WRIGHT, J. A.; ZHANG, P.; NAIR, S. P. *Staphylococcus aureus* small colony variants are susceptible to light activated antimicrobial agents. **BMC Microbiol**, v.13, p.201-218, 2013.

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

VERGISON, A.; DENIS, O.; DEPLANO, A.; CASIMIR, G.; CLAEYS, G.; DEBAETS, F. National survey of molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* colonization in Belgian cystic fibrosis patients. **J Antimicrob Chemother**, v.59, p.893-899, 2007.

WERTH, N.; BEERLAGE, C.; ROSENBERGER, C.; YAZDI, A. S.; EDELMANN, M.; AMR, A. *et al.* Activation of hypoxia inducible factor 1 is a general phenomenon in infections with human pathogens. **PLoS One**, v.5, n.7, 2010.

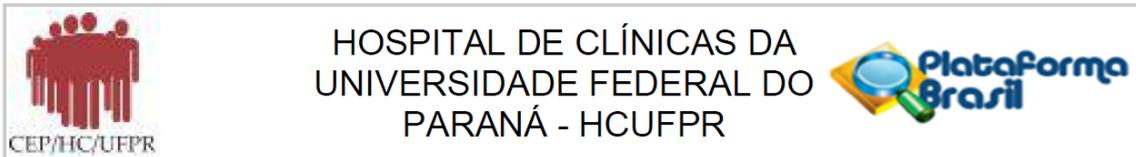
WOLTER, D. J.; EMERSON, J. C.; MCNAMARA, S.; BUCCAT, A. M.; QIN, X.; COCHRANE, E. *et al.* *Staphylococcus aureus* small-colony variants are independently associated with worse lung disease in children with cystic fibrosis. **Clin Infect Dis**, v.57, p.384-391, 2013.

YAGCI, S.; HASCELİK, G.; DOGRU, D.; OZCELİK, U.; SENER, B. Prevalence and genetic diversity of *Staphylococcus aureus* small-colony variants in cystic fibrosis patients. **Clin Microbiol Infect**, v.19, n.1, p.77-84, 2013.

ZAMPOLI, M.; PILLAY, K.; CARRARA, H.; ZAR, H. J.; MORROW, B. Microbiological yield from induced sputum compared to oropharyngeal swab in young children with cystic fibrosis. **Journal of cystic fibrosis: official journal of the European Cystic Fibrosis Society**. 2016.

ANEXOS

ANEXO 1
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: IMPACTO MICROBIOLÓGICO DA DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE COLÔNIAS PEQUENAS VARIANTES DE *Staphylococcus aureus* EM AMOSTRAS RESPIRATÓRIAS DE PACIENTES COM FIBROSE CÍSTICA.

Pesquisador: Dilair Camargo de Souza

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 45063115.9.0000.0096

Instituição Proponente: MATERNIDADE VICTOR FERREIRA DO AMARAL

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.145.671

Data da Relatoria: 22/06/2015

Apresentação do Projeto:

O projeto apresentado trata de dissertação de mestrado da aluna Dilair Camargo de Souza sob orientação do Prof. Dr. Nelson Rosário e outros colaboradores.

Foi resubmetido à Plataforma Brasil a fim de corrigir pendências e inserir documentos.

Staphylococcus aureus, costuma ser encontrado como o agente envolvido nas primeiras infecções pulmonares de pacientes com Fibrose Cística (FC). Tem se observado que em pacientes com FC colonizados por esta bactéria, as colônias variantes pequenas (SCVs) de *S. aureus* estão sendo isoladas com maior frequência, e que estão relacionadas com a persistência e recorrência destas infecções. O termo SCVs é apenas descritivo com muitas condições causando a indução e a seleção deste tipo fenotípico, como o uso de antibioticoterapia e a localização intracelular em células eucarióticas. O isolamento e identificação de SCVs denominadas auxotróficas é um desafio para os laboratórios de microbiologia clínica, porque este fenótipo se constitui de uma sub população de bactérias de crescimento lento de colônias pequenas, devido a mutações nutricionais que geram a dependência de hemina, menadiona ou timidina. As implicações clínicas de SCVs e seu difícil diagnóstico microbiológico fazem com que seja imprescindível conhecer as características de crescimento das mesmas, assim como, os métodos para seu cultivo, identificação e estudo da sensibilidade antimicrobiana. Essa dificuldade pode levar a uma subestimação de diagnóstico e

Endereço: Rua Gal. Carneiro, 181

Bairro: Alto da Glória

CEP: 80.060-900

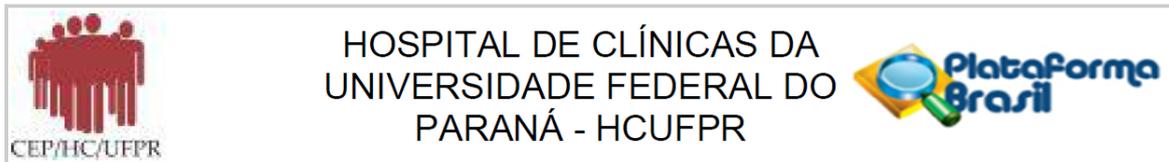
UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-1041

Fax: (41)3360-1041

E-mail: cep@hc.ufpr.br



Continuação do Parecer: 1.145.671

falhas, portanto terapêuticas no contexto clínico. Assim como, sua prevalência pode ser subestimada em amostras clínicas. É necessária a comunicação ao médico da detecção de *S. aureus* SCVs na população com FC, esta informação pode ter um impacto sobre a decisão de tratamento com antibióticos, uma vez que SCVs tendem a resistir à morte intracelular e são mais resistentes aos antibióticos. Neste trabalho serão analisadas as amostras respiratórias de pacientes com FC, dos quais se isolar *S. aureus*, identificando as colônias suspeitas de SCVs, através da utilização de substratos que determinem o seu tipo de dependência (hemina, timidina ou menadiona). Das amostras confirmadas como SCVs fenotipicamente serão realizadas técnicas moleculares para a confirmação da espécie e dos genes que estão envolvidos nesta mutação. Serão também realizadas técnicas fenotípicas e moleculares para a detecção dos mecanismos de resistência aos antimicrobianos.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar as técnicas de diagnóstico para a detecção das colônias pequenas variantes de *S. aureus*, (denominadas internacionalmente de SCVs, do inglês Small Colony Variants) em infecções pulmonares de pacientes com Fibrose Cística, assim como o melhor método para a detecção da suscetibilidade deste micro-organismo aos agentes antimicrobianos.

A coleta de dados clínicos será obtida através dos prontuários dos pacientes, e os resultados de laboratório serão obtidos das requisições de exames, onde se encontra relatado os procedimentos de identificação da bactéria.

Objetivos específicos

- Identificar através do uso de substratos nutricionais, quais as mutações genéticas presentes que estão determinando o surgimento de *S. aureus* com o fenótipo Small Colony Variants (SCVs), nos pacientes com Fibrose Cística atendidos no Hospital de Clínicas de Curitiba.
- Pesquisar através da Reação em Cadeia da Polimerase, quais genes estão relacionados com o surgimento do fenótipo Small Colony Variants (SCVs) na amostra em estudo.
- Determinar o perfil de susceptibilidade, pelas metodologias de disco difusão em Agar Mueller Hinton e pela microdiluição em caldo.
- Avaliar através da Reação em Cadeia da Polimerase, quais genes estão envolvidos na resistência a antibióticos nas cepas de *S. aureus* normal e com o fenótipo Small Colony Variants (SCVs) incluídas no estudo.
- Avaliar através da técnica de Eletroforese de Campo Pulsante (PFGE), se o fenótipo Small Colony Variants.

Endereço: Rua Gal. Carneiro, 181

Bairro: Alto da Glória

CEP: 80.060-900

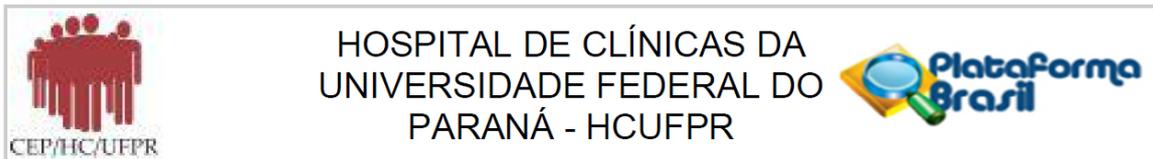
UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-1041

Fax: (41)3360-1041

E-mail: cep@hc.ufpr.br



Continuação do Parecer: 1.145.671

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Este estudo não apresentará riscos para o paciente.

Benefícios:

O isolamento do fenótipo SCVs de Staphylococcus aureus, vai propiciar um melhor direcionamento para o tratamento de pacientes com fibrose cística.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um estudo observacional de corte transversal.

Será realizada uma revisão das informações contidas no banco de dados do SIH e prontuários dos pacientes.

A detecção de SCVs de S.aureus nas amostras respiratórias de pacientes com FC é de grande importância, uma vez que este fenótipo está associado com infecções de difícil tratamento, devidas as suas características de se manter dentro das células hospedeiras e de formar biofilme, tornando-se resistentes à ação dos antimicrobianos e a defesa do hospedeiro.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os Termos de apresentação obrigatória foram apresentados.

Recomendações:

É obrigatório trazer ao CEP/HC uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido que foi aprovado, para assinatura e rubrica. Após, xerocar este TCLE em duas vias, uma ficará com o pesquisador e uma para o participante da pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Todas as adequações solicitadas foram contempladas e os documentos pendentes inseridos de forma adequada.

Situação do Parecer:

Aprovado

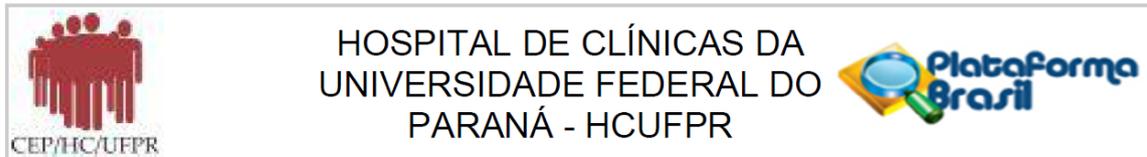
Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do HC-UFPR, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/2012 e na Norma Operacional Nº 001/2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação do projeto conforme proposto para início da Pesquisa. Solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios semestrais sobre o andamento da

Endereço: Rua Gal. Carneiro, 181
Bairro: Alto da Glória **CEP:** 80.060-900
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3360-1041 **Fax:** (41)3360-1041 **E-mail:** cep@hc.ufpr.br



Continuação do Parecer: 1.145.671

pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos. Manter os documentos da pesquisa arquivado.

É dever do CEP acompanhar o desenvolvimento dos projetos, por meio de relatórios semestrais dos pesquisadores e de outras estratégias de monitoramento, de acordo com o risco inerente à pesquisa.

CURITIBA, 10 de Julho de 2015

Assinado por:
Renato Tambara Filho
(Coordenador)

Endereço: Rua Gal. Carneiro, 181
Bairro: Alto da Glória **CEP:** 80.060-900
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3360-1041 **Fax:** (41)3360-1041 **E-mail:** cep@hc.ufpr.br

ANEXO 2

PROTOCOLO PARA REALIZAÇÃO DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) PARA PESQUISA DE GENES DE IDENTIFICAÇÃO E RESISTÊNCIA

PROTOCOLO PARA REALIZAÇÃO DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) PARA PESQUISA DE GENES DE IDENTIFICAÇÃO E RESISTÊNCIA

Preparo do DNA

Para a PCR utilizar colônias de micro-organismos com crescimento em placas de ágar não seletivo incubados por 24 a 48 horas a 36,5-37°C;

Distribuir 500 µl de Chelex 10% estéril em tubos de 1,5 ml e fazer uma suspensão bacteriana turva de cada isolado;

Ferver os tubos em termobloco por 30 minutos a 95° C;

Centrifugá-los por 5 minutos em microcentrífuga a 14.000 rpm;

Remover uma alíquota do sobrenadante (que contém o DNA) e estocar a temperatura de -20°C até o uso.

Preparo dos iniciadores

1- Dissolver os iniciadores (*primers*) (obtidos liofilizados) em água para PCR até a concentração final de 50 nmol/µL;

2- Preparar a mistura dos iniciadores ("*primer mix*"), diluindo os iniciadores *sense* e *antisense* de cada reação (gene único) na proporção de 5 µL de cada iniciador para 100 µL da mistura (concentração final 5 nmol/µL);

3- Estocar os *primers* diluídos em freezer a -20°C. Para a utilização aguardar o descongelamento e após, manter as soluções em banho de gelo;

4- Numerar os tubos de reação correspondentes às amostras a serem testadas, um controle positivo, um controle negativo e um tubo branco (que conterá todos os reagentes, exceto o DNA alvo);

5- Preparar a Mistura de Reação de PCR em um microtubo de 1,5 ml, adicionando os reagentes na ordem descrita no Quadro 4;

- 6- Homogeneizar bem em vortex e pulsar em microcentrífuga;
- 7- Distribuir 23 μ L da mistura de PCR a cada tubo de reação de 200 μ l, previamente numerados;
- 8- Levar os tubos para a sala 2.

QUADRO 4 - REATIVOS USADOS NO PREPARO DA MISTURA DE PCR PARA 16 REAÇÕES

Volume	400 μ l
Nº de reações	16
1. Água para PCR (Sigma, Estados Unidos)	332 μ l
2. Tampão da Taq DNA pol 10X (Invitrogen, Carlsbad, USA)	10 μ l
3. MgCl ₂ (50mM) (Invitrogen, Carlsbad, USA)	16 μ l
4. dNTPs (10mM) (Invitrogen, Carlsbad, USA)	8 μ l
5. Mistura de iniciadores (Prodimol, Brasil)	16 μ l
6. TAQ DNA POLIMERASE (Invitrogen, Carlsbad, USA)	2 μ l

Fonte: O autor (2017)

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

- 1- Adicionar 2 μ L da amostra (DNA alvo armazenado a 4°C) ao tubo de reação contendo 23 μ L da mistura de PCR (volume final da reação 25 μ L);
- 2- Homogeneizar bem em vortex e pulsar em microcentrífuga;
- 3- Fechar bem os tubos e levá-los para a sala 3;
- 4- Ligar o termociclador e conferir o programa a ser utilizado (selecionar o programa de acordo com a reação a ser realizada);
- 5- Pressionar a tecla *start* e deixar a reação prosseguir;

6- Depois de remover os tubos do termociclador, os produtos de PCR devem ser analisados imediatamente em gel de agarose ou serem estocados a 4°C.

Condições de corrida

A pesquisa dos genes *ermA*, *ermB* e *ermC* foram realizadas usando as seguintes condições de amplificação: desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos; 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 52°C por 1 minuto para os genes *ermA* e *ermB*, 47°C para o *ermC*, e 72°C por 1 minuto e 30 segundos; e uma extensão final a 72°C por 10 minutos.

A pesquisa dos genes *nuc*, *mecA*, *msrA* e *msrB* foi realizada usando as seguintes condições de amplificação: desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos; 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 52°C por 30 segundos, e 72°C por 30 segundos; e uma extensão final a 72°C por 10 minutos.

Análise dos produtos

- 1- Preparar gel de agarose a 1% em tampão TBE a 1X (adequado para análise de produtos de PCR que apresentam tamanho menor que 1Kb);
- 2- Remover uma alíquota do produto de PCR de 10 µl de cada amostra;
- 3- Misturar 10 µl de *Stop mix* em 2µl de 50mM EDTA pH8, 25% Ficoll, 0,25% azul de bromofenol a cada amostra (fazer isso sobre um pedaço de parafilme);
- 4- Carregar o gel com 12 µl de cada amostra;
- 5- Incluir 10 µl de marcador de PM linear (2 µl de 123bp ladder ou 2 µl de 100bp ladder (ou 123 bp) misturados);
- 6- Proceder à eletroforese a 110 V por aproximadamente 1 hora;
- 7- Observar em transiluminador de UV e fotografar.

QUADRO 5 – OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIALIZADORES USADOS NO ESTUDO

Gene	Inicializadores	pb	Referência/numero no GenBank
<i>ermA</i>	F 5'-TCT AAA AAG CAT GTA AAA GAA-3' R 5'-CTT CGA TAG TTT ATT AAT ATT AGT-3'	645	McDougal, <i>et al.</i> (2010)
<i>ermB</i>	F 5'-GAG TGA AAA GGT ACT CAA CCA AAT AA-3' R 5'-TTG GTG AAT TAA AGT GAC ACG AA-3'	208	Hilmi, <i>et al.</i> (2013) U35228
<i>ermC</i>	F 5'-TCA AAA CAT AAT ATA GAT AAA-3' R 5'-GCT AAT ATT GTT TAA ATC GTC AAT-3'	642	Chen, <i>et al.</i> (2007) M19652
<i>msrA</i>	F 5'-TAT AGCG CTC GTA GGT GCA A-3' R 5'-GTT CTT TCC CCA CCA CTC AA-3'	270	Hilmi, <i>et al.</i> (2013) X52085
<i>msrB</i>	F 5'-TGT GGA TGG CCT AGC TTT TC-3' R 5'-TCG CCA TAA CCC AAT TCT TC-3'	230	Hilmi, <i>et al.</i> (2013) NC_009641
<i>mecA</i>	F 5'-TCC AGA TTA CAA CTT CAC CAG G-3' R 5'-CCA CTT CAT ATC TTG TAA CG-3'	162	Oliveira (2002) Y00688
<i>Nuc</i>	F 5'-GCC ACG TCC ATA TTT ATC AG-3' R 5'-TAT GGT CCT GAA GCA AGT G-3'	117	Inoue (2008) NC_002952

Fonte: A autora (2017)

ANEXO 3

MEIO DE Cloreto de Sódio (NaCl 7,5%)

Nome: Meio de Cloreto de sódio (NaCl 7,5%)**Fórmula em g/L**

Tryptic Soy Broth	30 g
Ágar	17 g
Cloreto de Sódio	75 g
Água destilada	1000 mL

pH final $7,0 \pm 0,2$ a 25°C

Preparo

Misturar todos os ingredientes e aquecer até a fervura para completa dissolução. Distribuir em tubos de vidro com rosca. Autoclavar a 121°C , durante 20 minutos. Após retirar da autoclave, manter o tubo inclinado até solidificar. Conservar a 4°C .

Controle de Qualidade

Controle positivo - *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Controle negativo – *Escherichia coli* ATCC 25922