

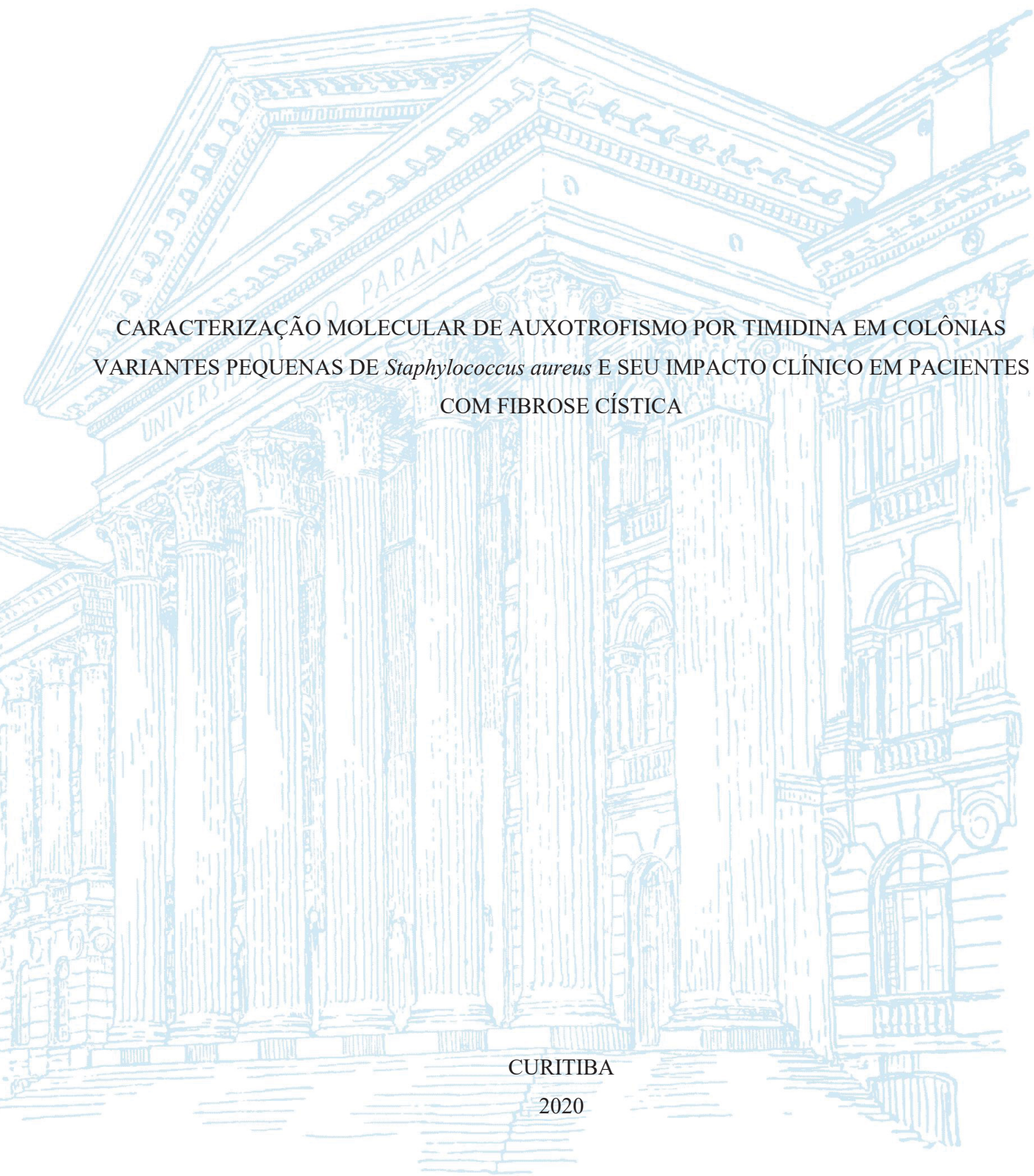
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DILAIR CAMARGO DE SOUZA

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE AUXOTROFISMO POR TIMIDINA EM COLÔNIAS
VARIANTES PEQUENAS DE *Staphylococcus aureus* E SEU IMPACTO CLÍNICO EM PACIENTES
COM FIBROSE CÍSTICA

CURITIBA

2020



DILAIR CAMARGO DE SOUZA

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE AUXOTROFISMO POR TIMIDINA EM COLÔNIAS
VARIANTES PEQUENAS DE *Staphylococcus aureus* E SEU IMPACTO CLÍNICO EM PACIENTES
COM FIBROSE CÍSTICA

Tese apresentada ao curso de Pós-graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Interna e Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Nelson Augusto Rosario Filho
Coorientadoras: Dra. Laura Lúcia Cogo
Profa. Dra. Jussara Kasuko Palmeiro

CURITIBA

2020

S729 Souza, Dilair Camargo de
Caracterização molecular de auxotrofismo por timidina em colônias variantes pequenas de *staphylococcus aureus* e seu impacto clínico em pacientes com fibrose cística [recurso eletrônico] / Dilair Camargo de Souza. - Curitiba, 2020.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde, 2020.

Orientador: Prof. Dr. Nelson Augusto Rosario Filho.

Coorientadoras: Profa. Dra. Laura Lúcia Cogo

Profa. Dra. Jussara Kasuko Palmeiro

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

NLMC: WI 820

Catálogo na fonte elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da UFPR,
Biblioteca de Ciências da Saúde – SD, com dados fornecidos pela autora.
Bibliotecária: Cristiane Sinimbu Sanchez CRB-9/1848

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MEDICINA INTERNA E CIÊNCIAS DA SAÚDE da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **DILAIR CAMARGO DE SOUZA** intitulada: "**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE AUXOTROFISMO POR TIMIDINA EM COLÔNIAS VARIANTES PEQUENAS DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS E SEU IMPACTO CLÍNICO EM PACIENTES COM FIBROSE CÍSTICA.**", sob orientação do Prof. Dr. NELSON AUGUSTO ROSÁRIO FILHO, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor 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, 26 de Novembro de 2020.

Assinatura Eletrônica
26/11/2020 12:46:31.0

NELSON AUGUSTO ROSÁRIO FILHO
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
26/11/2020 12:30:57.0

CRISTINA LEISE BASTOS MONTEIRO
Avaliador Externo (DPTO CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - UFPR)

Assinatura Eletrônica
27/11/2020 08:59:55.0
CARLOS ANTONIO RIEDI

Avaliador Externo (DEPARTAMENTO DE PEDIATRIA - CHC - UFPR)

Assinatura Eletrônica
30/11/2020 15:05:20.0

LEANDRO REUS RODRIGUES PEREZ
Avaliador Externo (FUNDAÇÃO UNIV. FEDERAL DE CIÊNCIAS
DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE)

Assinatura Eletrônica
26/11/2020 21:08:22.0

KEITE DA SILVA NOGUEIRA
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Esta tese é dedicada a todos os pacientes com Fibrose Cística e seus familiares, assim como, a todos os pesquisadores e profissionais que se dedicam com amor e altruísmo na busca de dias melhores.

AGRADECIMENTOS

Os meus mais sinceros agradecimentos a Deus, a energia criadora do universo que nos impulsiona a cada dia. Aos anjos protetores que nos conduzem por caminhos mais seguros, entre eles os meus pais Gercino e Carolina fontes de imenso e eterno amor.

Aos meus irmãos, os melhores amigos que a vida me deu e aos meus queridos sobrinhos, alguns já adultos me auxiliando nos projetos de vida e os pequenos me trazendo momentos de intensa alegria.

Aos meus orientadores, Dr. Nelson Augusto Rosario Filho, sempre me recebendo com um sorriso e transmitindo o seu saber e a sua segurança. A minha querida amiga Dra Laura Lúcia Cogo, sempre ao meu lado, me incentivando, corrigindo os textos com o “maior carinho”. A Dra Jussara Kasuko Palmeiro, a menina inteligente que vi crescer profissionalmente, hoje professora, fonte de inspiração para futuros profissionais da área da saúde.

Em nome dos coordenadores Dr. Emilton Lima Júnior e Dra. Iara Tabora Messias Reason, e Dr. Renato Mitsunori Nisihara, agradeço a todos os professores, secretário e monitores do Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde, pela dedicação no desenvolvimento científico dos alunos e, portanto, da Universidade Federal do Paraná.

Agradeço a minha segunda família, a família do HC-UFPR, entre estes, destaco Honorina Schmidt a qual considero minha “madrinha” profissional, que no início da minha carreira, em momentos difíceis do estágio muito me incentivou, jamais esquecerei o seu carinho. E por coincidências da vida ao seu genro Dr. Carlos Antonio Riedi, médico extremamente dedicado aos pacientes com Fibrose cística e que muito contribuiu para esta pesquisa. A Dra Keite da Silva Nogueira, sempre atenciosa e com disponibilidade para auxiliar a quem está no caminho do aprendizado, uma verdadeira professora no sentido da palavra. A Dra Marisol Dominguez Muro, responsável pela Unidade de Laboratório de Análises Clínicas, sempre incentivando aos colegas para o desenvolvimento profissional e científico. A Adriane Ceschin Maestri e Ana Paula Oliveira Tomaz, com as quais divido os bons e os não tão bons momentos da vida acadêmica. A Ester Mayumi Ninomiya pela colaboração na correção dos textos em inglês. Aos demais colegas que já trabalharam, representadas aqui pelas Dra Libera Maria Dalla Costa e Dra Helena Homem de Mello de Souza, e a todos que ainda trabalham no laboratório de bacteriologia, sempre dedicados a um serviço de excelência.

Aos demais colegas dos outros setores do laboratório, sempre incentivando com atitudes e palavras.

Aos funcionários do arquivo de prontuários do HC, em especial a Marcia Maria Cotovicz de Mattos, sempre muito atenciosa.

Aos profissionais, Ricardo Rasmussen Petterle pela contribuição com a análise estatística, e Luiza Slaviero pelos trabalhos de design gráfico dos artigos.

Não é possível citar a todos aqui, mas fica a certeza de que:

*“Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós.
Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós”.*

Antoine de Saint-Exupéry.

A percepção do desconhecido é a mais fascinante das experiências. O homem que não tem os olhos abertos para o misterioso passará pela vida sem ver nada.

Albert Einstein

RESUMO

A exacerbação pulmonar é uma das manifestações graves em pacientes com Fibrose Cística (FC) que está relacionada a muitos microorganismos, entre eles *Staphylococcus aureus*. O surgimento de colônias pequenas de *S. aureus* dependente de timidina (TD-SCVs) estáveis e reversíveis está associado às infecções crônicas. Também tem sido relatado que o isolamento de TD-SCVs com outros microorganismos, está relacionado com perda da função pulmonar. Para avaliar as características moleculares de TD-SCVs, assim como as alterações clínicas associadas ao seu isolamento em pacientes com FC, foi realizado um estudo retrospectivo no período de julho de 2013 a julho de 2018. Amostras respiratórias foram coletadas de todos os pacientes atendidos neste período nos ambulatórios de FC do Hospital de Clínicas da UFPR. Os isolados de *S. aureus* foram identificados por métodos microbiológicos convencionais, e as colônias SCVs testados para dependência de menadiona, hemina e timidina. As colônias identificadas como TD-SCVs foram caracterizadas por reação da cadeia de polimerase (PCR) e sequenciamento de DNA para a análise do gene *thyA* e da genotipagem de sequências de múltiplos locos (MLST). Além disso, foram coletados dados clínicos em prontuários de 57 pacientes com FC para avaliação dos mesmos em um estudo de caso controle 1:2. Dos 246 pacientes atendidos em 208 (85%) se isolou *S. aureus*, destes em 23 (11%) foi isolado TD-SCVs, com o fenótipo SCV estável em 18 (78%), e não estáveis em 5 (21,7%). As análises do sequenciamento do gene *thyA* mostraram que os isolados apresentaram diversos tipos de mutações, predominando a mutação por *indels* nos isolados SCV estáveis. Os clones mais encontrados foram ST5 e ST398. Dos 57 pacientes incluídos no estudo de caso-controle, 19 casos (com TD-SCVs) e 38 controles (sem TD-SCVs), 58% eram do gênero masculino e mediana de 11 anos. As análises estatísticas mostraram associações significativas entre o uso de sulfametaxazol-trimetoprim e surgimento de TD-SCVs ($p < 0,001$); internações e isolamento de TD-SCVs ($p = 0,004$); isolamento de TD-SCVs e *S. maltophilia* ($p = 0,03$); isolamento de TD-SCVs e Distúrbio Ventilatório Obstrutivo (DVO) alterado, com Volume Expiratório Forçado em 1 segundo, VEF_1 / L ($p = 0,03$) e $VEF_1\%$ do previsto ($p = 0,05$). O estado nutricional e de função pulmonar mostrou que 18,5% dos pacientes com TD-SCVs tinham baixo peso, e função pulmonar em estado grave em relação a 3% dos pacientes controle. O diagnóstico laboratorial da identificação de TD-SCVs demonstrou grande relevância clínica, uma vez que a presença deste fenótipo está associada com a piora da função pulmonar e estado nutricional, impactando em aumento das hospitalizações e na qualidade de vida dos pacientes com FC.

Palavras chaves: *S. aureus*; TD-SCVs; Fibrose Cística; Função pulmonar

ABSTRACT

Pulmonary exacerbation is one of the serious manifestations in patients with Cystic Fibrosis (CF), which is related to many microorganisms, including *Staphylococcus aureus*. The appearance of small colonies of thymidine dependent *S. aureus* (TD-SCVs) stable and reversible (not stable) is associated with chronic infections. It has also been reported that the isolation of TD-SCVs with other microorganisms is related to loss of lung function. To evaluate the molecular characteristics of TD-SCVs, as well as the clinical changes associated with isolation in CF patients, a retrospective study was carried out from July 2013 to July 2018. Respiratory samples were collected from all patients treated during this period at the outpatient clinics of the Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná. The isolates of *S. aureus* were identified by conventional microbiological methods, and the colonies SCVs tested for dependence on menadione, hemine and thymidine. The colonies identified as TD-SCVs were characterized by molecular biology techniques for the analysis of the *thyA* gene and the genotyping of multi-locus sequences (MLST). In addition, clinical data were collected from the medical records of 57 patients to evaluate them in a 1:2 control case study. Of the 246 patients attended in 208 (85%) patients, *S. aureus* was isolated from a respiratory sample, of these in 23 (11%) TD-SCVs were isolated, with the SCV phenotype stable in 18 (78%), and non-stable (reversible) in 5 (21.7%) patients. Sequencing analyses of the *thyA* gene showed that the isolates presented several types of mutations, predominantly the mutation by indels in stable SCV isolates. The most common clones were ST5 and ST398. Of the 57 patients included in the case-control study, 19 cases (with TD-SCVs) and 38 controls (without TD-SCVs), 58% were male and median 11 years. Statistical analyses showed significant associations between the use of sulfamethazole-trimethoprim (TMP-SMX) and the appearance of TD-SCVs ($p < 0.001$); hospitalizations and isolation of TD-SCVs ($p = 0.004$); isolation of TD-SCVs and *S. maltophilia* ($p = 0.03$); isolation of TD-SCVs and altered Obstructive Ventilatory Disorder (OVD), with Forced Expiratory Volume in 1 second, VEF_1 /L ($p = 0.03$) and $VEF_1\%$ of the predicted ($p = 0.05$). Nutritional status and pulmonary function showed that 18.5% of patients with TD-SCVs had low weight, and pulmonary function was severely in relation to 3.0% of control patients. The identification of TD-SCVs demonstrated clinical relevance, since the presence of this phenotype was associated with worsening lung function and nutritional status, impacting the increase in hospitalizations and interfering with the quality of life of CF patients.

Key words: *S. aureus*; TD-SCVs; Cystic fibrosis; Lung function

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	CLASSES DE MUTAÇÕES DO GENE <i>CFTR</i>	18
FIGURA 2 -	PREVALÊNCIA DOS MICROORGANISMOS POR IDADE EM FC NO BRASIL.....	19
FIGURA 3 -	FORMAÇÃO DO FENÓTIPO SCV.....	22
FIGURA 4 -	MORFOLOGIA COLONIAL DE <i>S. aureus</i> - FENÓTIPO NORMAL E SCV APÓS 24 HORAS DE INCUBAÇÃO.....	24
FIGURA 5 -	MORFOLOGIA CELULAR DE TD-SCVs ATRAVÉS DA COLORAÇÃO DE GRAM.....	25
FIGURA 6 -	MORFOLOGIA CELULAR DE <i>S. aureus</i> ATRAVÉS DA MICROSCOPIA ELETRÔNICA.....	25
FIGURA 7 -	REPRESENTAÇÃO EM DÍMERO (3D) DA PROTEÍNA TIMIDILATO SINTASE.....	26
FIGURA 8 -	EXAME DE ESPIROMETRIA.....	35
FIGURA 9 -	FLUXOGRAMA DA PESQUISA REALIZADA NO MESTRADO E DOUTORADO.....	38
FIGURA 10 -	TÉCNICA DO AUXOTROFISMO EM DISCO IMPREGNADO COM TIMIDINA EM MUELLER HINTON AGAR.....	40

LISTA DE GRÁFICOS, TABELAS E QUADROS

GRÁFICO 1 -	IMC POR IDADE EM MENINOS DOS 2 AOS 19 ANOS (PERCENTIS).....	46
GRÁFICO 2 -	IMC POR IDADE EM MENINAS DOS 2 AOS 19 ANOS (PERCENTIS).....	47
QUADRO 1 -	INTERPRETAÇÃO DO GRAU DE OBSTRUÇÃO COM BASE NO VOLUME EXPIRATÓRIO FORÇADO EM 1 SEGUNDO (VEF ₁).....	36
QUADRO 2 -	REATIVOS USADOS NO PREPARO DA MISTURA DE PCR.....	41
QUADRO 3 -	OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS PARA SEQUÊNCIAS DO GENE <i>thyA</i> E GENES - MLST E TAMANHO DOS PRODUTOS.....	42
QUADRO 4 -	PONTOS DE CORTE DE ESTADO NUTRICIONAL - IMC/I (percentil) e IMC.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABPA	- Aspergilose Broncopulmonar Alérgica
<i>arcC</i>	- Carbamato quinase
<i>aroE</i>	- Chiquimato Desidrogenase
AS	- Agar sangue
ATP	- Adenosina trifosfato
BCSA	- Ágar seletivo para <i>Burkholderia cepacia</i>
BGN-NF	- Bacilo gram negativo não fermentador
BHI	- Brain Heart Infusion (Caldo-infuso de cérebro e coração)
CPT	- Capacidade Pulmonar Total
CRF	- Capacidade Residual Funcional
CVF	- Capacidade Vital Forçada
CC	- Complexo Clonal
CDC	- <i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CEP	- Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos
CHC-UFPR	- Complexo Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná
CFF	- <i>Cystic Fibrosis Foundation</i> (EUA)
CFTR	- Proteína reguladora de condutância transmembrânica
CLSI	- <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
dATP	- desoxiAdenosinaTrifosfatada
ddATP	- didesoxirribonucleotídeo AdenosinaTrifosfatada
dCTP	- desoxiCitidina Trifosfatada
ddCTP	- didesoxirribonucleotídeo Citidina Trifosfatada
ddGTP	- didesoxirribonucleotídeo Guanosina Trifosfatada
dGTP	- desoxiGuanosina Trifosfatada
ddNTP	- didesoxirribonucleotídeo trisfosfatado
dNTP	- desoxirribonucleotídeo trifosfatado
DPOC	- Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
dTMP	- Monofosfato de desoxitimidina
dTTP	- desoxiTimidina Trifosfatada

ddTTP	- didesoxirribonucleotídeo
dUMP	- Monofosfato de desoxiuridina
FC	- Fibrose cística
FEF 25-75%	- Fluxo Expiratório Forçado médio
GEBFC	- Grupo Brasileiro de Estudos de Fibrose Cística
<i>glpF</i>	- Glicerol quinase
<i>gmk</i>	- Guanilato quinase
HQNO	- 4-hidroxi-2-heptilquinolina-N-óxido
IMC	- Índice de Massa Corporal
IRT	- Tripsinogênio imunorreativo
LBA	- Lavado brônquico alveolar
MALDI-TOF	- <i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight</i>
MC	- Ágar MacConkey
MHA	- Ágar Mueller Hinton
MLST	- Tipagem de seqüências de múltiplos locos
MRSA	- <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
MSA	- <i>Mannitol Salt Agar</i> (Ágar manitol salgado)
MSSA	- <i>Staphylococcus aureus</i> sensível à meticilina
NAD	- Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo
<i>nuc</i>	- Gene da Termonuclease
PCR	- Reação em Cadeia da Polimerase
<i>pta</i>	- Fosfato acetiltransferase
SCVs	- <i>Small colony variants</i> (Colônias pequenas variantes)
ST	- Sequence typing
TD-SCVs	- <i>Small colony variants</i> Timidina dependente
<i>tpi</i>	- Triosefosfato isomerase
TSB	- <i>Tryptic Soy Broth</i> (Caldo tríptico de soja)
VEF	- Volume Expiratório Forçado
VEF ₁	- Volume Expiratório Forçado em 1 segundo
VISA	- <i>Staphylococcus aureus</i> Vancomicina Intermediária
VRSA	- <i>Staphylococcus aureus</i> Vancomicina Resistente
VR	- Volume Residual
<i>yqi</i>	- Acetil coenzima A acetiltransferase

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
1.1	JUSTIFICATIVA.....	14
2	OBJETIVOS.....	15
2.1	OBJETIVO GERAL.....	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	16
3.1	FIBROSE CÍSTICA.....	16
3.2	MICROORGANISMOS ASSOCIADOS COM INFECÇÕES EM FIBROSE CÍSTICA	19
3.2.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	20
3.2.1.1	Identificação fenotípica de TD-SCVs.....	24
3.2.1.2	Caracterização genotípica de TD-SCVs.....	26
3.2.1.2.1	Sequenciamento do gene <i>thyA</i>	26
3.2.1.2.2	Genotipagem de sequências de múltiplos locos de <i>S. aureus</i>	27
3.2.2	Bacilos Gram negativos não fermentadores de glicose.....	28
3.2.2.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	29
3.2.2.2	Complexo <i>Burkholderia cepacia</i>	30
3.2.2.3	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	31
3.2.2.4	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	32
3.2.3	<i>Haemophilus influenzae</i>	32
3.2.4	<i>Aspergillus fumigatus</i>	33
3.3	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS PACIENTES COM FIBROSE CÍSTICA.....	33
3.3.1	Função Pulmonar.....	34
3.3.1.1	Avaliação da função pulmonar.....	34
3.3.1.2	Espirometria.....	34
3.3.2	Antropometria.....	36
4	MÉTODOS.....	38
4.1	CARACTERÍSTICAS DO ESTUDO.....	38
4.2	POPULAÇÃO DO ESTUDO.....	39
4.3	IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA E CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DO AUXOTROFISMO.....	39
4.4	CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS TD-SCVs.....	40
4.4.1	Extração do DNA.....	40
4.4.2	Amplificação.....	41
4.4.3	Condições de corrida.....	43

4.4.3.1	Gene <i>thyA</i>	43
4.4.3.2	Genes para MLST.....	43
4.4.4	Sequenciamento Sanger dos isolados de TD-SCVs.....	43
4.4.4.1	Análise dos resultados obtidos no sequenciamento do gene <i>thyA</i>	43
4.4.4.2	Determinação das linhagens de <i>S. aureus</i> TD-SCVs por MLST.....	44
4.5	AVALIAÇÃO DO IMPACTO DA PRESENÇA DE TD-SCVs NA FUNÇÃO PULMONAR.....	44
4.5.1	Avaliação da função pulmonar.....	44
4.5.2	Avaliação dos dados antropométricos.....	45
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	47
4.7	ASPECTOS ÉTICOS.....	48
APÊNDICES		
1 -	PRIMEIRO ARTIGO PUBLICADO: Thymidine – auxotrophic <i>Staphylococcus aureus</i> small colony variant bacteremia in a patient with cystic fibrosis.....	49
2 -	SEGUNDO ARTIGO: Emergence of thymidine-dependent <i>Staphylococcus aureus</i> small colony variants isolated from cystic fibrosis patients in Brazil.....	66
3 -	TERCEIRO ARTIGO: Correlação de TD-SCVs na função pulmonar e estado nutricional de pacientes com Fibrose Cística.....	94
5	CONCLUSÃO.....	114
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	115
REFERÊNCIAS.....		116
ANEXOS		
1 -	PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP.....	127
2 -	FICHA PARA BUSCA DE DADOS DEMOGRÁFICOS E CLÍNICOS.....	129

1 INTRODUÇÃO

A Fibrose Cística (FC) é uma doença considerada multissistêmica, que acomete os sistemas digestório, reprodutivo e respiratório (GBEFC, 2018). A enfermidade é de origem genética, causada por mutações no gene *Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator* (*CFTR*), o qual codifica para canais proteicos que transportam os íons cloreto para o exterior das células (ROMMENS et al., 1989).

Devido à hipertonicidade de íons cloreto no pulmão, ocorre a produção de muco espesso que favorece a colonização e a infecção por diferentes microorganismos. Entre eles as bactérias, sendo reconhecidas como importantes patógenos *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, complexo *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Achromobacter xylosoxidans* (JUNGE et al., 2016; WOLTER et al., 2013; DUPONT et al., 2017).

O patógeno *S. aureus* costuma ser encontrado como o agente envolvido nas primeiras infecções pulmonares de pacientes com FC (BESIER et al., 2007a). Tem se observado que em pacientes com FC colonizados por esta bactéria, as colônias variantes pequenas (do inglês *Small Colony Variants* - SCVs) de *S. aureus* estão sendo isoladas com maior frequência (MELTER; RADOJEVIC, 2010). O termo SCVs refere-se a muitas condições que causam a indução e a seleção deste tipo fenotípico, denominado de auxotrofismo (KAHL et al., 2016).

O isolamento e identificação de SCVs 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, ao que se conhece atualmente, devido a mutações em genes que causam deficiências nutricionais, gerando a dependência dos substratos hemina, menadiona ou timidina (PROCTOR et al., 2006).

Os SCVs deficientes de timidina (TD-SCVs) sofrem mutações no gene *thyA*, gene que codifica a produção da proteína timidilato sintase, que é essencial para a síntese do DNA bacteriano (KRIEGESKORTE et al., 2014). TD-SCVs estão associados ao uso prolongado de sulfametoxazol-trimetoprim, promovendo resistência a este antimicrobiano (KRIEGESKORTE et al., 2015). Em alguns isolados ocorre a reversão do fenótipo SCV para o fenótipo normal, fenômeno que pode estar relacionado com as infecções recidivantes (KITTINGER et al., 2019) e com o difícil tratamento dos SCVs (DODÉMONT et al., 2019).

Os pacientes com FC costumam ser acometidos por exacerbações pulmonares resultantes de infecções por diferentes microorganismos e alguns estudos têm demonstrado

que o fenótipo SCV estaria associado a infecções com consequente piora da função pulmonar (JUNGE et al., 2016; WOLTER et al., 2013). Para determinar a capacidade respiratória, o exame de espirometria é realizado a partir dos 5 anos (ATHANAZIO et al., 2017), tornando-se um teste diagnóstico importante para o controle da doença pulmonar, que é a principal causa de morbidade e mortalidade nesse grupo de indivíduos (HEINZMANN-FILHO et al., 2015).

Outra manifestação clínica apresentada nos pacientes com FC associado com a perda da função pulmonar, é a desnutrição muitas vezes originária da disfunção pancreática. Assim, os pacientes devem ser acompanhados quanto ao estado nutricional pelo monitoramento dos dados antropométricos de peso e altura relacionados à idade e gênero (HAUSCHILD et al., 2018).

1.1 JUSTIFICATIVA

O início da idealização desse trabalho foi devido ao surgimento de colônias pequenas de *S. aureus*, isolados de amostras respiratórias de pacientes com FC em nossa rotina laboratorial. Foi necessária uma extensa pesquisa para descobrirmos de qual micro-organismo se tratava e os meios específicos para identificá-los, não havendo ainda relatos de seu isolamento no Brasil. Considerando também que FC é uma doença de morbidade importante e que ainda apresenta uma alta taxa de mortalidade nos primeiros anos de vida, muitas vezes relacionada às infecções respiratórias, ampliar o conhecimento quanto aos mecanismos do surgimento de TD-SCVs de *S. aureus* e associar sua repercussão sob aspectos clínicos, poderá contribuir na melhora do prognóstico desses pacientes.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar por métodos moleculares a dependência da timidina em colônias variantes pequenas de *S. aureus* (SCVs) isoladas de amostras respiratórias de pacientes com FC, atendidos no ambulatório de Fibrose Cística do Complexo Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, e associar o fenótipo com os valores espirométricos e antropométricos.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar as mutações no gene codificador de timidilato sintase (*thyA*) em isolados de colônias pequenas (SCVs) de *S. aureus*, por sequenciamento de DNA pelo método de Sanger.
- Avaliar a diversidade genética entre *S. aureus* com fenótipo SCV estável por técnica de genotipagem de sequências de múltiplos locos (MLST).
- Correlacionar o isolamento de *S. aureus* SCVs estável e reversível com alterações na função pulmonar pela análise caso-controle 1:2 pareada por gênero e idade.
- Avaliar o isolamento de outros patógenos associados com *S. aureus* SCVs nas amostras respiratórias e sua correlação com a alteração da função pulmonar.
- Determinar a persistência de *S. aureus* SCVs nos pacientes fibrocísticos.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 FIBROSE CÍSTICA

A FC foi reconhecida como uma "doença" em 1938, por Dorothy Andersen (MARQUES, 2011). Estima-se que no mundo 70.000 pessoas sejam afetadas, segundo a associação *Cystic Fibrosis Foundation* (CFF, 2019), e pelo levantamento do Grupo de Estudos Brasileiro de Fibrose Cística, no Brasil 5.000 pessoas têm FC. No Paraná até o ano de 2017 eram 329 indivíduos, com uma estimativa de que um a cada 10.000 nascidos vivos apresente a doença (GEBFC, 2018). Embora a expectativa de vida dos pacientes com FC tenha aumentado para uma mediana de 40 anos, devido ao estabelecimento de centros especializados, com o trabalho multiprofissional de monitoramento constante do paciente, diagnóstico precoce, suporte nutricional, intervenções pulmonares eficazes, e o desenvolvimento de novos tratamentos, a FC ainda é uma doença de alta morbidade e mortalidade (CFF, 2019; LOPES-PACHECO, 2016).

A doença apresenta maior ocorrência na população caucasiana, porém, pode também afetar outras etnias (COUTINHO et al., 2013; GUO et al., 2018). Ela é causada por mutações no gene *Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator* (*CFTR*), localizado no braço longo do cromossoma 7 (ROMMENS et al., 1989), possuindo um peso molecular de 230 kb, composto por 27 éxons, variando de 38 a 724pb que codifica a proteína CFTR (MARSON, 2011). Há mais de 2.000 mutações no gene *CFTR*, classificadas em 7 classes de acordo com a sequência afetada relacionada à tradução e à função da proteína (BOECK, 2020), conforme explicado a seguir e representado na Figura 1.

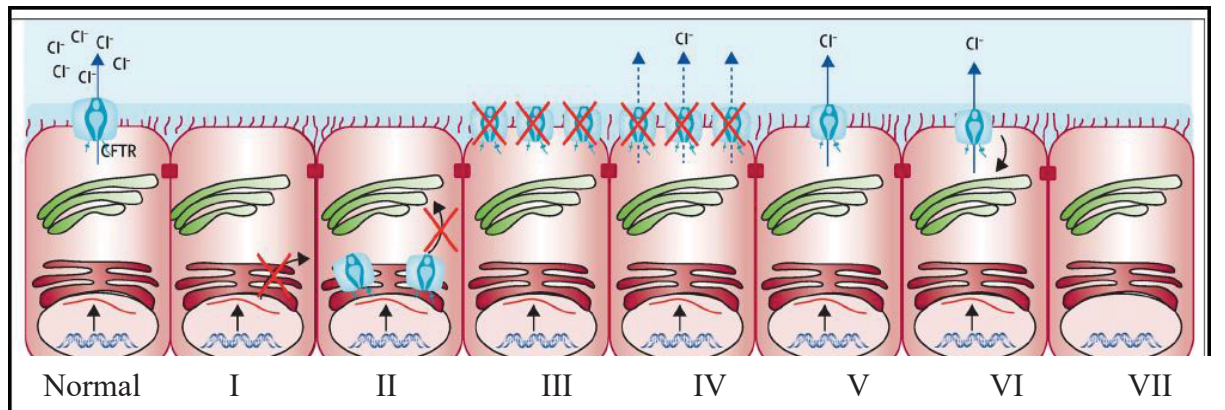
- Mutantes de classe I - não são eficientes na síntese proteica pela presença de códons de parada prematura.
- Mutantes de classe II - o processamento e o deslocamento da proteína até a membrana citoplasmática são defeituosos, sendo a proteína degradada.
- Mutantes de classe III - a proteína CFTR é produzida e atinge a superfície celular, porém os canais são defeituosos, devido à diminuição da ligação e hidrólise do ATP.
- Mutantes de classe IV - as proteínas são menos funcionais, apresentando condutividade reduzida de cloreto, devido às mutações que ocorrem em vários segmentos transmembrana.

- Mutantes de classe V - ocorre a produção da proteína ativa, mas em quantidade reduzida, devido à menor maturação proteica causada pela substituição de aminoácidos. Uma quantidade reduzida de proteína atinge a superfície celular, tendo como consequência a perda do transporte de cloretos.
- Mutantes de classe VI - têm relação com populações de origem asiática, a proteína CFTR é menos estável, sendo removida na membrana plasmática durante a reciclagem e enviada para degradação no lisossomo (MARSON, 2011; LOPES-PACHECO, 2016).
- Mutantes classe VII - grupos com grandes deleções por mudança da matriz de leitura (mutações *frameshift*), impedindo a tradução do gene *CFTR* pelo RNA mensageiro (BOECK, 2020).

Portanto, mutações no gene *CFTR* alteram a produção, a estrutura ou a estabilidade da proteína do canal de íons cloreto situada na membrana luminal das células epiteliais, gerando um desequilíbrio na concentração de Cl^- e Na^+ nas células que produzem secreções no corpo, como muco e suor (SHTEINBERG et al., 2017). A produção de muco espesso se acumula em vários órgãos, como pâncreas, fígado, intestino e pulmões. A secreção respiratória viscosa aumenta a probabilidade de infecções bacterianas graves e constantes, aumentando a inflamação nos pulmões causando um mau prognóstico aos pacientes (GBEFC, 2018).

Embora exista essa classificação, muitas mutações podem apresentar características de diferentes classes, como por exemplo, ΔF508 pertence à classe II, mas apresenta também características das classes III e VI (BOECK, 2020).

A mutação mais comum é a Delta F508, com uma prevalência que varia entre 30-80% nos pacientes com FC. Nessa mutação ocorre a deleção de três nucleotídeos, que resultam na ausência do aminoácido 508 da proteína CFTR, sendo denominada de F508del pela falta da fenilalanina (MARSON et al., 2013; SHTEINBERG et al., 2017).

FIGURA 1 – CLASSES DE MUTAÇÕES DO GENE *CFTR*

Defeitos na Proteína	não sintetiza	bloqueio no processamento	bloqueio na regulação	condutância alterada	síntese reduzida	menos estável	sem mRNA
----------------------	---------------	---------------------------	-----------------------	----------------------	------------------	---------------	----------

Exemplos de mutações	G542X	delF508	G551D	R117H	A455E	rF508del	1717-1G → A
----------------------	-------	---------	-------	-------	-------	----------	-------------

Fonte: Boeck (2020). Adaptado pela autora

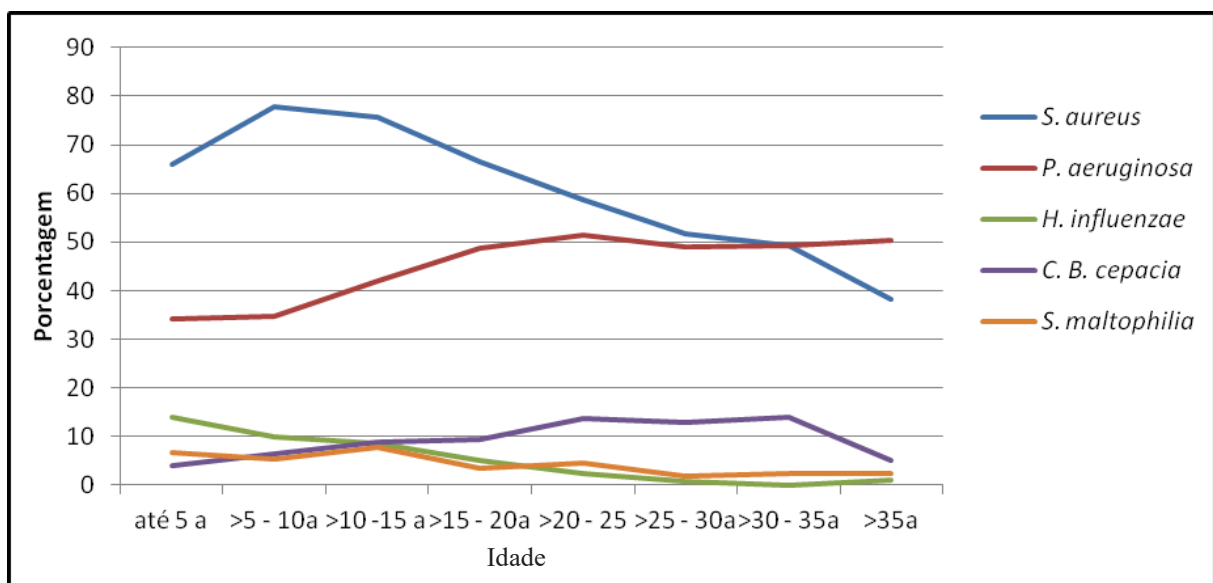
O diagnóstico precoce de FC, antes dos primeiros sintomas da doença auxilia em um melhor desempenho da função pulmonar e nutricional, ao longo da vida do paciente (CFF, 2019). O diagnóstico presuntivo de FC é realizado na triagem neonatal “teste do pezinho”, quando a dosagem do precursor da enzima pancreática no sangue, o tripsinogênio imunoreativo (IRT), está elevada (acima de 70 ng/mL) em um período de até 30 dias do nascimento. É um teste altamente sensível, mas não específico (CROSSLEY, J. R.; ELLIOTT, R. B.; SMITH, P. A., 1979).

O IRT deve ser confirmado pelo teste do suor, através da detecção de duas dosagens alteradas de cloro no suor (em valores \geq a 60 mEq/L). Embora o sequenciamento genético para detecção de mutações no gene *CFTR*, seja considerado padrão ouro para o diagnóstico da FC, não é um procedimento acessível em muitos centros de tratamento, porém se faz necessário quando o teste do suor se apresenta duvidoso (entre 30 a 59mEq/L), ou ainda quando apresenta níveis normais, mas ainda existe a suspeita da doença (PARACCHINI et al., 2012; LUMERTZ et al., 2019).

3.2 MICROORGANISMOS ASSOCIADOS ÀS INFECÇÕES EM PACIENTES COM FIBROSE CÍSTICA

As bactérias *S. aureus* com fenótipo de colônia normal, *P. aeruginosa* e complexo *B. cepacia* são há muito tempo reconhecidas como importantes patógenos relacionados às infecções respiratórias em pacientes com FC. Entretanto, em estudos mais recentes *S. aureus* com fenótipo SCVs, *S. maltophilia* e *A. xylooxidans* têm demonstrado que podem estar relacionados a infecções graves, recorrentes e com maior resistência aos antimicrobianos (JUNGE et al., 2016; FIRMIDA et al., 2016; DUPONT et al., 2017). Na Figura 2, está representada a prevalência do isolamento dos microorganismos associados às infecções em pacientes com FC, por idade, no total de 3.278 indivíduos, em 2017 no Brasil (GBEFC, 2018).

FIGURA 2 - PREVALÊNCIA DOS MICROORGANISMOS POR IDADE EM FC NO BRASIL



Fonte: GBEFC (2018). Adaptado pela autora

Estudos do microbioma pulmonar de pacientes fibrocísticos têm promovido mudanças na interpretação dos possíveis agentes infecciosos, isto é, muitos outros microorganismos estão sendo considerados possíveis patógenos, como o anaeróbio *Prevotella* que está associado com resposta inflamatória no pulmão (LIMOLI; HOFFMAN, 2019; HÉRY-ARNAULD et al; 2019). Com isso torna-se necessária uma maior interação entre os clínicos e os microbiologistas, para buscar estratégias que ajudem a entender melhor a

complexidade das infecções nas vias aéreas na FC e seu impacto no estado clínico do paciente (BURNS; ROLAIN, 2014).

3.2.1 *Staphylococcus aureus*

A bactéria faz parte da microbiota nasal em 30% da população em geral. Nos pacientes com FC, a taxa de colonização nasal varia de 30 a 69% e ocorre de forma precoce (LEE; ZILM; KIDD, 2020).

Dados obtidos das Fundações de Fibrose Cística dos Estados Unidos e do Brasil mostram que nos últimos anos *S. aureus* é o micro-organismo mais isolado de amostras respiratórias em pacientes com FC até os 30 anos, variando entre 50 a 80%. Apresenta uma maior prevalência entre os 5 a 10 anos. Após os 18 anos, o índice nos Estados Unidos vai caindo gradativamente ficando em torno de 45% aos 45 anos e no Brasil, 35% em adultos até os 35 anos (CFF, 2019; GBFEC, 2018). Na Europa, em crianças, ocorre uma variação de 8% no Reino Unido para 68% na Letônia, praticamente desaparecendo na fase adulta (HURLEY, 2018).

O fenótipo SCV de *S. aureus* foi descrito pela primeira vez por Swingle, em 1935, acreditando-se por longo período que esta característica fazia parte do ciclo de crescimento normal de *S. aureus* (PROCTOR et al., 2006). Porém, nas últimas duas décadas têm chamado a atenção dos pesquisadores, por estar relacionado com infecções persistentes e de difícil tratamento (PROCTOR et al., 2014).

As colônias pequenas variantes (SCV) são assim denominadas por apresentarem em meios de cultura, colônias com tamanho reduzido (10 vezes menores) que o fenótipo normal (KAHL, 2014).

Muitos mecanismos ainda não conhecidos podem estar relacionados com o surgimento de SCVs, porém o conhecimento do auxotrofismo pela dependência de SCVs por menadiona, hemina, timidina tem auxiliado no entendimento dos mecanismos subjacentes causadores do aparecimento de SCVs, através do sequenciamento de genes ou *operons* que participam das respectivas vias metabólicas (KAHL, 2014). A ocorrência do auxotrofismo dependente de timidina (TD-SCVs) é mais comum em amostras clínicas de pacientes com FC (KITTINGER et al., 2019).

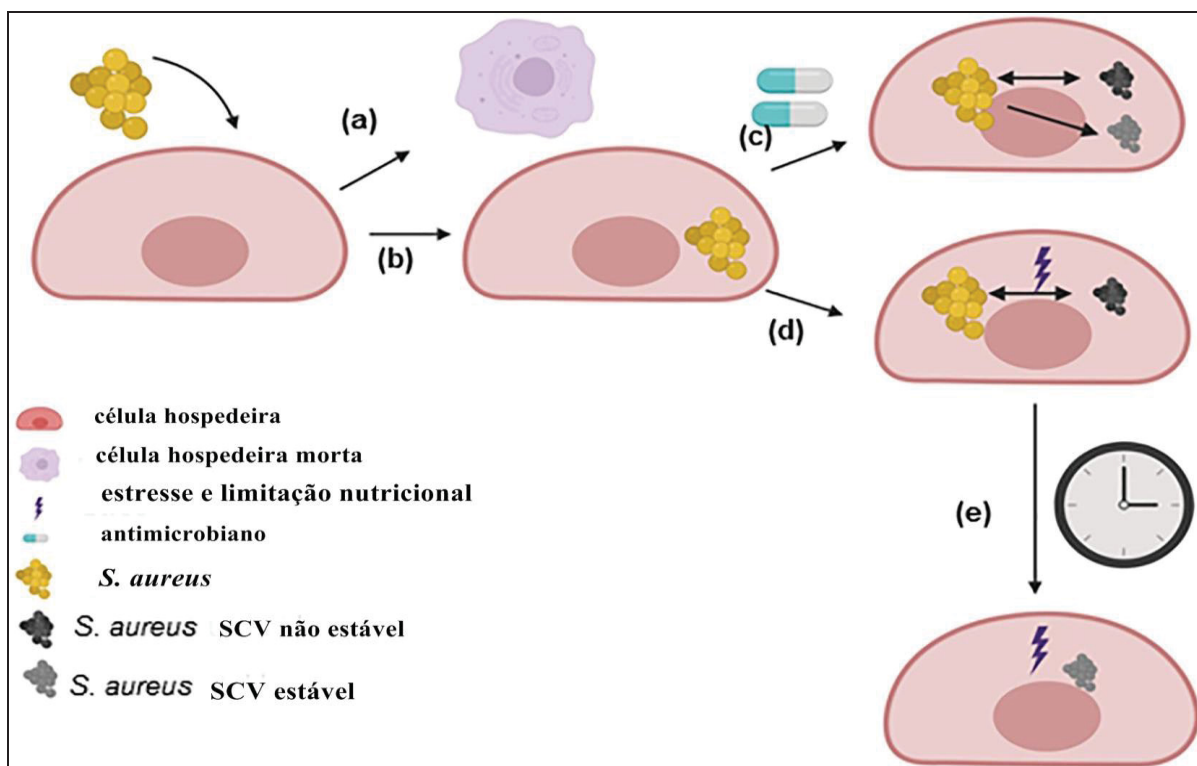
O fenótipo TD-SCVs também tem sido relacionado com diferentes infecções crônicas como endocardite, artrite, osteomielite, rinosinusite e peritonite (KAHL et al., 2016). Em

pacientes com fibrose cística além do isolamento em amostras respiratórias, já foi isolado de bacteremia, apesar de apresentar baixa virulência (SOUZA et al., 2020). Este tipo auxotrófico foi descrito em estudos realizados no Reino Unido, Alemanha, Itália, Turquia e Estados Unidos, sendo que a prevalência variou de 2,4 a 50% em pacientes fibrocísticos (KAHL et al., 2016).

O fenótipo SCV tem sido definido como uma subpopulação de *S. aureus*, que assim se apresenta durante o estágio de vida intracelular, devido às condições de estresse do ambiente intracelular ou pelo uso de antimicrobianos (TUCHSCHERR et al., 2011), (Figura 3). A formação do fenótipo SCV estável por grandes alterações genéticas, deleções ou inserções, que pode levar a morte da bactéria, e quando isolado de amostras clínicas pode ser apenas um processo de adaptação rápida durante a colonização e infecção do hospedeiro (KITTINGER et al., 2019).

O mecanismo molecular subjacente relacionado ao surgimento do fenótipo não estável (reversível) está associado a grandes rearranjos cromossômicos (GUERILLOT et al., 2019), que pode reverter rapidamente para o fenótipo normal por mecanismos regulatórios, quando sob condições de crescimento nutritivo adequado (KITTINGER et al., 2019; TUCHSCHERR; LÖFFLER; PROCTOR, 2020). Esse fenótipo reversível, devido a sua capacidade de voltar para o tipo normal, pode ser perdido durante o processo de isolamento e identificação bacteriana, mas deve ser valorizado por estar relacionado com as infecções recorrentes (KITTINGER et al., 2019).

FIGURA 3 - FORMAÇÃO DO FENÓTIPO SCV



Fonte: TUCHSCHERR; LÖFFLER; PROCTOR (2020)

LEGENDA: a) morte celular pós-invasão bacteriana; b) bactéria sobrevive no interior da célula do hospedeiro; c) ação de antibióticos, formação de células SCVs estáveis e não estáveis; d) sob *stress* (imunidade do hospedeiro e falta de nutrientes), formação de SCVs por alteração de genes regulatórios; e) tempo longo de sobrevivência de SCV não estável sob estresse, leva à formação do SCV estável.

A descoberta e caracterização das colônias timidina dependente (TD-SCVs), forneceram novas percepções para o entendimento da patogênese das infecções crônicas pulmonares por *S. aureus* em pacientes com FC (SOUZA, 2017).

O surgimento de TD-SCVs está associado com a produção de timidina. Ela é produzida pela ação da enzima timidilato sintase (codificada pelo gene *thyA*) que catalisa a metilação, por redução da 2'-desoxiuridina-5'-monofosfato (dUMP) em 2'-desoxitimidina-5'-monofosfato (dTMP), utilizando 5,10-metilenotetraidrofolato (mTHF) como doador de metila e redutor na reação, produzindo dihidrofolato (DHF) como um subproduto. Esta reação enzimática fornece uma fonte intracelular de novo dTMP, um precursor essencial para a biossíntese de DNA (BESIER et al., 2007b). A emergência de TD-SCVs pelo uso prolongado de TMP-SXT ocorre, porque este antimicrobiano interfere na síntese do THF que é um co-fator necessário para a conversão de dUMP para dTMP em duas etapas diferentes. O sulfametoxazol, como uma sulfonamida, inibe competitivamente a modificação bacteriana do

ácido p-aminobenzoico em di-hidrofolato, enquanto o trimetoprim inibe o di-hidrofolato bacteriano redutase (CHATTERJEE et al., 2008).

As colônias TD-SCVs sobrevivem na via respiratória, devido à presença de timidina externa, liberada pela ação da enzima DNase produzida por *S. aureus* que necrosam as células digerindo o DNA (PROCTOR et al., 2006; KAHL, 2014). E a característica morfológica de SCVs dependente de timidina é determinada por sua capacidade de se manter no meio intracelular do hospedeiro, desregulando suas próprias funções celulares essenciais, tais como a transcrição do DNA e a síntese do peptidoglicano para a formação da parede celular (MITCHELL et al., 2013; DELGADO-VALVERDE et al., 2014).

Para avançar nos protocolos de diagnóstico e tratamento de TD-SCVs, é necessário o entendimento dos mecanismos moleculares que induzem a formação deste fenótipo com o uso de TMP-SXT, a capacidade de se manter no espaço intracelular e o mecanismo de reversão, causando infecções crônicas (KRIEGESKORTE et al., 2015; DODÉMONT et al., 2015; LEE; ZILM; KIDD, 2020; ESPOSITO et al., 2019).

A capacidade de TD-SCVs se manter no interior da célula escapando da ação imune do hospedeiro, está relacionada com a baixa virulência que normalmente é apresentada por este fenótipo, escapando da ação citotóxica do hospedeiro como a produção de hemólise, e a menor expressão dos genes de expressão de toxinas bacterianas *hla* (toxina alfa hemolítica), *psma* (*proteassoma subunidade alfa*), *agr* (*accessory gene regulator*) e *rnaIII*, permanecendo em estado latente por longos períodos, sob condições desfavoráveis como baixa nutrição, stress oxidativo e antibioticoterapia. Esta característica favorece também a permanência de um maior número de células de SCVs, que acarretam em infecções (TUCHSCHERR et al., 2019).

Embora o tratamento de exacerbações pulmonares por *S. aureus* possa ser efetuado com os antimicrobianos cefalosporinas de primeira e segunda geração, penicilinas estafilocócicas, aminoglicosídeos, sulfa-trimetoprim, rifampicina, vancomicina, doxiciclina, linezolida e vancomicina (ESPOSITO et al., 2019; WHESTEPHALL et al., 2020), a maioria desses antimicrobianos agem no espaço extracelular, com exceção da rifampicina, o que torna difícil o tratamento de TD-SCVs (SUWANTARAT et al., 2018).

3.2.1.1 Identificação fenotípica de TD-SCVs

Para o isolamento de SCVs de *S. aureus* pode ser utilizado os meios de cultura ágar sangue (AS) ou ágar manitol salgado (MSA) com 5% de NaCl (MELTER; RADOJEVIC, 2010; YAGCI et al., 2013). Em AS as colônias de SCVs são puntiformes, podem apresentar coloração branca devida à falta da produção do carotenóide e são aderentes ao meio (KAHL et al., 2016). O crescimento pode ser lento, ocorrendo após 24-72 horas de incubação (PROCTOR et al., 2006), (Figura 4).

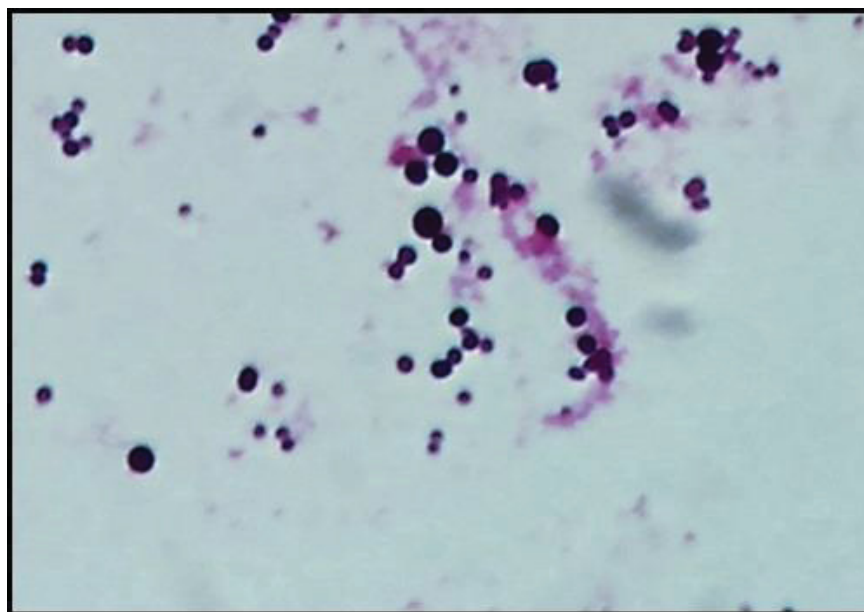
FIGURA 4 - MORFOLOGIA COLONIAL DE *S. aureus* – FENÓTIPO NORMAL E SCV APÓS 24 HORAS DE INCUBAÇÃO



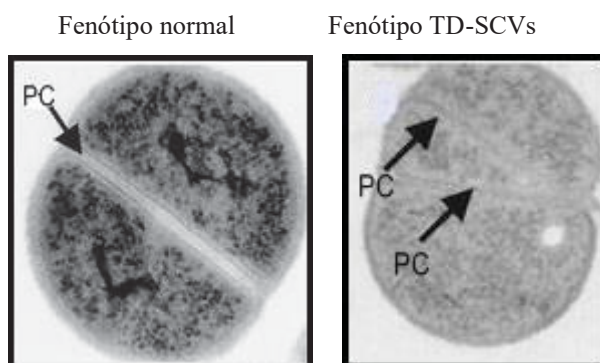
Fonte: A autora (2020).

As colônias de SCVs, com a coloração de Gram podem ser visualizados como cocos gram positivos pleomórficos, sendo que o formato irregular é devido a alterações na parede celular, resultantes das mutações que ocorrem durante a síntese do DNA (JORGENSEN et al., 2015), (Figura 5). Através da microscopia eletrônica é possível observar o alargamento dos cocos com paredes incompletas ou transversais múltiplas, indicando que a separação celular foi prejudicada (PROCTOR et al., 2006), (Figura 6).

FIGURA 5 - MORFOLOGIA CELULAR DE TD-SCVs COM A COLORAÇÃO DE GRAM



Fonte: A autora (2020). Aumento 1000x (500x345 pixels)

FIGURA 6 – MORFOLOGIA CELULAR DE *S. aureus* ATRAVÉS DA MICROSCOPIA ELETRÔNICA

Fonte: Kahl (2003).

Legenda: PC – Parede celular

Para a correta identificação, devem ser utilizados métodos de dependência nutricionais; as provas bioquímicas de catalase, coagulase e a observação do não crescimento em ágar Mueller Hinton (MHA) (SOUZA; COGO; ROSARIO FILHO, 2016). Devido às deficiências metabólicas de SCVs os testes da catalase e/ou coagulase podem resultar falso negativos (DELGADO-VALVERDE et al., 2014; CHAVES, 2014), e como a identificação pelo método automatizado Vitek®2 possa ser limitada (NIELSEN et al., 2009), poderão ser

empregadas técnicas como por espectrometria de massa (MALDI-TOF) Vitek® MS (bioMerieux) (MASOUD-LANDGRAF et al., 2016).

A dependência auxotrófica para timidina é determinada pelo teste em MHA contendo este substrato, ou pela deposição de disco contendo o substrato sobre a superfície do MHA semeado com a bactéria (DELGADO-VALVERDE et al., 2014).

3.2.1.2 Caracterização genotípica de TD-SCVs

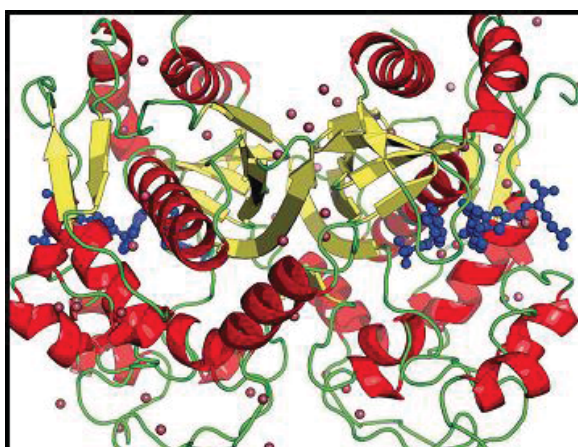
As técnicas genotípicas são essenciais para a compreensão dos mecanismos moleculares que selecionam ou induzem a formação de SCVs (LEE; ZILM; KIDD, 2020).

A Reação em cadeia da Polimerase (PCR) pode ser utilizada para a identificação do fenótipo SCV de *S. aureus* através da pesquisa do gene *nuc*, quando não for possível a identificação pelos métodos fenotípicos (BRAKSTAD et al., 1992). Também é utilizada no processo de preparação da amostra para posterior sequenciamento do gene *thyA* (CHATTERJEE et al., 2008).

3.2.1.2.1 Sequenciamento do gene *thyA*

A proteína timidilato sintase (*thyA*) (Figura 7) é essencial para a síntese do DNA bacteriano, sendo responsável pela conversão de timidina a partir da uracila (KRIEGESKORTE et al., 2014).

FIGURA 7 – REPRESENTAÇÃO EM DÍMERO (3D) DA PROTEÍNA TIMIDILATO SINTASE



Fonte: Leonarski; Swiniarska; Les (2015).

Legenda: as cores representam em vermelho as α -hélices, amarelo folhas- β pregueadas, verde os laços, em azul as moléculas ligantes do sítio ativo e pontos vermelhos as moléculas de água.

O sequenciamento do DNA do fenótipo SCV permite avaliar a ocorrência e tipos de mutações no gene *thyA* para buscar elucidar o auxotrofismo por timidina (LEE; ZILM; KIDD, 2020). Mutações não sinônimas como inserções, deleções, códon de parada prematuro ou mutações próximo do sítio ativo da timidilato sintase (ligação dUMP) já foram descritas (BESIER et al., 2007b). Chatterjee *et al.* (2008) também demonstraram que mutações em vários pontos do gene *thyA* foram responsáveis pelo surgimento do fenótipo SCV timidina dependente e pela inativação da síntese do timidilato.

3.2.1.2.2 Genotipagem de sequências de múltiplos locos de *S. aureus*

A técnica de tipagem de sequências de múltiplos locos (MLST) foi desenvolvida por Enright, et al. 2000, sendo utilizada para investigação clonal (PANDEY; SALLAM; PAREEK, 2017). A base de dados do MLST para *S. aureus* contém os perfis de alelos de 155 isolados de *S. aureus* com perfis de suscetibilidade diferentes (MSSA, MRSA, VRSA e VISA) (<http://www.mlst.net>).

O MLST é baseado na variação da sequência em genes de *housekeeping*, classificando as cepas de *S. aureus* em grupos que refletem a filogenia, permitindo o estudo da estrutura populacional e da história evolutiva. O perfil alélico é obtido pelo sequenciamento de fragmentos internos dos genes *arcC* (Carbamate kinase), *aroE* (Shikimate dehydrogenase), *glpF* (Glycerol kinase), *gmk* (Guanylate kinase), *pta* (Phosphate acetyltransferase), *tpi* (Triosephosphate isomerase) e *yqi* (Acetyl coenzyme A acetyltransferase) (PANDEY; SALLAM; PAREEK, 2017). Diferentes tipos de sequências MLST podem ser agrupados em complexos clonais (CC) com base no fato de compartilharem alguns dos sete (ou mais) *locus* (PRICE et al, 2013).

As sequências devem ser obtidas em ambos os filamentos e devem ser 100% precisas, pois mesmo um único erro pode converter um alelo conhecido em um novo alelo. As sequências precisam ser aparadas para que correspondam exatamente à região que é usada para definir os alelos (<http://www.mlst.net>).

A tipagem molecular é uma ferramenta importante no controle epidemiológico, auxiliando no estudo da diversidade genética e distribuição dos clones de *S. aureus*, sendo útil na redução da incidência de clones e o seu espalhamento entre os pacientes com FC (GARBACZ *et al*, 2018).

Através desta metodologia Liu, et al. (2016) conseguiram determinar a toxicidade e capacidade de invasão celular de *S. aureus*, em isolados de escarro em pacientes com FC. Foram identificados os clones (ST - *sequence type*) em ST5, ST8, ST15, ST30, ST59 e ST87, e observaram que os clones ST5 e ST30 eram menos tóxicos que ST8 e ST15 e que os tipos ST5, ST15, ST59 e ST87 foram menos capazes de invadir as células A549 usadas na pesquisa. No Brasil, em isolados de MRSA de escarro foram identificados os tipos ST5, ST30, ST72, ST239, ST398, ST1635, ST1661 e ST2732 (LIMA et al, 2014).

O clone ST398 que emergiu de animais tem sido encontrado no Brasil em isolados de *S. aureus* MSSA e MRSA de amostras respiratórias (LIMA et al, 2017), e em bacteremia por TD-SCVs em paciente com FC (SOUZA et al, 2020). Na Bélgica, os clones ST5, ST8, ST15, ST30, ST45, ST97 e ST398 foram detectados em isolados de SCVs de amostra respiratória de vários centros de FC (DODÉMONT et al, 2019).

3.2.2 Bacilos Gram negativos não fermentadores de glicose

Bacilos Gram negativos não fermentadores de glicose (BGN-NF) como *P. aeruginosa*, complexo *B. cepacia*, *S. maltophilia* e *A. xylosoxidans* são microorganismos ubiqüitários, encontrados no meio ambiente que podem colonizar e causar infecções oportunistas em pacientes com FC (LUTZ et al., 2011).

Outros BGN-NF como *Chryseobacterium* spp., *Pandoraea* spp., *Bordetella bronchiseptica*, *Myroides* spp. e *Sphingobacterium* spp., podem ser isolados, porém a importância clínica do isolamento dessas bactérias não está bem definida (SOUZA et al., 2014).

A maioria dos BGN-NF não são altamente virulentos, porém possuem mecanismos de virulência que favorecem a colonização/infecção, como produção de 4-hidroxi-2-heptilquinolina-N-óxido (HQNO) e piocianina por *P. aeruginosa* que modificam o epitélio respiratório, expondo os receptores do trato respiratório a outros patógenos. A produção de exopolissacarídeos, que pode conferir um aspecto mucóide em complexo *B. cepacia* assim como o alginato produzido por *P. aeruginosa*, são responsáveis pela colonização e infecção por essas bactérias (HAUSER et al., 2011). O pili presente em complexo *B. cepacia* medeia a aderência a glicoproteínas do muco e aumentam a adesão em células epiteliais. A presença de fimbrias é responsável pela adesão de *S. maltophilia* nas células brônquicas (CHERNISHEV,

2008). Em *A. xylosoxidans* acredita-se que a perda da produção de protease seja um mecanismo adaptativo relacionado a infecções crônicas (WATERS et al., 2011).

A produção de biofilme e de resistência a diferentes antimicrobianos e formação de colônias pequenas variantes (SCVs) são também fatores de virulência importantes nos BGN-NF (MOJICA et al., 2019).

3.2.2.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Na fase adulta dos pacientes com FC ocorre uma modificação na microbiota, que antes era composta principalmente por *S. aureus*, passando a ser constituída por *P. aeruginosa*, embora esta bactéria possa ser encontrada em todas as idades (FILKINS et al., 2015). Infecções crônicas por *P. aeruginosa*, principalmente pelo fenótipo mucóide, que é considerado um fator de risco para a falha no tratamento de erradicação, estão relacionadas com rápido declínio da função pulmonar e morte de pacientes com FC (WATERS, 2018).

Também existe o fenótipo SCVs em *P. aeruginosa*, que são colônias pequenas que crescem após 48h de incubação e aderentes ao meio de cultura, apresentando motilidade reduzida causadas por mutações ou alterações nos genes *wspF*, *psl*, *pel* e *pvrR* (HAUSER et al., 2011).

É observado o isolamento concomitante de *P. aeruginosa* e *S. aureus*, em pacientes com FC, mesmo na fase adulta (WINDMÜLLER et al., 2015). Esses dois microorganismos apresentam vários mecanismos relacionados à competitividade e cooperação nas vias aéreas que interferem na progressão da doença ou eficácia do tratamento, e são considerados co-infectantes, quando isolados cronicamente ou em períodos intermitentes (LIMOLI; HOFFMAN, 2019).

É possível que a ocorrência de anóxia pela produção de muco, diminuição da função pulmonar, presença de neutrófilos e consumo de oxigênio por microorganismos no ambiente pulmonar, favoreçam a coexistência de *P. aeruginosa* e *S. aureus*. Infecções por essas duas bactérias têm sido associadas à diminuição da função pulmonar e ao aumento na frequência de exacerbações pulmonares (PALLET et al., 2019).

Estudos realizados por Fugère et al. (2014) sugerem que o fator sigma B (*sigB*) pode desempenhar importante papel na capacidade de *S. aureus* adaptar-se à presença de *P. aeruginosa*. Foi observado que em *S. aureus*, *sigB* promove a colonização, o surgimento de SCVs e a formação de biofilme em resposta ao tratamento com antimicrobianos, à presença

da molécula 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*, que leva a expressão aumentada de *sarA* e 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). Longo período de exposição a concentrações de HQNO associado ao uso de aminoglicosídeos, está relacionado com o surgimento de SCVs dependente de menadiona. A interação entre a produção da proteína A de *S. aureus* (SpA) e o exopolissacarídeo Psl de *P. aeruginosa*, protege *P. aeruginosa* contra a fagocitose pelos neutrófilos, e a erradicação pelo uso de tobramicina (ARMBRUSTER et al., 2016; BEAUDOIM et al., 2017).

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. Porém o uso da tobramicina para o tratamento de infecções das vias aéreas causadas por *P. aeruginosa* pode ser uma explicação para o aumento da prevalência de SCVs dependentes de hemina, em pacientes com mais idade e em piores condições clínicas (KAHL, 2014).

3.2.2.2 Complexo *Burkholderia cepacia*

O complexo *B. cepacia* é encontrado como colonizante crônico com maior frequência em pacientes adultos com FC. Este grupo é constituído por 20 espécies similares, sendo *B. cenocepacia*, *B. metallica* e *B. multivorans* as espécies de maior significado clínico (CULLEN; MC CLEAN, 2015; CARRARO et al., 2018). Dependendo da genoespécie envolvida na infecção, as manifestações clínicas podem variar da ausência de sintomas a quadros graves como a evolução fulminante para pneumonia necrosante, insuficiência respiratória e sepse (ATHANAZIO et al., 2017; GARCIA et al., 2018). Goodlet et al. (2019) relatam que *B. cenocepacia* está associada com alto risco de morte pós-transplante pulmonar, porém em seu estudo obtiveram sucesso no retransplante de um paciente infectado por *B. ambifaria*.

Estudos têm relatado que pacientes com FC e com colonizações crônicas por complexo *B. cepacia*, associadas à resistência aos antimicrobianos, têm maior deterioração da função pulmonar e aumento da mortalidade, quando comparados com aqueles colonizados por *P. aeruginosa* (FOLESCU et al., 2015; GARCIA et al., 2018).

Para a escolha de tratamento adequado de infecções por complexo *B. cepacia*, é necessária a compreensão dos mecanismos de adaptação e evolução do patógeno, porém o conhecimento da genotipagem do complexo de espécies ainda não está bem esclarecido. Apresentam numerosos mecanismos de virulência e resistência intrínseca para polimixina, com algumas espécies apresentando também elevada resistência a outros antibióticos (RHODES; SCHWEIZER, 2017; SCOFFONE et al., 2017). Um esquema de tratamento que obteve sucesso e demonstrou estabilidade clínica foi proposto por Garcia et al., (2018) para a erradicação de complexo *B. cepacia*, num total de 81 dias com azitromicina e sulfametaxazol-trimetoprim, associando também tobramicina e ceftazidima (este último apenas nos primeiros 21 dias do tratamento), caso o paciente esteja também infectado por *P. aeruginosa*.

3.2.2.3 *Stenotrophomonas maltophilia*

A bactéria tem sido isolada nos últimos anos com maior frequência de amostras respiratórias de pacientes com FC (ABDA et al., 2015). Infecções por *S. maltophilia* aumentam o risco de transplante de pulmão e óbito (WATERS et al., 2013). Coinfecções de SCVs de *S. aureus* com *S. maltophilia* estão associadas com exacerbações e piora da função pulmonar (JUNGE et al., 2016).

S. maltophilia é um dos microorganismos que mais apresenta resistência a diferentes antimicrobianos (WATERS et al., 2011), apresentando resistência intrínseca para carbapenems, quinolonas e aminoglicosídeos (HOWE et al., 1997; STEINMANN et al., 2018). A resistência aos carbapenems é devida à produção da enzima cromossômica induzível metalo- β -lactamase da classe B de Ambler, às quinolonas por determinantes de resistência *qnrB*-like e bombas de efluxo, e aos aminoglicosídeos por enzimas modificadoras (6'-N acetyltransferase) (BROOKE, 2012; MOJICA et al., 2019).

O tratamento de escolha é sulfametoxazol-trimetoprim, mas nos casos de multiresistência faltam estudos clínicos para esclarecer o melhor tratamento. Doxíciclina tem demonstrado ser efetiva nestes casos (ESPOSITO et al., 2017). Estudos conduzidos por Mojica et al., (2019) encontraram uma excelente performance *in vitro* com a associação de ceftazidima/avibactam e aztreonam.

3.2.2.4 *Achromobacter xylosoxidans*

Estudos recentes têm demonstrado a emergência de *A. xylosoxidans* como patógeno respiratório em pacientes com FC (DUPONT et al., 2017). Tem se observado aumento de infecção/colonização em crianças com piora da função pulmonar, apresentando doença respiratória grave quando coinfectada com *P. aeruginosa*, e aumento de internações hospitalares (FIRMIDA et al., 2016; TETART et al., 2019). Infecções por esta bactéria ocorrem mais comumente nos pacientes com doença pulmonar avançada (HAUSER et al., 2011).

A. xylosoxidans é intrinsecamente resistente ao aztreonam e à maioria das cefalosporinas, sendo sensível para piperacilina/tazobactam e carbapenems (ALMUZARA et al., 2010). Os mecanismos de resistência estão relacionados com bombas de efluxo, a AxyABM e AxyXY-OprZ que mediam resistência ao aztreonam, cefepima, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos, e uma serina β -lactamase cromossomal induzível da classe D de Ambler, a OXA-114, que hidrolisa a piperacilina (HU et al., 2015; SPITZNOGLE; AITKENS, 2019).

3.2.3 *Haemophilus influenzae*

A bactéria *H. influenzae* faz parte tanto da microbiota do trato respiratório superior quanto inferior humano (CULLEN; McCLEAN, 2015). Em pacientes com FC é encontrado em 20% das crianças até os 2 anos, aumentando a prevalência para 30% dos 2 aos 5 anos e diminuindo para 10% em adultos. É reconhecido como patógeno em material respiratório destes pacientes, podendo causar doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e bronquiectasia (SCOFFONE et al., 2019).

A formação de biofilme por *H. influenzae* está relacionada com a cronicidade, recorrência e resistência ao tratamento. O biofilme é uma substância polimérica extracelular, que serve como barreira semipermeável que protege a bactéria contra a resposta imune do hospedeiro e ao tratamento com antibióticos (JURCISEK et al., 2017).

As taxas de resistência para os antibiogramas ceftriaxona, amoxicilina e ciprofloxacino têm se mostrado elevada em diferentes estudos, os quais apresentam efetividade no tratamento para azitromicina, levofloxacino, ceftriaxona, cefotaxima e rifampicina (SHOORAJ et al., 2019).

3.2.4 *Aspergillus fumigatus*

O fungo *Aspergillus* spp. é um micro-organismo obíquo, presente no meio ambiente, porém 60% dos pacientes com FC são infectados por *A. fumigatus*. O surgimento da aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA) está relacionado com acelerada diminuição da função pulmonar e mortalidade. Na ausência de ABPA, infecções pulmonares por este fungo acarretam no aumento de hospitalizações por exacerbação pulmonar, sintomas respiratórios e bronquiectasia (WARRIS; BERCUSSON; ARMSTRONG-JAMES, 2019; HONG et al., 2018).

O estudo de Granchelli et al., (2018) demonstrou que a presença de *P. aeruginosa*, complexo *B. cepacia* e *S. malthophilia* estão associadas com o surgimento de *Aspergillus* spp. no pulmão de pacientes com FC, e o estudo de Hong et al., (2018), sugerem que o uso de antibiogramas de rotina para manter o pulmão saudável ou para o tratamento de exacerbações pode estar relacionado com a persistência de *A. fumigatus*.

Para a detecção da ABPA, o isolamento de *A. fumigatus* em meio de cultura de amostra respiratória pode ajudar, porém apresenta baixa sensibilidade e especificidade. O exame de radiografia do pulmão também não é muito específico, uma vez que a lesão pode estar associada a outro micro-organismo. Já o exame sorológico contribui para a detecção da ABPA, onde o valor do IgE no soro estará elevado (>1000 UI/mL). Associando-se também a presença do anticorpo IgG (>90 mg/L), achados radiológicos e eosinofilia (>0,5 x 10⁹/L) (ALGHAMDI et al., 2019).

Para o tratamento de ABPA, o uso de corticosteroides é com frequência associado à toxicidade. Porém o uso de omalizumabe parece ser efetivo, diminuindo a frequência de recaídas e exacerbações. A anfotericina B associada a glicocorticoides inalatórios também reduz as exacerbações. O antifúngico itraconazol pode ser utilizado em pacientes com ABPA, quando não respondem bem ao tratamento com corticosteroides (JANAHI; REHMAN; AL-NAIMI, 2017; EICKMEIER et al., 2020).

3.3 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS PACIENTES COM FIBROSE CÍSTICA

A função pulmonar e o estado nutricional são fatores avaliados na rotina de acompanhamento dos pacientes com FC.

3.3.1 Função pulmonar

No trato respiratório de pacientes com FC, a redução da absorção do cloro e aumento da absorção do sódio tem como resultado a produção de muco mais espesso e viscoso, resultando em prejuízo da *clearance* ciliar propiciando um ambiente favorável para a contaminação e infecção por microorganismos (HAUSCHILD et al, 2018).

A exacerbação pulmonar está associada com morbidade, mortalidade, diminuição da qualidade de vida, levando às internações e conseqüente aumento de custos no tratamento do paciente. Nos Estados Unidos em 2018, os pacientes que mais apresentaram exacerbações pulmonares estavam na faixa etária de 15 a 30 anos (CFF, 2019). No Brasil no ano de 2017, metade dos pacientes com FC teve pelo menos um episódio de exacerbação pulmonar (GBEFC, 2018).

3.3.1.1 Avaliação da função pulmonar

Pela espirometria, é possível observar o declínio da função pulmonar nos pacientes com FC associado com infecções por bactérias como *P. aeruginosa*, *S. aureus* e complexo *B. cepacia* (ANDRADE et al., 2001), *S. maltophilia* (JUNGE et al., 2016) e *A. xylosoxidans* (FIRMIDA et al., 2016, TETART et al., 2019).

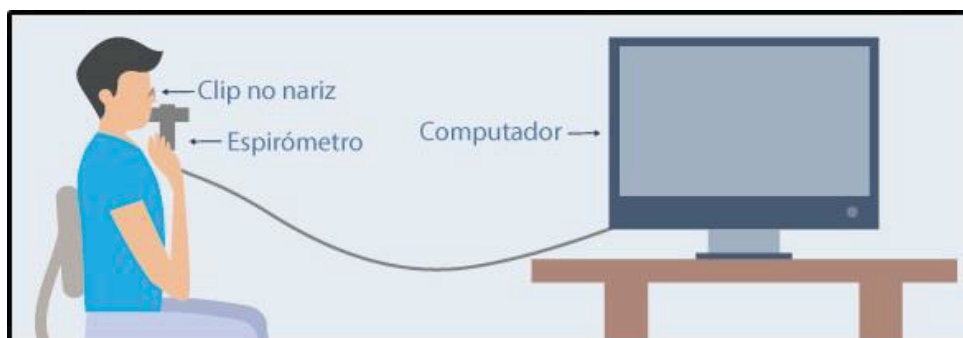
O isolamento de SCVs de *S. aureus* dependentes de timidina em pacientes com FC, quando comparados com o isolamento do fenótipo normal de *S. aureus* estão associados com estágio mais adiantado da doença, sendo isolados em pacientes com idade mais avançada, colonizados concomitantemente com outros microorganismos, como *P. aeruginosa* e *S. maltophilia*, demonstrando um pior estado clínico pela análise da função pulmonar (BESIER et al., 2007a; WOLTER et al., 2013; JUNGE et al., 2016).

3.3.1.2 Espirometria

A espirometria é o exame utilizado para avaliar a função pulmonar (HEINZMANN-FILHO et al, 2015). É um exame que mede o volume e o fluxo de ar que entra e sai do pulmão, sendo denominada de prova ventilatória ou de prova de função pulmonar (PEREIRA, 2002), (Figura 10).

A espirometria pode ser realizada a partir dos 5 anos de idade no mínimo duas vezes ao ano. Testes com e sem uso de broncodilatadores são recomendados (ATHANAZIO et al., 2017).

FIGURA 8 - EXAME DE ESPIROMETRIA



Fonte: <http://www.saudebemestar.pt>

O exame de espirometria mede o volume e os fluxos aéreos derivados de manobras inspiratórias e expiratórias máximas forçadas ou lentas (TRINDADE; SOUSA; ALBUQUERQUE, 2015). As medidas mais importantes são:

- Capacidade Pulmonar Total (CPT): volume de ar nos pulmões após inspiração máxima.
- Capacidade Residual Funcional (CRF): volume de ar que permanece no pulmão no final de uma expiração usual.
- Volume Residual (VR): volume de ar que permanece no pulmão após expiração forçada.
- Volume Expiratório Forçado em 1 segundo (VEF_1): é o volume de ar exalado no primeiro segundo da manobra de CVF.
- Capacidade Vital Forçada (CVF): volume máximo de ar exalado com esforço máximo na inspiração.
- Fluxo Expiratório Forçado médio (FEF 25%-75%): é o fluxo expiratório forçado médio na faixa intermediária da CVF entre 25%-75% da curva do CVF (PEREIRA, 2002).

A espirometria permite definir se o paciente tem obstrução das vias aéreas, a baixa relação entre VEF_1/CVF define a gravidade da obstrução pulmonar, quanto menor o VEF_1 em relação ao valor previsto, pior é a obstrução, cuja interpretação está representada no Quadro 1 (CFF, 2019).

QUADRO 1 – INTERPRETAÇÃO DO GRAU DE OBSTRUÇÃO COM BASE NO VOLUME EXPIRATÓRIO FORÇADO EM 1 SEGUNDO (VEF₁)

VEF ₁ (% do previsto)	Grau de gravidade
≥90	Normal
70 a 89	Leve
40 a 69	Moderado
<40	Grave

Fonte: CFF, (2019)

O parâmetro VEF₁ é utilizado para avaliar a evolução e o prognóstico na fibrose cística, assim como para a detecção precoce de exacerbações pulmonares agudas, correlacionando-se com a qualidade de vida do paciente (ATHANAZIO et al., 2017).

3.3.2 Antropometria

O estado nutricional é o equilíbrio entre o consumo de nutrientes e o gasto energético do organismo. Para a avaliação do estado nutricional de um indivíduo é considerado inicialmente o gênero e a idade, e em seguida a interpretação dos dados antropométricos, de peso (P), Estatura (E) e Índice de Massa Corporal (IMC) (SISVAN, 2011). Para a avaliação dos dados antropométricos, a *Cystic Fibrosis Foundation* (CFF), segue as recomendações do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) (CFF, 2019).

Na avaliação do estado nutricional de pacientes com FC, para crianças e adolescentes, são utilizados os parâmetros, Índice de Massa Corporal para a Idade (IMC/I), e peso em relação à idade (P/I), e para os adultos o IMC (HAUSCHILD et al., 2018).

A avaliação nutricional é realizada por meio de critérios estatísticos que expressam a classificação dos índices antropométricos, percentil e *score-z*. O percentil é um termo utilizado para a posição que uma determinada observação ocupa no interior de uma distribuição, é obtido, ordenando os valores da distribuição do menor para o maior e dividindo em 100 partes. O *score-z* (ou *score padrão*) de uma observação é o número de desvios padrão acima ou abaixo da média da população. A curva de percentis é o sistema de classificação do estado nutricional mais utilizado para acompanhar o crescimento, e o desenvolvimento na infância e adolescência (SISVAN, 2011).

Os gráficos de curvas de crescimento por percentis utilizados pelo CDC foram desenvolvidos após coleta de dados antropométricos de crianças e adolescentes, no período de

1988 a 1994. Os percentis são classificados em 5, 10, 25, 50, 75, 85 e 90 considerando do menor P/E ao maior. O intervalo do percentil para IMC/I entre 50 e 85 é avaliado como normal (<https://www.cdc.gov/healthyweight/assessing/bmi/index.html>). O IMC de adultos é calculado com base no peso e estatura, segundo o CDC.

Estudos realizados demonstram que o estado nutricional tem impacto sobre a capacidade respiratória, pela comparação do percentil do IMC/I e o VEF₁ (SIMON *et al.*, 2011; HAUSCHILD *et al.*, 2018). As medidas consideradas ótimas para crianças são IMC/I com um percentil ≥ 50 e VEF₁ $\geq 100\%$, e para adultos IMC ≥ 22 para mulheres e ≥ 23 para homens e VEF₁ $\geq 75\%$ (CFF, 2019).

Em pacientes com FC, Infecções crônicas e insuficiência funcional do pâncreas estão relacionadas com a desnutrição, que levam à deteriorização da função pulmonar e a redução da sobrevida (HAUSCHILD *et al.*, 2018).

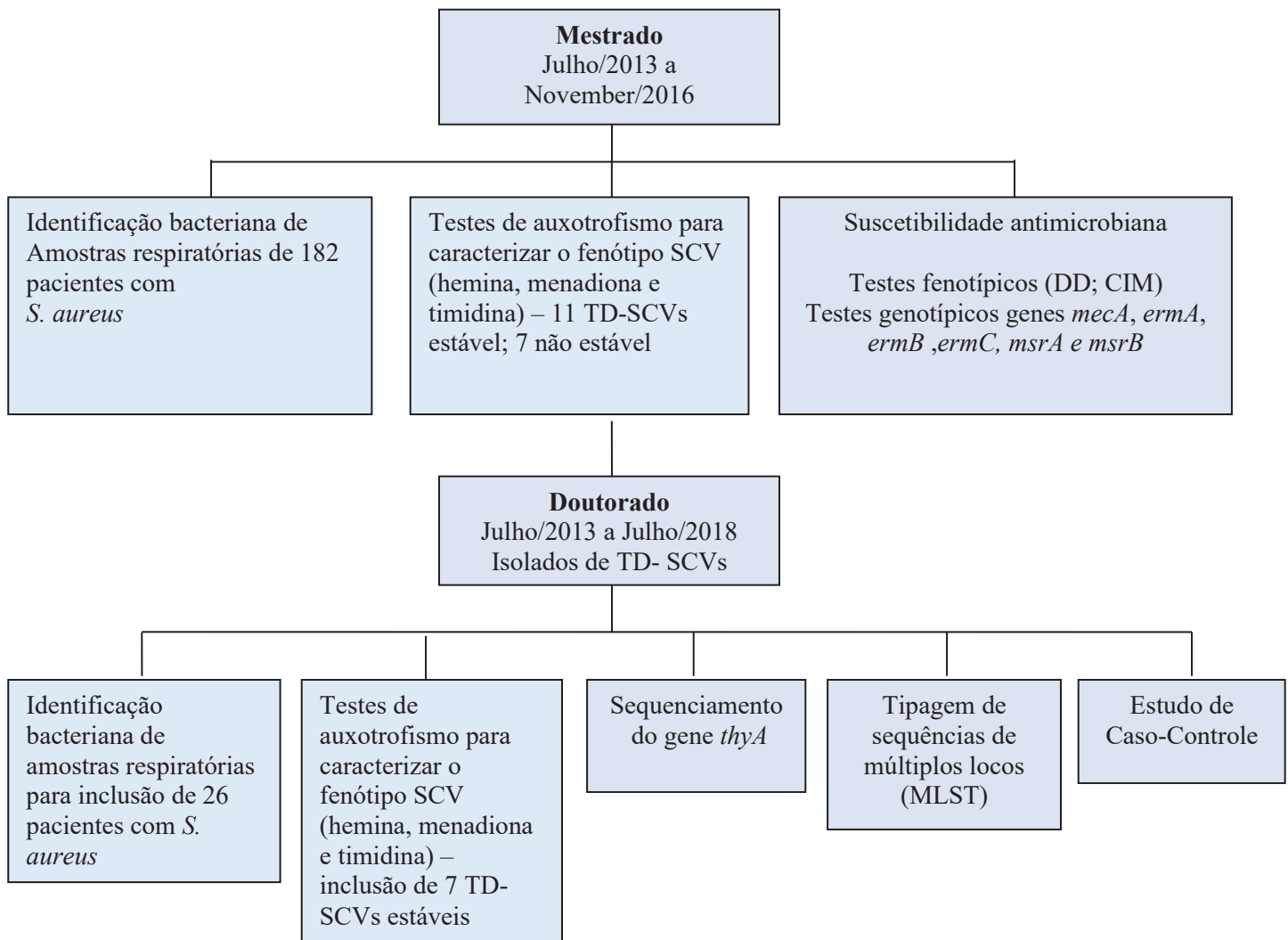
4 MÉTODOS

4.1 CARACTERÍSTICAS DO ESTUDO

O estudo foi realizado no Laboratório de Bacteriologia e no Laboratório de Biologia Molecular para Doenças Infecciosas do Complexo Hospital de Clínicas da UFPR e foi caracterizado como observacional de corte transversal (estudo de análise genética) e de corte longitudinal retrospectivo (estudo de caso controle), sendo uma continuação da pesquisa desenvolvida no mestrado.

O fluxograma a seguir representa as fases desenvolvidas durante a pesquisa (2013 a 2018), (Figura10).

FIGURA 9 - FLUXOGRAMA DA PESQUISA REALIZADA NO MESTRADO E DOUTORADO



Legenda: DD – disco difusão; CIM – concentração inibitória mínima

4.2 POPULAÇÃO DO ESTUDO

Foram incluídos todos os pacientes atendidos nos Ambulatórios de Fibrose Cística do CHC-UFPR, no período de Julho de 2013 a Julho de 2018. Foi considerado critério de inclusão o isolamento de *S. aureus* obtidos a partir de amostras respiratórias (escarro e *Swab* de orofaringe). Sendo assim, essa pesquisa foi desenvolvida com isolados do fenótipo SCV de *S. aureus* destes pacientes.

4.3 IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA E CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DO AUXOTROFISMO

Culturas de amostras respiratórias (amostras de escarro e swab de esforço) de pacientes com FC foram semeadas em ágar manitol salgado (MSA), e após o crescimento das colônias, estas foram identificadas pelos testes de catalase e coagulase. As colônias pequenas suspeitas de se tratarem de SCVs, tiveram a sua identificação confirmada nos equipamentos automatizados Vitek[®]2 Compact, MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight Mass Spectrometry*) Vitek[®]MS (bioMérieux, Marcy l’Etoile, France).

Para determinar a dependência nutricional (auxotrofismo) das colônias SCVs de *S. aureus*, foram utilizados dois métodos: ágar Mueller Hinton (MHA) suplementado e discos impregnados com o suplemento.

Para os dois métodos, primeiramente preparou-se uma suspensão bacteriana com turvação igual à escala 0,5 de McFarland.

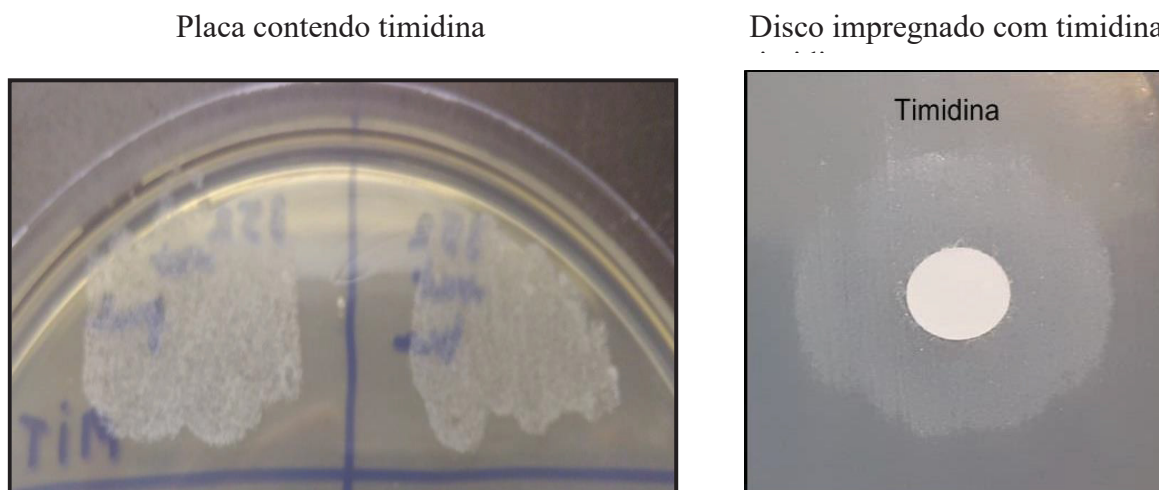
Para o método MHA suplementado a suspensão bacteriana foi cultivada em meios contendo hemina (20 µg/mL), menadiona (20 µg/mL) ou timidina (200µg/mL) (Sigma Aldrich[®]).

No método de discos impregnados com o suplemento, 15µL de cada solução (com a mesma concentração dos substratos utilizados no método do MHA suplementado) foram adicionados a um disco branco que foi depositado sobre a superfície do MHA já semeado com a suspensão bacteriana.

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.

FIGURA 10 – TÉCNICA DO AUXOTROFISMO EM PLACA E DISCO IMPREGNADO COM TIMIDINA



fonte: A autora, 2017.

O isolamento de *S. aureus* obtidos a partir de material respiratório faz parte do atendimento de rotina dos ambulatórios de FC. Após caracterização do fenótipo TD-SCV, os isolados foram armazenados em criotubo contendo *Trypticase Soy Broth* (TSB) com adição de 15% de glicerol, e mantidos em freezer a -80°C , até o momento do uso. Dados dos demais microorganismos isolados foram obtidos através de prontuários físicos e eletrônicos.

4.4 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS TD-SCVs

4.4.1 Extração do DNA

Os isolados de *S. aureus* que estavam armazenados a -80°C foram reativados em ágar sangue e incubados por 48-72 horas a $35-36^{\circ}\text{C}$. Uma suspensão bacteriana turva de cada isolado foi feita em tubos estéril de 1,5 mL contendo 500 μL de água ultrapura estéril (água destilada ultrapuraTM livre de DNase e RNase, (Thermo Fisher Scientific, Whaltam Massachussets, EUA). A suspensão foi agitada em vórtex, e levada para o termobloco para ferver por 15 minutos a 100°C . Após este período foi centrifugado por 5 minutos em

microcentrífuga a 14.000 rpm. Logo após 300 μL do sobrenadante que continha o DNA foi transferido para outro microtubo e estocado a temperatura de -20°C até o momento do uso.

4.4.2 Amplificação

Para a amplificação foi preparada de cada gene avaliado, uma mistura para a reação de PCR em microtubo de 1,5 mL, adicionando os reagentes na ordem descrita no Quadro 2. Em seguida 23 μL da mistura de PCR foi colocada em tubo de reação ao qual foi adicionado 2 μL da amostra (DNA alvo).

QUADRO 2 - REATIVOS USADOS NO PREPARO DA MISTURA DE PCR

Volume	100 μL
Nº de reações	1
1. Água Água Mili-Q estéril (Sigma, Estados Unidos)	20,75 μL
2. Tampão da Taq DNA pol 10X (Invitrogen, Carlsbad, USA)	2,5 μL
3. MgCl ₂ (50mM) (Invitrogen, Carlsbad, USA)	1 μL
4. dNTPs (10mM) (Invitrogen, Carlsbad, USA)	0,5 μL
5. Mistura de iniciadores (Prodimol, Brasil)	1 μL
6. TAQ DNA POLIMERASE (Invitrogen, Carlsbad, USA)	0.125 μL

Fonte: Adaptado de Nogueira, 2011

Os tubos foram colocados no termociclador (Eppendorf Mastercycler® Personal, Hamburgo, Alemanha ou Techne TC-412® Bibby Scientific, Staffordshire, ST15 OSA, Reino Unido) e as condições para amplificação do DNA foram específicas de acordo com o conjunto de iniciadores (Quadro 3) a seguir:

QUADRO 3 - OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS PARA SEQUÊNCIAS DO GENE *thyA* E GENES - MLST E TAMANHO DOS PRODUTOS

Gene	Inicializadores	Pb
<i>thyA</i>	F 5' GCAATGACTACACTGCTATTGG-3' R 5' GAGGTGTTATCGCATATGTTG-3'	957
<i>arcC</i>	F 5' TTG ATT CAC CAG CGC GTA TTG TC -3' R 5' AGG TAT CTG CTT CAA TCA GCG -3'	456
<i>aroE</i>	F 5' ATC GGA AAT CCT ATT TCA CAT TC -3' R 5' GGT GTT GTA TTA ATA ACG ATA TC -3'	456
<i>glpF</i>	F 5' CTA GGA ACT GCA ATC TTA ATC C -3' R 5' TGG TAA AAT CGC ATG TCC AAT TC -3'	465
<i>GmK</i>	F 5' ATC GTT TTA TCG GGA CCA TC -3' R 5' TCA TTA ACT ACA ACG TAA TCG TA -3'	429
<i>Pta</i>	F 5' GTT AAA ATC GTA TTA CCT GAA GG -3' R 5' GAC CCT TTT GTT GAA AAG CTT AA -3'	474
<i>Tpi</i>	F 5' TCG TTC ATT CTG AAC GTC GTG AA -3' R 5' TTT GCA CCT TCT AAC AAT TGT AC -3'	402
<i>YqiL</i>	F 5' CAG CAT ACA GGA CAC CTA TTG GC -3' R 5' CGT TGA GGA ATC GAT ACT GGA AC -3'	516

Fonte: Gene *thyA* – este estudo; genes para MLST – Jolley KA, Bray JE, Maiden MCJ, (2018).

Legenda: F = Forward ou iniciador sense; R = reverse ou iniciador antisense.

4.4.3 Condições de corrida

4.4.3.1 Gene *thyA*

Desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos; 35 ciclos de 94°C por 45 segundos, 56°C por 45 segundos 72°C por 45 segundos; e uma extensão final a 72°C por 10 minutos, Hold 4°C.

4.4.3.2 Genes para MLST

- Genes *arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi* e *yqi*

Desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos; 35 ciclos de 30 segundos a 94°C; anelamento a 55°C por 30 segundos; extensão a 72°C por 1 minuto, e uma extensão final a 72°C por 10 minutos (ZHOU, 2017).

Os produtos das reações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific) em tampão TBE, sob voltagem de 2 a 5 V/cm e corados em solução de brometo de etídio a 0,5 µg/mL. A visualização foi realizada em transiluminador UV (Vilber Lourmat, Labtech International, Uckfield TN22, Reino Unido) (PALMEIRO, 2018).

4.4.4 Sequenciamento Sanger dos isolados de TD-SCVs

Após a PCR dos genes e purificação dos produtos, estes foram encaminhados para a GoGenetic Facility UFPR, para o sequenciamento do DNA pelo método Sanger, para a pesquisa de mutações no gene *thyA* e dos genes pesquisados para determinar as linhagens de *S. aureus* (MLST). O sequenciamento do gene *thyA* foi realizado nos isolados TD-SCVs com fenótipo estável, com reversão (não estável) e em isolados com fenótipo normal de *S. aureus* como referência. Os genes investigados pela técnica de MLST foram realizados apenas para os isolados detectados fenotipicamente e genotipicamente como SCVs.

4.4.4.1 Análise dos resultados obtidos no sequenciamento do gene *thyA*

Todos os amplicons foram sequenciados usando um analisador de DNA de 3730XL (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA). Os Cromatogramas com as sequências de nucleotídeos e proteínas foram analisadas usando o software DNASTAR (Lasergene,

Madison, WI, EUA). O gene *thyA* dos isolados de morfotipos normais foram comparados com as sequências disponíveis na base de dados do NCBI Genbank, cepas de *S. aureus* COL (número de acesso NC_002951.2), MRSA252 (NC_002952.2), MSSA476 (NC_002953.3), Mu50 (NC_002758. 2), MW2 (NC_003923.1), N315 (NC_002745.2), NCTC8375 (NC_007795.1) e USA300_FPR3757 (NC_007793.1).

4.4.4.2 Determinação das linhagens de *S. aureus* TD-SCVs por MLST

A técnica de tipagem de sequências de múltiplos locos (MLST) foi realizada por PCR e o sequenciamento de sete genes alvos de *S. aureus* descritos no Quadro 3. Os Cromatogramas com as sequências de nucleotídeos foram analisadas usando o software DNASTAR (Lasergene, Madison, WI, EUA). A técnica foi realizada utilizando oligonucleotídeos e procedimentos já descritos (JOLLEY et al., 2018). As sequências foram analisadas para MLST de *S. aureus* no website (<https://pubmlst.org/saureus/>).

4.5 AVALIAÇÃO DO IMPACTO DA PRESENÇA DE TD-SCVs EM PACIENTES COM FC

Foi realizado um estudo de caso-controle 1:2 pareado por gênero e idade, através da busca de dados em prontuários físicos e eletrônicos, a fim de correlacionar o achado de TD-SCVs com alterações pulmonar ou no estado nutricional dos pacientes, assim como necessidade de internamento no período de 1 ano antes e após o isolamento do fenótipo. Para a avaliação dos dados clínicos e demográficos foi elaborada uma ficha que consta no Anexo 2. Foram coletados dados de cultura, para obter a informação da ocorrência do isolamento concomitante a outros patógenos e TD-SCV, além de determinar a persistência de TD-SCV nos pacientes fibrocísticos, através da detecção deste fenótipo.

4.5.1 Avaliação da função pulmonar

Para avaliar o grau de obstrução da função pulmonar, foram considerados os resultados obtidos dos exames de espirometria para Volume Expiratório Forçado em 1 segundo - VEF₁ absoluto e percentual do previsto, realizados pelo laboratório de função

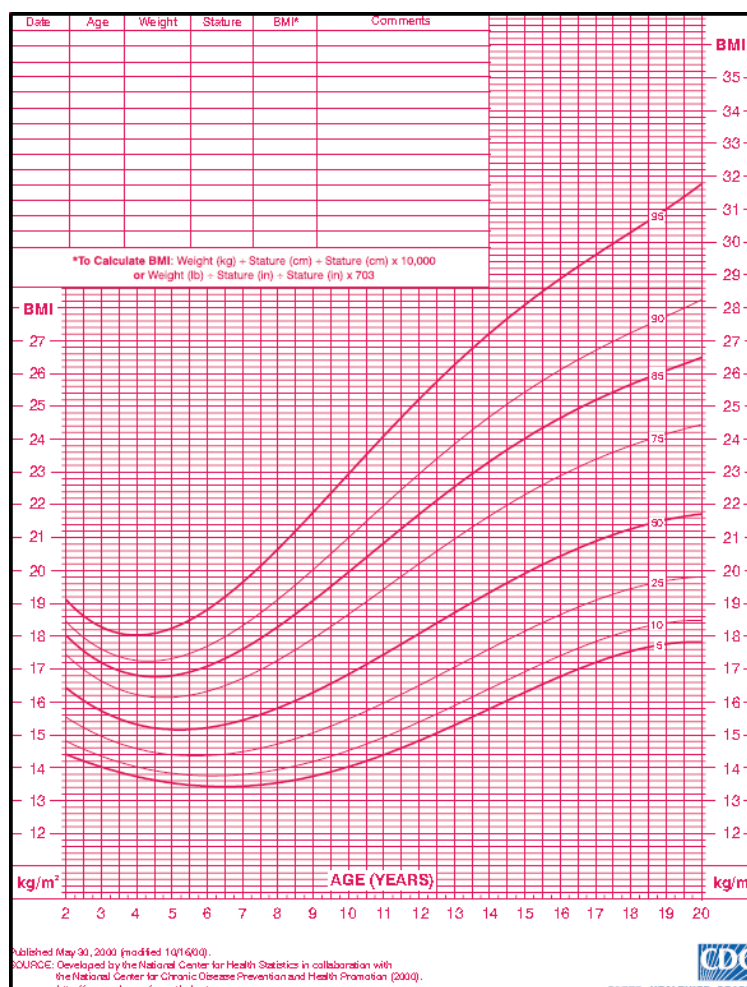
pulmonar do Hospital de clínicas da UFPR. A padronização do teste utiliza os valores da associação americana e europeia, ATS/ERS (2005), e os valores previstos de acordo com Pereira (2002) e Pereira, Sato, Rodrigues (2007). A interpretação dos resultados foi realizada de acordo com o padrão estabelecido pela *American Thoracic Society* (CFF, 2019).

4.5.2 Avaliação dos dados antropométricos

Os dados antropométricos de peso e altura foram obtidos dos prontuários dos pacientes, no período de 1 ano antes e 1 ano após o isolamento de SCVs, e armazenados em uma tabela. Para avaliar se houve correlação do estado nutricional com a função pulmonar, foi calculado o IMC dos pacientes.

Para determinar os percentis de crianças e adolescentes (de 2 até completar 20 anos) após o cálculo do IMC, este foi interpretado de acordo com a idade e gênero nos gráficos do CDC (Gráfico 1 e Gráfico 2). No Quadro 2 se encontram os pontos de corte do estado nutricional do IMC/I (percentil) e IMC utilizados no estudo.

GRÁFICO 2 - IMC POR IDADE EM MENINAS DOS 2 AOS 20 ANOS (PERCENTIS)



QUADRO 4 - PONTOS DE CORTE DE ESTADO NUTRICIONAL – IMC/I (percentil) e IMC

Diagnóstico nutricional	IMC/I percentil (2 a 20 anos)	IMC (>20 anos)
baixo peso	<5	<18,5
Adequado	>5 a 85	18,5 a 24,9
Sobrepeso	>85 a 95	25 a 29,9
Obesidade	>95	≥30

Fonte: <https://www.cdc.gov/healthyweight/assessing/bmi/index.html>

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise do estudo genético utilizou apenas frequência absoluta (n) e relativa (%) para as variáveis qualitativas apresentadas. Para o estudo de caso-controle a análise descritiva dos dados foi feita por meio de frequência absoluta (n) e relativa (%) para variáveis

qualitativas, e cálculo da média e desvio padrão, mediana, e amplitude (mínimo-máximo) das variáveis quantitativas. A normalidade dos dados foi investigada pelo teste de Shapiro-Wilk, e possíveis associações entre as variáveis foram obtidas pelos testes Exato de Fisher e Qui-quadrado. Além disso, possíveis diferenças entre variáveis quantitativas foram avaliadas pelo teste de Mann-Whitney. O nível de significância adotado no estudo foi de 5%. Toda análise dos dados foi feita no software estatístico R (R Core Team, 2020) versão 3.6.3 (<https://www.R-project.org/>).

4.7 ASPECTOS ÉTICOS

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas em Seres Humanos (CEP) do CHC-UFPR sob o registro nº CAAE 45.063115.90000.0096, seguindo as normas da Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde.

APÊNDICE 1

PRIMEIRO ARTIGO PUBLICADO: Thymidine – auxotrophic *Staphylococcus aureus* small colony variant bacteremia in a patient with cystic fibrosis

Received: 5 February 2020 | Accepted: 5 March 2020

DOI: 10.1002/ppul.24730

ORIGINAL ARTICLE: CYSTIC FIBROSIS – PEDIATRIC & ADULT



Thymidine-auxotrophic *Staphylococcus aureus* small-colony variant bacteremia in a patient with cystic fibrosis

Dilair C. de Souza MSc¹ | Laura L. Cogo PhD¹ | Jussara K. Palmeiro PhD^{2,3} |
Libera M. Dalla-Costa PhD² | Ana P. de Oliveira Tomaz^{1,2} | Carlos A. Riedi PhD⁴ |
Nelson A. Rosario Filho PhD⁴

Pediatric Pulmonology. 2020;1–6.

Q.C A1 e F.I 2.640

Thymidine-auxotrophic *Staphylococcus aureus* small colony variant bacteremia in a patient with cystic fibrosis

Dilair Camargo de Souza MSc^{1*}, Laura Lúcia Cogo PhD¹, Jussara Kasuko Palmeiro PhD^{2,3}, Libera Maria Dalla-Costa PhD², Ana Paula de Oliveira Tomaz^{1,2}, Carlos Antonio Riedi PhD⁴, and Nelson Augusto Rosário Filho PhD⁴

¹ Laboratório de Bacteriologia, Complexo Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil

² Faculdades e Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe, Curitiba, Brazil

³ Departamento de Análises Clínicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

⁴ Departamento de Pediatria, Complexo Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil

*Corresponding author: Rua Padre Camargo, 280, 1º andar, 80060-240, Alto da Glória, Curitiba, Paraná, Brazil

Tel.: +55-41-3360-7975; E-mail address: dilair.souza@hc.ufpr.br; dilaircs@hotmail.com

Running head: Thymidine-dependent *S. aureus* bacteremia

Keywords: SCVs; Auxotrophism; Thymidine-dependent; *thyA*

Abstract

Background: Small colony variants (SCVs) are a morphologic subtype of *Staphylococcus aureus* that may occur through several mechanisms including auxotrophism for thymidine, hemin, or menadione. Auxotrophic SCV for thymidine fail to synthesize DNA specifically because of mutations in the thymidylate synthase gene. We isolated *S. aureus* thymidine-dependent SCVs (TD-SCV) from blood and respiratory samples of a pediatric patient with cystic fibrosis (CF) and pulmonary exacerbation.

Methods: Nutritional dependence of SCVs on hemin, menadione, and thymidine was evaluated. Antimicrobial susceptibility testing was performed through broth microdilution. PCR was carried out for *mecA*, *ermA*, *ermB*, *ermC*, *msrA*, and *msrB* resistance genes. DNA sequencing was used to determine mutations in *thyA* and the multi-locus sequence typing to identify genetic relatedness.

Results: Methicillin-sensitive *S. aureus* with normal and TD-SCV phenotypes were isolated from respiratory samples and a TD-SCV phenotype was isolated from blood culture. Macrolides resistance was attributed to *ermC* and *msrB* genes. All isolates belonged to ST398. The *thyA* gene in *S. aureus* is 957 nucleotides in length and encodes a protein of 318 amino acids. The TD-SCV isolates carried a -2 nt frameshift mutation (delta 667GC668) in *thyA*, creating a stop codon at residue 222 close to the predicted binding site for dUMP.

Conclusions: Pathogenesis of SCVs is complex and not fully elucidated. Factors inherent to the patient such as physiological conditions, recurrent infections, or co-infection should be considered. Although SCVs are considered less virulent, they showed the ability to invade and cause bacteremia in the patient.

1. INTRODUCTION

The most common pathogen isolated from pediatric patients with cystic fibrosis (CF) is *Staphylococcus aureus*¹. Small colony variants (SCVs) are a specific morphologic subtype of *S. aureus* that have been recognized for their ability to contribute to persistent infections in different clinical sources². SCVs remain in host cells, which protect them against defense mechanisms, making treatment difficult³. The intracellular persistence of SCVs is considered a virulence factor in bacteremia⁴.

Identifying SCV colonies is difficult because they are small, grow slowly, and have different biochemical features including auxotrophic dependence on substrates such as hemin, menadione, and thymidine. These changes are associated with genomic mutations related to alterations in the electron transport and failure to synthesize DNA⁵.

Auxotrophic SCVs of thymidine harbor mutations in the thymidylate synthase gene (*thyA*), which uses tetrahydrofolic acid (THF) as a cofactor to catalyze the last step of the thymidine biosynthesis pathway⁶. More specifically, such mutations inhibit the conversion of deoxyuridine monophosphate (dUMP) to deoxythymidine monophosphate (dTMP), which is essential for bacterial DNA biosynthesis⁷. The prolonged use of trimethoprim-sulfamethoxazole (TMP/SMX) is related to the selection of SCVs because the drug interferes with the bacterial folate pathway by competitively inhibiting proteins involved in the synthesis and conversion of THF⁸.

Here, we report the isolation of *S. aureus* from a pediatric patient with CF prior to and after the emergence of SCVs. Furthermore, we monitored the antimicrobial therapy throughout the patient's life and characterized the SCV phenotypically and genotypically.

2. METHODS

2.1 Ethics

This study was approved by the Institutional Ethics Review Board at the Clinical Hospital of the Federal University of Parana (CHC/UFPR) under reference number CAAE 45063115.9.0000.0096.

2.2 Patient history and microbiological characterization of SCVs

Clinical and laboratory data regarding the pediatric patient with CF were retrospectively retrieved from medical records, the antimicrobial therapy regimens implanted during and post-hospitalization are shown in Table 1. The *S. aureus* TD-SCV phenotype was isolated from respiratory samples (sputum and endotracheal aspirate) and a blood culture. Initial identification was performed using catalase and coagulase tests, which were positive (Table 2). Finally, the identification was confirmed using the Vitek 2 Compact kit (bioMérieux, Durham, NC, USA), Vitek MS (bioMérieux) and the polymerase chain reaction (PCR) amplification of the *nucA* gene. The auxotrophic type of the pinpoint colonies was determined as follows: The bacterial suspension corresponding to 0.5 on the McFarland scale was streaked onto the surface of Mueller Hinton agar (MHA, Difco, Franklin Lakes, NJ, USA), and blank discs impregnated with 15 µL hemin (1 µg/mL), menadione (1 µg/mL), and thymidine (5 µg/mL) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) were added⁹.

The antimicrobial susceptibility testing (AST) was conducted using MHA supplemented with thymidine (5 µg/mL) to determine the susceptibility to oxacillin using the disk diffusion method according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines. Furthermore, broth dilution using brain heart infusion (BHI, Difco, Franklin Lakes, NJ, USA) supplemented with thymidine (5 µg/mL) was used to determine the minimum inhibitory

concentration (MIC) of TMP/SMX, ciprofloxacin, clindamycin, erythromycin, oxacillin, rifampicin, and vancomycin⁹. AST of an *S. aureus* normal phenotype isolate was performed as recommended by the CLSI.

2.3 Molecular characterization of TD-SCV

Mutations in the *thyA* gene were evaluated using PCR and DNA sequencing^{6,7}. PCR products were sequenced using a 3730XL DNA analyzer (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). Nucleotide and protein sequences were compared to the reference protein of *S. aureus* strains COL (accession nos. NC_002951.2), MRSA252 (NC_002952.2), MSSA476 (NC_002953.3), Mu50 (NC_002758.2), MW2 (NC_003923.1), N315 (NC_002745.2), NCTC8375 (NC_007795.1), and USA300_FPR3757 (NC_007793.1). Multi-locus sequence typing (MLST) was performed using PCR and sequencing of seven *S. aureus* target genes (*arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi*, and *yqiL*) following the protocol available on the PubMLST website (<https://pubmlst.org/saureus/>).

All isolates, as defined by phenotypic methods, were tested for the presence of the *mecA*, *ermA*, *ermB*, *ermC*, *msrA*, and *msrB* genes using PCR amplification with previously described primers and amplification conditions¹⁰.

3. RESULTS

A male newborn was diagnosed with CF by the newborn screening test, which showed increased immunoreactive trypsinogen (IRT), confirmed by an abnormal sweat test and the detection of the p.Gly542 mutation (homozygous) using the CF transmembrane conductance regulator (*CFTR*) gene sequencing analysis. The patient had exocrine pancreatic insufficiency, and not suffered from diabetes. Computerized tomography (CT) at 6-years-old detected diffuse bronchiectasis and a cystic appearance, mainly in the right upper lobe of the

lung. He had attended the outpatient Cystic Fibrosis Clinic of the CHC/UFPR since his birth in February 2011.

The patient's history, including the isolated microorganisms and the moment of the onset of TD-SCVs, pulmonary exacerbations, antimicrobial therapy, from birth to the unfavorable outcome are shown in Figure 1.

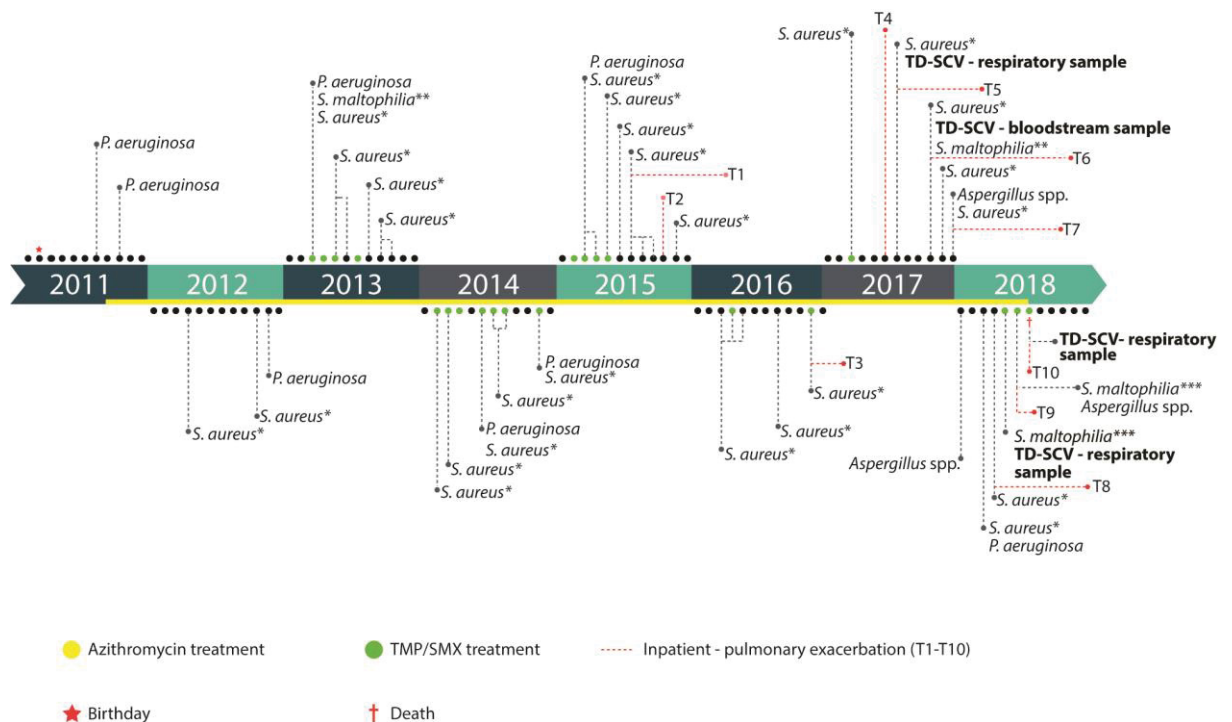


FIGURE 1 Timeline of pulmonary exacerbations, isolated microorganisms, and use of antimicrobials.

Note: **S. aureus*, normal phenotype; ***S. maltophilia*, TMP/SMX sensitive; ****S. maltophilia*, TMP/SMX resistant; T1-T10, antimicrobial treatment shown in Table 1. TD-SCV, thymidine dependent small colony variant; TMP/SMX, trimethoprim-sulfamethoxazole

From the first months of life, the patient had presented colonization/intermittent infections with *Pseudomonas aeruginosa* and was permanently colonized by methicillin-sensitive *S. aureus* (MSSA). *Stenotrophomonas maltophilia* colonization and infection were detected when he was 2-years-old, and again after 4 and 5 years. The first SCV *S. aureus* phenotype was isolated in 2017 and *Aspergillus* spp. was also isolated the same year. Treatment with TMP/SMX started when the patient was 2-years-old, due to co-infection with *S. maltophilia* and *P. aeruginosa*.

The patient had been hospitalized several times in the pediatric unit for pulmonary exacerbation (Figure 1). In October 2017, he was admitted to the pediatric emergency ward because of pulmonary exacerbation with fever (38.4 °C), a heart rate of 143 bpm, and a respiratory rate of 36 breaths/min. Following the worsening of the respiratory effort, oxygen therapy was introduced (4 L/min) and blood was collected (one pediatric bottle) for culturing and additional laboratory tests.

Laboratory assays showed leukocytosis (15,310 cells/mm³), with 39% bands, increased blood lactate level (2.65 mmol/L), and increased C-reactive protein (8.59 mg/dL). Other blood tests such as urea, creatinine, alkaline phosphatase, and glucose concentrations remained within normal limits. *S. aureus* thymidine-dependent SCVs (TD-SCV) were identified in the blood culture. After 10 days of treatment with intravenous cefepime the patient was discharged with a prescription for oral amoxicillin-clavulanate for 5 days. Fifteen days later the TD-SCV was isolated from his sputum again.

The patient was subsequently hospitalized four more times, with progressive worsening of his respiratory function. At the last hospitalization in July 2018, his blood counts showed leukocytosis (26,030 cells/mm³) and nuclear left deviation (48% bands). Although the blood culture did not show evidence of bacterial growth, TD-SCVs were isolated from the endotracheal aspirate. The patient progressed to respiratory failure and died 3 weeks later at age 7. Throughout his life the patient received different antimicrobial therapy, such as gentamicin, amikacin, tobramycin, cephalexin, trimethoprim-sulfamethoxazole, ciprofloxacin, azithromycin, amoxicillin-clavulanate, and linezolid as outpatient. In the periods in which he was inpatient and discharged the antimicrobial therapy is shown in Table 1.

TABLE 1 Antimicrobial therapy regimens implanted during and posthospitalization.

Antimicrobial treatment	Days										Dose/Kg/day	
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10		
Ceftazidime	10	-	-	-	9	-	21	14	-	-	-	150 mg iv q24h
Ceftriaxone	-	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100 mg iv q24h
Cefepime	-	-	7	7	-	10	10	-	-	-	-	150 mg iv q24h
Meropenem	-	-	-	-	-	-	21	-	-	-	8	40 mg iv q8h
Inpatient												
Tobramycin	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10 mg iv q24h
Oxacillin	-	-	-	-	-	-	-	14	12	-	-	200 mg iv q24h
Linezolid	-	-	-	-	-	-	18	-	-	-	5	30 mg po q24h
Rifampicin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	10 mg po q24h
Vancomycin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	60 mg iv q24h
Fluconazol	-	-	-	-	-	-	21	-	-	-	5	5 mg po q24h
Amoxicillin	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50 mg po q24h
Amoxicillin-Clavulanate	-	14	14	-	-	5	-	-	14	-	-	50 mg po q24h
Post-hospitalization												
Trimethoprim-sulfamethoxazole	-	-	14	-	-	-	-	-	14	-	-	10 mg po q24h
Ciprofloxacin	-	-	-	14	-	-	-	-	-	-	-	40 mg po q12h
Cephalexin	-	-	-	-	14	-	-	-	-	-	-	50-75 mg po q24h

Note: T1-T10, antimicrobial therapy used during different hospitalizations and after the patient was discharged. Abbreviation: IV, intravenous; PO, oral administration.

Table 2 summarizes the results of the AST profile analysis. The specimens were characterized as MSSA using the oxacillin test and this result was confirmed by the negative PCR test for the *mecA* gene. The strain showed sensitivity to clindamycin but it was considered resistant because of its inducible resistance (iMLS_b) phenotype and was confirmed by the presence of the *ermC* gene. Macrolide resistance was also attributed to the *msrB* gene, mediated by a mechanism associated with an efflux pump.

TABLE 2 Bacterial identification, antimicrobial susceptibility profile, and resistance genes of normal and TD-SCV *S. aureus* isolates.

Phenoty isolate	Nutritional dependency										Minimum Inhibitory Concentration (g/L)						Resistance genes		
	Bacterial Identification					MHA	Thy	Men	Hem										
	P	H	CT	CG						CIP	CLI	ERY	OXA	RIF	TMP/SMX	VAN	<i>mecA</i>	<i>ermC</i>	<i>msrB</i>
Normal^a	-	-	+	+		+	NT	NT	NT	2.0	0.003	>32	1.0	0.001	0.12/2.37	0.25	-	+	+
TD-SCV^a	-	-	+	+		-	+	-	-	8.0	0.007	>32	1.0	0.001	>16/304 (R)	0.50	-	+	+
TD-SCV^b	-	+	+	+		-	+	-	-	2.0	0.002	>32	1.0	0.002	>16/304 (R)	0.25	-	+	+

Note: Resistant (R), sensitive (S), intermediate (I) and results considered resistant due to inducible MLS_B resistance (R*). Weak growth (w); Not tested (NT).

Abreviation: Pigment (P), Hemolyse (H), Catalase (CT), Coagulase (CG), Mueller Hinton Agar (MHA), Thymidine (Thy), Menadione (Men), Hemin (Hem), Ciprofloxacin (CIP), Clindamycin (CLI), Erythromycin (ERY), Oxacillin (OXA), Rifampicin (RIF), Trimethoprim-Sulfamethoxazole (TMP/SMX), and Vancomycin (VAN).

^a Respiratory clinical sample

^b blood sample

The auxotrophy assay revealed the thymidine-dependent phenotype of the SCV isolated from blood and all respiratory samples. The sequencing to *thyA* gene and the MLST were performed from blood isolate and the first respiratory sample isolate. The *thyA* gene in *S. aureus* is 957 nucleotides in length and encodes a protein of 318 amino acids. The TD-SCV isolates carried a -2 nt frameshift mutation (delta 667GC668) in *thyA*, creating a stop codon at residue 222 close to the predicted binding site for dUMP. MLST analysis showed that all isolates belonged to the ST398-MSSA strain.

4. DISCUSSION

This case describes the sequential bacterial isolation in a pediatric patient from when he was diagnosed as having CF using the newborn screening test. Previous studies have reported that *S. aureus* as a pathogen is usually established early in the airways of patients with CF, whereas *P. aeruginosa* is identified at a later stage¹. However, in the present case, *P. aeruginosa* was the first pathogen observed. *S. maltophilia* was first isolated when the patient was 2-years-old and two more times, including his last year of life shortly before the emergence of *S. aureus* SCV and a severe lung disease probably associated to the presence of *S. aureus* SCV and co-infection with *S. maltophilia*¹¹⁻¹³. *Aspergillus* spp. was found in the last respiratory samples; although this fungus is considered a ubiquitous saprophyte, it may play an important role in chronic lung disease in patients with CF¹⁴.

Although all the isolates were MSSA, the antimicrobial profile demonstrated resistance to at least one antimicrobial. TD-SCVs showed resistance to a larger number of antimicrobials when compared to the normal phenotype and antimicrobial resistance is a characteristic that has been described in this phenotype^{5,15}. Resistance to clindamycin and erythromycin was also observed. The patient was treated with azithromycin at different and prolonged periods.

Azithromycin is a macrolide with anti-inflammatory activity frequently used in patients with CF, which contributes to improve the pulmonary function but may be associated to resistance to clindamycin and erythromycin¹⁶. The use of ciprofloxacin, chosen for treatment because of the co-infection with *P. aeruginosa*, explains the presence of isolates with intermediate susceptibility and resistance to ciprofloxacin. The constant treatment with TMP/SMX might be related to the drug resistance depicted in Table 2.

The auxotrophy assay revealed the thymidine dependence of all SCVs isolates. Thymidine auxotrophism has been previously found in respiratory samples from patients with CF and has been more frequently observed than menadione and hemin dependence^{17,18}. TMP/SMX had been prescribed to our patient since he was 2-years-old. This antimicrobial combination is regularly prescribed to children with CF for the treatment of the exacerbated acute pulmonary infection and it is rarely associated with toxic or allergic reactions¹⁹. However, long-term exposure to TMP/SMX is related to the selection of *thyA* mutations, which provides an advantage for TD-SCVs⁸.

The MLST analysis showed that all *S. aureus* (normal and SCV) of different clinical isolates were ST398-MSSA clone. The patient lived in the city next to rural area, but it is not possible to determine if he acquired the clone of human or animal origin. ST398-MSSA has been related as a clone of a clinical importance affecting humans and livestock animals²⁰, and also can be associated with human diseases in the absence of animals contact²¹. This sequence is related to epidemic bacteremia by MSSA²² and studies have demonstrated that the ST398 clone is highly virulent²¹.

Sequence analysis of the *thyA* TD-SCV phenotype isolates revealed a frameshift mutation caused by a 2-bp deletion when compared to a normal strain⁶. Deletion or substitution of a nucleotide may lead to alterations of the function or production of the enzyme thymidylate synthase⁷.

We presented a case of TD-SCV isolated from a pediatric patient with CF from bloodstream sample 3 months after this phenotype had been isolated for the first time from a sputum sample. Rare cases of SCV bacteremia have been reported in other chronic diseases⁵. Although TD-SCV was detected in the last sample collected, co-infection with *P. aeruginosa*, *S. maltophilia*, and *Aspergillus* spp. in the last year of life probably contributed to the worsening of the pulmonary function and the failure of the treatment.

Conflict of interest disclosure

There are no conflicts of interest to declare.

REFERENCES

1. Cystic fibrosis foundation patient registry 2017 annual data report.
2. Suwantararat N, Rubin M, Bryan L, Tekle T, Boyle MP, Carroll KC, Jennings MT. Frequency of small-colony variants and antimicrobial susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in cystic fibrosis patients. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2018;90:296-299.
3. Kim NH, Kang YM, Han WD, Park KU, Park KH, Yoo JI, Lee DG, Park C, Song KH, Kim ES, et al. Small-colony variants in persistent and recurrent *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Microb Drug Resist* 2016;22:538-544.
4. Youssef D, Molony K. *Staphylococcus aureus* bacteremia in adults. In: Shymaa E, Alexander LC, editors. *Frontiers in Staphylococcus aureus*. IntechOpen; 2017. p 117-131.
5. Kahl BC, Becker K, Löffler B. Clinical significance and pathogenesis of staphylococcal small colony variants in persistent infections. *Clin Microbiol Rev* 2016;29:401-426.
6. Chatterjee I, Kriegeskorte A, Fischer A, Deiwick S, Theimann N, Proctor RA, Peters G, Herrmann M, Kahl BC. In vivo mutations of thymidylate synthase (Encoded by *thyA*) are responsible for thymidine dependency in clinical Small-Colony Variants of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 2008;190:834-842.
7. Besier S, Ludwig A, Ohlsen K, Brade V, Wichelhaus TA. Molecular analysis of the thymidine-auxotrophic small colony variant phenotype of *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol* 2007;297:217-225.
8. Kriegeskorte A, Loré NI, Bragonzi A, Riva C, Kelkenberg M, Becker K, Proctor RA, Peters G, Kahl BC. Thymidine-dependent *Staphylococcus aureus* small-colony variants are induced by trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT) and have increased fitness during SXT challenge. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59:7265-7272.

9. Precit MR, Wolter DJ, Griffith A, Emerson J, Burns JL, Hoffman LR. Optimized *in vitro* antibiotic susceptibility testing method for small-colony variant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2016; 60:1725-1735.
10. Hilmi D, Parcina M, Bode K, Ostrop J, Schuett S, Heeg K, Ziebuhr W, Sommerburg O, Bekeredjian-Ding I. Functional variation reflects intra-strain diversity of *Staphylococcus aureus* small colony variants in the host–pathogen interaction. *Int J Med Microbiol* 2013;303:61-69.
11. Junge S, Gorlich D, den Reijer M, Wiedemann B, Tummler B, Ellemunter H, Dubbers A, Kuster P, Ballmann M, Koerner-Rettberg C, et al. Factors associated with worse lung function in cystic fibrosis patients with persistent *Staphylococcus aureus*. *PLoS ONE* 2016;11:e0166220.
12. Hurley MN. *Staphylococcus aureus* in cystic fibrosis: problem bug or an innocent bystander? *Breathe* 2018;14:87-90.
13. Waters V, Yau Y, Prasad S, Lu A, Atenafu E, Crandall I, Tom S, Tullis E, Ratjen F. *Stenotrophomonas maltophilia* in cystic fibrosis: serologic response and effect on lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;183:635-640.
14. King J, Brunel S.F, Warris A. *Aspergillus* infections in cystic fibrosis. *J Infect* 2016;72:S50-S55.
15. Yagci S, Hascelik G, Dogru D, Ozcelik U, Sener B. Prevalence and genetic diversity of *Staphylococcus aureus* small-colony variants in cystic fibrosis patients. *Clin Microbiol Infect* 2013;19:77-84.
16. Phaff SJ, Tiddens HA, Verbrugh HA. Macrolide resistance of *Staphylococcus aureus* and *Haemophilus* species associated with long-term azithromycin use in cystic fibrosis. *J Antimicrob Chemother* 2006;57:741-746.

17. Wolter DJ, Emerson JC, McNamara S, et al. *Staphylococcus aureus* small-colony variants are independently associated with worse lung disease in children with cystic fibrosis. *Clin Infect Dis* 2013;57(3):384-391.
18. Masoud-Landgraf L, Zarfel G, Kaschnigg T, Friedl S, Feierl G, Wagner-Eibel U, Eber E, Grisold AJ, Kittinger C. Analysis and characterization of *Staphylococcus aureus* small colony variants isolated from cystic fibrosis patients in Austria. *Curr Microbiol* 2016;72:606-611.
19. Abdulhamid I, Lehr VT. Hepatotoxicity induced by trimethoprim-sulfamethoxazole in a child with cystic fibrosis. *J Pediatr Pharmacol Ther* 2014;19:56-59.
20. Uhlemann AC, McAdam PR, Sullivan SB, Knox JR, Khiabani H, Rabadan R, Davies PR, Fitzgerald JR, Lowy FD. Evolutionary dynamics of pandemic methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* ST398 and its international spread via routes of human migration. *mBio* 2017; 8:e01375-16.
21. McClure JA, Shideler SM, Zhang K. Complete genome sequence of GD487, a high-virulence strain of human-associated ST398 methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Resour Announc* 2019;8:e00686-19.
22. Park KH, Greenwood-Quaintance KE, Uhl JR, Cunningham AS, Chia N, Jeraldo PR, Sampathkumar P, Nelson H, Patel R. Molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* bacteremia in a single large Minnesota medical center in 2015 as assessed using MLST, core genome MLST and *spa* typing. *PLoS One* 2017;12:e0179003.

APÊNDICE 2

SEGUNDO ARTIGO (em correção): Emergence of thymidine-dependent *Staphylococcus aureus* small colony variants isolated from cystic fibrosis patients in Southern Brazil

Revista a ser enviada: Journal of Clinical Microbiology

Category: original article

Emergence of thymidine-dependent *Staphylococcus aureus* small-colony variant in cystic fibrosis patients in Southern Brazil

Dilair Camargo de Souza^{*.1,2}, Laura Lúcia Cogo¹, Libera Maria Dalla-Costa³, Ana Paula de Oliveira Tomaz^{1,3}, Daniele Conte³, Carlos Antônio Riedi⁴, Nelson Augusto Rosário Filho^{2,4}, Jussara Kasuko Palmeiro^{3,5}

¹ Laboratório de Bacteriologia, Complexo Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil

² Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil

³ Faculdades e Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe, Curitiba, Paraná, Brazil

⁴ Departamento de Pediatria, Complexo Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil

⁵ Departamento de Análises Clínicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

*Corresponding author. Rua Padre Camargo, 280, 1º andar, 80060-240, Alto da Glória, Curitiba, Paraná, Brazil. Tel. 55 (41) 3360-7975. E-mail address: dilair.souza@hc.ufpr.br

Short running title: *Staphylococcus aureus* small colony variant in Brazil

Keywords: *S. aureus*; SCV; *thyA*; MLST; Antimicrobial susceptibility

ABSTRACT

Objective: We characterize *S. aureus* small-colony variants (SCVs) strains isolated from cystic fibrosis (CF) patients in Southern Brazil. *Methods:* Smaller colonies of *S. aureus* isolated from respiratory samples were identified with phenotypic, genotypic and automated system Vitek[®]2 and MALDI-TOF Vitek MS. Auxotrophism assay were evaluated by two methodologies: a) growing in the surface of Mueller Hinton Agar (MHA) supplemented with hemin (10 µg/mL), menadione (25 µg/mL) or thymidine (100 µg/mL), and b) growing in MHA around the disks impregnated with 15µL of these substrats. Antimicrobial susceptibility testing (AST) was tested for six antimicrobials by microdilution in BHI broth supplemented with thymidine (100µg/mL). PCR was carried out for *mecA*, *ermA*, *ermB*, *ermC*, *msrA*, and *msrB* resistance genes. DNA sequencing was performed to detect mutations in gene *thyA*. The Multi-locus Sequence Typing (MLST) was used to identify genetic relatedness. *Results:* Respiratory samples of 225 CF patients were analyzed. *S. aureus* was isolated from 182 (80%) patients. Of these SCVs thymidine-dependent (TD-SCVs) were identified in 11 (6.0%) and revertant in 7 (3.85%) patients. The susceptibility test demonstrated that 94.4% of the isolates were resistant to multiple drugs, 11.1% were oxacillin resistant and all of them were susceptible to vancomycin. The *mecA* (2), *ermA* (1), *ermB* (1), *ermC* (3) and *msrB* (18) genes were distributed among the isolates. Phenotypically thymidine-dependent isolates had synonymous and nonsynonymous point mutations and deletions that resulting in stop codons close to or within the active site of the thymidylate synthase (dUMP binding). The MLST was used to identify genetic relatedness in this study and we found the clones CC1 – ST1, ST 188, ST 2383; CC5 – ST5, ST221; e CC398 - ST398. *Conclusions:* SCVs are hardly identified in the laboratory routine. The results of this study clearly point to necessary improvement in phenotypic and genotypic methods to characterize them.

INTRODUCTION

Staphylococcus aureus is an important pathogen able to colonize and promote infections in the airways of Cystic Fibrosis (CF) patients [1]. Small-colony variants (SCVs) emerged in *S. aureus* as a phenotype related to chronic and recurrent infections [2] for its ability to survive to antimicrobial treatment and to persist in host cells, since it shows attenuated virulence and immune system evasion [3, 4].

The stable SCVs (sSCVs) are difficult to identify in the laboratory routine, since require specific substrates for their growth, such as hemin, menadione, or thymidine [5]. Due to this metabolic deficiency, sSCVs are 10-fold smaller than normal colonies, non-pigmented, non-hemolytic, and can adhere to the agar surface [3]. They may also display false-negative results for the catalase and coagulase tests [2] and promote growth failure in Mueller-Hinton Agar [3]. In addition to sSCVs, other phenotypic changes in *S. aureus* include revert cell type, which is also difficult to identify especially when it does not grow with SCVs. The reversal mechanism is unclear; however, it has been indicated as the key to successful reinfection on the host [4, 5]. Thus, persistent *S. aureus* infections may be caused by a variety of phenotypes with alternative lifestyles, even within a genetically clonal population [6].

Thymidine auxotrophism has emerged from inducing genetic mutations in *thyA* through prolonged treatment with trimethoprim-sulfamethoxazole [7, 8]. This antibiotic inhibits the synthesis of tetrahydrofolic acid, which serves as a cofactor for thymidylate synthase, an enzyme required for the conversion of uracil to thymidine which is encoded by the *thyA* gene [3]. Due to this mechanism, isolates of thymidine-dependent SCVs (TD-SCVs) show intrinsic resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole [7, 9].

The clinical implications of SCVs and their difficult microbiological diagnosis make essential to improve global knowledge regarding growth characteristics, culture and identification methods, and antimicrobial susceptibility testing. These difficulties may lead to

an underestimation of diagnosis and therapeutic failures. In this study we describe for the first time in Brazil the prevalence, phenotypic and molecular characteristics of *S. aureus* SCVs isolated from community CF patients, it is remarkable no study has yet been reported in Brazil.

MATERIALS AND METHODS

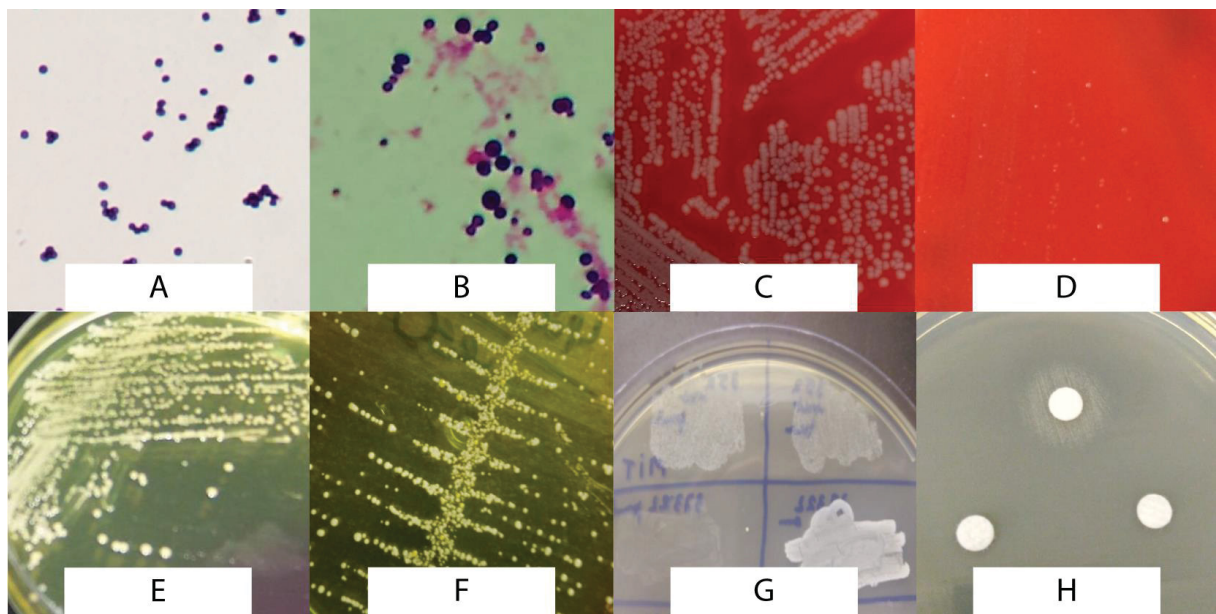
Study setting. This study was performed at Complexo Hospital de Clínicas of the Universidade Federal do Paraná (CHC/UFPR), an academic care hospital located in Curitiba, Parana, Southern Brazil. The Institutional Ethics Review Board of the CHC/UFPR approved this study under reference number CAAE 45.063115.90000.0096.

Clinical samples collection, bacterial identification, and phenotypic SCV characterization. A total of 225 respiratory samples (sputum, bronchoalveolar lavage, and oropharyngeal swabs) were collected from CF patients at the CHC/UFPR, between July 2013 to November 2016. Mannitol salt agar (MSA) was used to isolate *S. aureus* in aerobic atmosphere (**Fig. 1**). Smaller colonies were identified using standard biochemical tests. All isolates were stored at -80°C in trypticase soy broth (TSB; HiMedia, Mumbai, India) containing 15% glycerol. Bacterial identification was confirmed using Vitek[®]2 Compact instrument, Vitek[®]MS mass spectrometer (BioMérieux S.A., Marcy l'Etoile, France), and polymerase chain reaction (PCR) for the *nuc* gene using primers and amplification conditions as indicated in **Supplementary Table 1**.

SCVs identified as *S. aureus* were assessed for nutritional dependence. Isolates were inoculated with a 0.5 McFarland standard on (i) Mueller Hinton Agar (MHA) (Oxoid[™], ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA) supplemented with hemin (10 µg/mL), menadione (25 µg/mL), or thymidine (100 µg/mL) (Sigma-Aldrich[®], Merck, St. Louis, USA),

and (ii) MHA containing blank discs impregnated with 15 μ L of each of those solutions [10], both incubated in aerobic atmosphere at 35°C for 24 to 72 h. *S. aureus* SCVs isolates were characterized as nutritionally dependent when there was growth on some substrate, but there was no growth without the substrates. Isolates were considered reversible when they grew with and without substrates but showed atypical colony morphology (**Fig. 1**).

FIGURE 1 – BACTERIAL, COLONIAL MORPHOLOGY AND AUXOTROPHISM TESTS



Legend: Gram morphologies: normal (A), SCVs (B). Colonial morphology: on blood agar, normal (C) and SCVs (D); on mannitol salt agar: normal (E), and normal and SCVs (F). Nutritional dependence: Mueller Hinton agar supplemented with thymidine (G); thymidine impregnated disk placed on Mueller Hinton agar (H).

Antimicrobial susceptibility testing and detection of β -lactam, macrolides, lincosamides, and streptogramin B (MLS_B) resistance genes. TD-SCVs and revertant isolates, as defined by phenotypic methods, were tested for ciprofloxacin, clindamycin, erythromycin, oxacillin, trimethoprim-sulfamethoxazole, and vancomycin by broth dilution using brain heart infusion broth (BHI; Oxoid™, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) supplemented with thymidine (100 μ g/mL) [10, 11]. The double-disk diffusion method with clindamycin and

erythromycin disks was also tested on MHA supplemented with thymidine (100 µg/mL) to determine the MLS_B resistance phenotypes. Tests were interpreted according to CLSI standards (CLSI M100-ED29:2019; <http://em100.edaptivedocs.info>).

The presence of *mecA* gene-encoded oxacillin resistance and *ermA*, *ermB*, *ermC*, *msrA*, and *msrB* genes-encoded MLS_B resistance was detected by polymerase chain reaction (PCR) using primers under previously described conditions (**Supplementary Table 1**).

***thyA* sequencing and molecular typing.** Phenotypical TD-SCV stable and TD-SCV revertant *S. aureus* isolates were tested for the presence of mutations in the *thyA* using PCR and sequencing (**Supplementary Table 1**). PCR products were sequenced using a 3730XL DNA Analyzer (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). Nucleotide and protein sequences were compared to the sequences available in GenBank database belong to eight *S. aureus* strains (i) COL (accession no. NC_002951.2), (ii) MRSA252 (NC_002952.2), (iii) MSSA476 (NC_002953.3), (iv) Mu50 (NC_002758.2), (v) MW2 (NC_003923.1), (vi) N315 (NC_002745.2), (vii) NCTC8375 (NC_007795.1), and (viii) USA300_FPR3757 (NC_007793.1). We also include *thyA* sequencing of our wild type isolates.

Multilocus sequence typing (MLST) was performed by PCR and sequencing of seven *S. aureus* housekeeping genes (i.e., *arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi*, and *yqiL*) only for SCVs identified and confirmed phenotypically and genetically, using previously described primers and procedures [12] and sequences were analyzed by the *S. aureus* MLST website (<https://pubmlst.org/saureus/>).

RESULTS

Isolation of *S. aureus* SCVs from cystic fibrosis patients: prevalence and challenges in bacterial identification. A total of 225 respiratory samples from the same number of CF

patients were referred for microbiological analysis. The number of male e female patients was similar (n=117, 52% and n=108, 48%, respectively). The median age of patients was 6 years (range 1 month to 70 years). We isolate *S. aureus* from 186 patients (82%) and from these isolates we found suggestive colonies of SCVs in 16 patients (8.6%). The median age of patients with normal *S. aureus* isolates was 5 years (range 1 month to 70 years), and that of patients with SCVs was 13 years (range 5 to 57 years).

One bacterial isolate from each patient was included, except for two patients, from whom two colonial morphotypes were isolated [P7 (Sa7 and Sa12) and P8 (Sa8 and Sa16); **Table 1**]. Thereby, 18 isolates of *S. aureus* SCVs were characterized in this study. **Table 1** summarizes our results of bacterial identification and nutritional dependence methods, further antimicrobial susceptibility profile and detection of resistance genes. Standard biochemical characteristics converged to *S. aureus*, except for 11 isolates which have not grown on 7% NaCl agar and MHA. Vitek[®]MS and *nuc* gene, which encodes a specific termonuclease of *S. aureus*, identified all suspected colonies of SCVs as *S. aureus*, however Vitek[®]2 did not show the same accuracy (**Table 1**).

Antimicrobial susceptibility, β -lactam and MLS_B resistance-related genes. Most isolates (except for Sa3, Sa5, Sa11, and Sa15) displayed increased MICs for at least three classes of antimicrobials (77.7%, n = 14). A unique isolate was sensitive to trimethoprim/sulfamethoxazole (Sa13) and another to erythromycin (Sa15). Ciprofloxacin and clindamycin showed low activity against SCVs isolates (61%, n = 11; 38%, n = 7, respectively). Only oxacillin and vancomycin showed good activity against these isolates (**Table 1**).

Among oxacillin-resistant isolates, we detected *mecA* gene. While for isolates with MLS_B resistance, we identified constitutive and inducible MLS_B phenotypes showing

different genotypes, including *erm* and *mrs* co-producing genes and detection of only *mrsB*. One isolate showed susceptibility to MLS_B and no *mrsA* gene was found (**Table 1**).

Table 1. Bacterial identification methods, antimicrobial susceptibility profile, and resistance genes of 18 *S. aureus* SCVs isolates

Patient ^a	Isolate ID	Bacterial identification methods										Minimal inhibitory concentration (mg/L) ^b										Inducible MLS _B test			Resistance genes		
		Biochemical standard		Automated systems				<i>nuc</i> gene				CIP	CLI	ERY	TMP/SMX	VAN	OXA	D-test	β-lactams		MLS _B						
		Catalase	7% NaCl	Coagulase	Vitek®2	Vitek®MS	Vitek®MS	<i>nuc</i> gene	CAT	OX	ERY								SMX	β-lactams	<i>mecA</i>	<i>erm</i>	<i>msr</i>				
P1	Sa1	+	-	+	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	+	2	0,06	>32	>16/304	1	>16	+	+	C	B										
P2	Sa2	+	-	+	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	+	8	>16	>32	>16/304	0,5	0,25	-	-	B	B										
P3	Sa3	+	-	+	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	+	2	0,06	32	>16/304	2	0,25	+	-	A	B										
P4	Sa4	+	-	+	<i>S. capitis/warneri</i>	<i>S. aureus</i>	+	4	>16	>32	>16/304	0,25	0,125	-	-	-	B										
P5	Sa5	+	-	+	<i>S. lentus</i>	<i>S. aureus</i>	+	1	0,125	>32	16/304	2	0,5	+	-	-	B										
P6	Sa6	+	-	+	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	+	4	>16	>32	>16/304	1	1	-	-	-	B										
P7	Sa7	+	-	+	<i>S. lentus</i>	<i>S. aureus</i>	+	1	4	16	>16/304	1	0,5	-	-	-	B										
P8	Sa8	+	-	+	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	+	2	>16	>32	>16/304	2	1	-	-	-	B										
P9	Sa9	+	-	+	<i>S. lentus</i>	<i>S. aureus</i>	+	8	>16	>32	>16/304	1	2	+	-	C	B										
P10	Sa10	+	-	+	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	+	4	>16	>32	>16/304	1	1	-	-	-	B										
P11	Sa11	+	-	+	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	+	1	0,06	>32	>16/304	1	0,125	+	-	-	B										
P7	Sa12	+	W	+	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	+	2	8	>32	>16/304	2	0,5	-	-	-	B										
P12	Sa13	+	W	+	<i>S. warneri</i>	<i>S. aureus</i>	+	4	0,5	>32	2/38	1	>16	+	+	C	B										
P13	Sa14	+	W	+	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	+	1	>16	>32	>16/304	1	2	-	-	-	B										
P14	Sa15	+	W	+	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	+	1	0,25	0,25	8/152	1	1	-	-	-	B										
P8	Sa16	+	W	+	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	+	2	>16	>32	4/76	2	1	-	-	-	B										
P15	Sa17	+	W	+	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	+	1	>16	>32	4/76	2	2	-	-	-	B										

P16	Sa18	+	W	+	<i>S. aureus</i>	+	<i>S. aureus</i>	+	4	0,25	>32	>16/304	1	0,5	+	-	-	B
-----	------	---	---	---	------------------	---	------------------	---	---	------	-----	---------	---	-----	---	---	---	---

Legend Table 1.

^aSa7 and Sa12 were isolated from the same patient, as well as, Sa8 and Sa16 were isolated from another patient; w, weak reaction.

^bAntibiotic abbreviations: CIP, ciprofloxacin; CLI, clindamycin; ERY, erythromycin; OXA, oxacillin; TMP/SMX, trimethoprim-sulfamethoxazole; and VAN, vancomycin. MLS_B, macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance.

Phenotypic screening and molecular characterization of the auxotrophism of *S. aureus* SCVs. Eighteen suggestive colonies of SCVs were screened by nutritional dependence tests. Of these, 11 isolates from different patients grew only on MHA supplemented with thymidine, in both agar and disk. The remaining seven isolates poorly grew on non-supplemented MHA and MHA supplemented with thymidine, menadione, and hemin, which were characterized as revertant colonies of SCVs (**Table 2**). No isolate showed dependency for menadione or hemin substrates. We illustrated in **Fig. 1**, an example of different morphological colonies (normal, SCVs, and revertant) that grew up in MSA and blood agar, in addition to Gram morphologies from normal and SCVs colonies, as well as phenotypic tests for auxotrophism characterization.

Among isolates phenotypically determinate as SCV, most of isolates showed nonsynonymous mutations, while colonies determinate as revertant had synonymous mutations. We assigned genotypes according to types of mutations identified in *thyA* gene: (i) sSCV included isolates that showed at least frameshift mutations caused by indels (7 isolates) or nonsense mutation resulting in premature stop codon (1 isolate); (ii) SCV comprised missense non-conservative mutation around dUMP-binding site (2 isolates); and (iii) wild-type (WT) contained silent point mutations (7 isolates), missense conservative mutation (1 isolate) or no mutation (1 isolate) (**Table 2**). Two isolates phenotypically determinate as SCV possessed WT genotype (Sa2 and Sa8), as well as, almost all revertant phenotype had WT genotype, except for one isolate which we classify as sSCVs (Sa14; **Table 2**).

Table 2. Screening for nutritional dependence and *thyA* mutations of thymidine-dependent *S. aureus* SCVs isolates

Isolate ID	Auxotrophism characterization										Genotype
	Agar/disk supplementation ^b					<i>thyA</i> sequencing					
	WS	THY	HEM	MEN	Phenotype	Synonymous mutation	Non synonymous mutation	Alteration(s)	Genotype		
Sa1	-/-	+/+	-/-	-/-	SCV	A45G	A617G	Missense non-conservative mutation (Gln206Arg)	SCV		
Sa2	-/-	+/+	-/-	-/-	SCV	A183G, C219T, A237G, T411A, A438T, T450G, T501A, A516G, T582C, C609A, C837T, C864T, T876A, A924C		Silent point mutations	WT		
Sa3	-/-	+/+	-/-	-/-	SCV		T47G	Missense conservative mutation (Val16Gly) Frameshift mutation (-12 nt from amino acid 17)	sSCV		
Sa4	-/-	+/+	-/-	-/-	SCV	A45G	CAACTT115CAACTCTT	Silent point mutation Frameshift mutation (+2 nt from amino acid 40)	sSCV		
Sa5	-/-	+/+	-/-	-/-	SCV	A60G, C219T, A237G, T411A, A456G, A516G, T582C	A55C	Missense conservative mutation (Ile19Leu) Silent point mutations	sSCV		
Sa6	-/-	+/+	-/-	-/-	SCV		delta 590CACTTCCGCCTT601	Frameshift mutation (-12 nt from amino acid 197)	sSCV		
Sa7	-/-	+/+	-/-	-/-	SCV	G99A	delta 589GCACTTCCGCCTT601	Frameshift mutation (-13 nt from amino acid 197)	sSCV		
Sa8	-/-	+/+	-/-	-/-	SCV	T489C, A510G, A516G	A650G	Missense non-conservative mutation (Gln217Arg) Silent point mutations	SCV		
Sa9	-/-	+/+	-/-	-/-	SCV	A60G, A147T, C219T, A237G, T411A, A456G, A516G, T582C, A591T, A744C	A55C	Missense conservative mutation (Ile19Leu) Silent point mutations Frameshift mutation (-12 nt from amino acid 256)	sSCV		

Sal10	-/-	+/+	-/-	-/-	SCV	delta 591ACTTCCGCCTT601	Frameshift mutation (-11 nt from amino acid 198)	sSCV
-------	-----	-----	-----	-----	-----	-------------------------	--	------

Table 2. Continued.

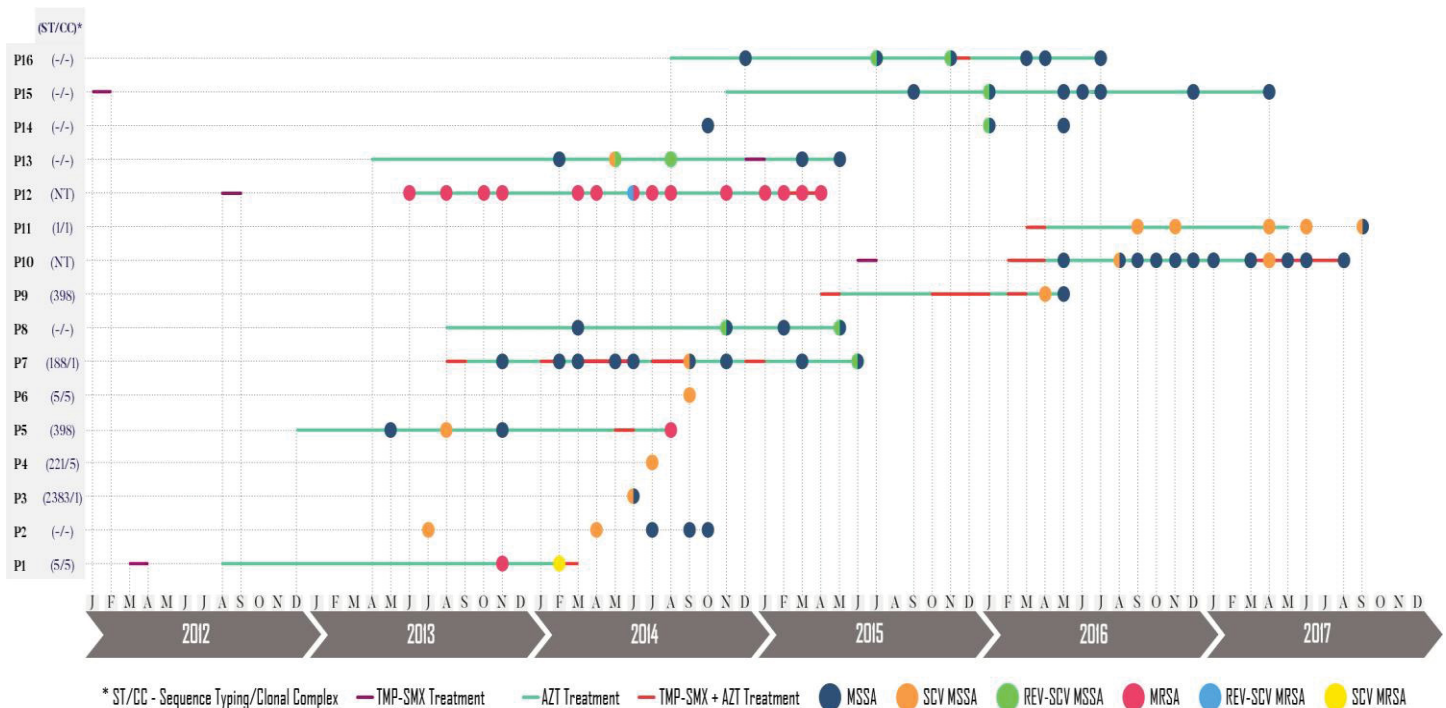
Sal11	-/-	+/+	-/-	-/-	SCV	A192T delta 197G198	Missense non-conservative mutation (Leu64Phe) Frameshift mutation (-1 nt from amino acid 66)	sSCV
Sal12	w/w	w/w	w/w	w/w	Revertant	G99A, A282C, T495A T495A	Missense conservative mutation (Asp165Glu)	WT
Sal13	w/w	w/w	w/w	w/w	Revertant	A183G, C219T, A237G, T411A, A456G, A516G, C609A, C627T, A720G, C870T, C882T	Silent point mutations	WT
Sal14	w/w	w/w	w/w	w/w	Revertant	AAA451TAA	Nonsense mutation (Lys150Stop)	sSCV
Sal15	w/w	w/w	w/w	w/w	Revertant	A183G, C219T, A237G, T411A, A456G, A516G, C609A, C627T, A720G, C870T, C882T	Silent point mutations	WT
Sal16	w/w	w/w	w/w	w/w	Revertant	T489C, A510G, A516G	Silent point mutations	WT
Sal17	w/w	w/w	w/w	w/w	Revertant		No mutation	WT
Sal18	w/w	w/w	w/w	w/w	Revertant	G99A	Silent point mutations	WT

Legend Table 2

^aGeneral abbreviation: w, weak growth; WS, without supplementation; THY, thymidine; HEM, hemin; MEN, menadione; WT, wild-type.

Diversity of *S. aureus* phenotypes over time, treatment and molecular typing. Figure 2 shows the diversity of *S. aureus* phenotypes isolated during the study, one year before and one year after the emergence of the first SCV, in addition to treatment with TMP-SMX and azithromycin. Among SVCs isolates, the sSVCs phenotype was found in 11 (61.1%) and the not stable or reversible phenotype was found in 7 (38.9%). Azithromycin and TMP-SXT were used in 11 and 9 patients, respectively. In 4 patients (P2, P3, P4 and P6) data on treatment were not available and one patient (P14) did not receive antimicrobial because he was asymptomatic. Also the results of the MLST tested, showing the clones found among the isolates are included in the figure 2.

FIGURE 2 – TIMELINE OF DIFFERENT *S. aureus* PHENOTYPES ISOLATES, ANTIMICROBIAL USED AND MOLECULAR TYPING



DISCUSSION

The SCV phenotype of *S. aureus* has attracted much attention from the scientific community in the last two decades because it is related to chronic infections and of difficult

treatment [13]. The present study is the first to characterize *S. aureus* small variant colonies (SCVs) isolated from the respiratory tract of CF patients in Brazil. Patients attended at the CHC-UFPR Cystic Fibrosis outpatient clinics, a referral center for the treatment of this disease.

Due to the metabolic changes observed in *S. aureus* that determine the onset of SCV colonies, the identification of this phenotype is firstly hampered by the morphological characteristics of the colonies and after, the biochemical identification.

In our study, the biochemical standard analysis showed the expected results. However, biochemical changes can occur, according to Kahl *et al.* (2016) [8], and may lead to delayed or negative reactions in the tests. The use of 7% NaCl medium contributed to the initial identification, where *S. aureus* tends to grow normally and SCVs did not grow or grew weakly. There were no reports about the 7% NaCl agar used in this research, since the medium is a modification of Chapman's medium that does not contain mannitol and phenol red as pH indicator, used in our laboratory and that assisted in the suspicion of being in front of a SCVs, for not growing in this specific medium for *S. aureus*. Although, some researchers report that SCVs may not grow on mannitol salt agar [14].

When the classic identification tests do not correspond to the expected results, but it is observed by the morphology that can be a *S. aureus* SCVs [8], other methodologies for the identification as the *nuc* gene search should be used, as reported by Vergison *et al.* (2007) [15]. The automated system Vitek[®]2 Compact used to confirm the identification of the species presented correct results to *S. aureus* for the most isolates (72.2%). These data demonstrate that, due to the growth characteristics of SCVs, the use of automation to the identification of the species is limited. The use of mass spectrometry (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight - MALDI-TOF) was an alternative to confirm the phenotypic identification in our study, as in the work of Ota *et al.* (2015) [16].

Most isolates showed resistance for at least three classes of antimicrobials, and can be classified as multidrug-resistant (Magiorakos et al, 2012) [17]. There was only one isolate susceptible to SXT-TMP, but it was classified as SCVs non stable, what can justify this finding. The other SCVs isolates were resistant to SXT-TMP, as shown by others researchs (Besier, 2007b) [18]; Precit, 2016 [9].

The resistance to erythromycin and clindamycin in the present study was found elevated, as shown in Table 1. Although researchers found intermediate or low resistance results [19, 20]. The macrolide azithromycin has anti-inflammatory properties [21] and is used in patients with CF aiming for an improvement in lung function. However, the use of this antibiotic has been associated with resistance to erythromycin and clindamycin [22].

Table 1 shows the results detected for the constitutive resistance (cMLSb) and induced resistance (iMLSb), but in some isolates (iMLSb) with positive phenotypic test (D test) was negative for the genotype, as in the studies of Ghanbari et al. (2016) [23]. But, in this study it was not tested other less frequently isolated genes, such as the *ermF*, *ermY* genes [24] and *ermT* genes [25].

The gene *msrB*, found in all the isolates, is related to the expression of efflux, an additional mechanism associated with macrolide resistance; however this mechanism of resistance is not associated with induced resistance to clindamycin, which may be used as treatment, provided that no other resistance mechanisms present [26].

In this study the minority of isolates were oxacillin resistant, confirmed by the *mecA* gene, as reported by Yagci et al. (2013) [11] and Masoud Landgraf et al. (2016) [19]. The isolation of methicillin-resistant *S. aureus* is associated with worsening of lung function and mortality risk in patients with CF [27]. The isolation of MRSA-SCV can be an aggravating factor for infected patients [28]. The susceptibility to vancomycin observed in our results may be related to the restricted use of this antimicrobial in the hospital environment and mainly MRSA.

Regarding the nutritional dependence, all isolated in the study were TD-SCVs. This auxotrophism is the most frequently found in respiratory samples from CF patients [7]. Studies showing only thymidine dependence also were found [29, 30]. Although dependence to hemin and menadione were describe by others researchers [31, 19].

We found a prevalence of 7.11% of SCVs among the patients included in the research. The prevalence of SCVs has been distributed differently in European countries, ranging from 4 to 33% [3]. In the United States, prevalence ranged from 6% to 24% [31, 32, 33]. Already in Turkey were found by Yagci *et al.* (2013) [11] and Pakasticali *et al.* (2016) [20] the prevalence of 8 and 21%, respectively.

The sSCV phenotype was the most identified when compared to the non stable (revertant) phenotype. The typical SCVs (sSCV) phenotype may show structural changes in the chromosome that lead to the formation of unstable SCVs. This is important for understanding the mechanisms that generate SCV and the pathogenesis of *S. aureus* (Guérillot, 2019) [34]. The non stable phenotype seems to play a major role in relapses of seemingly defeated infections [31].

As observed in our study, different researches have demonstrated the resistance of SCVs thymidine dependent (TD-SCVs) to trimethoprim/sulfamethoxazole [9, 11]. Although it is an antimicrobial of choice for the treatment of *S. aureus* infections in CF patients, continuous exposure to this drug is associated with the appearance of TD-SCVs [7], by interference of the drug with the bacterial folate pathway, inhibiting the production of two proteins involved in the synthesis of tetrahydropholic acid, that acts as a cofator for thymidylate synthase, resulting in mutation in the *thyA* gene and consequent resistance to antimicrobial [3].

In some isolates it was not possible to detect TD-SCVs only by phenotypic tests, there is a need for more accurate assays, such as the sequencing technique used in this search. The sequencing of *thyA* in TD-SCVs has shown that several mutations occur in the gene *thyA*,

synonymous and nonsynonymous point mutations and deletions that resulting in stop codons close to or within the active site of the thymidylate synthase (dUMP binding). Deletions and frameshift mutations results in the formation of a stable SCV phenotype and a nonsense mutation or a single nucleotide substitution are associated with an instable SCV phenotype (revertant phenotype). Similar results were reported by Besier et al. (2007) [1], Chaterjee et al. (2008) [35], and Kittinger et al. (2019) [4]. Due to the complex characteristics presented by TD-SCVs, mainly in terms of the non-stable phenotype, which is not yet fully understood; and the resistance and its role in severe infections in CF patients, other techniques as Whole Genome Sequencing and RNA-seq can be used to advance this research.

Clonal analysis demonstrated genetic variability among SCVs isolates. However the ST5 and ST398 clones were found in more than one isolate. These clones have been detected in MSSA and MRSA isolates with SCV phenotype from respiratory samples from CF patients [36]. The clone ST5 has been reported as community acquired isolates [37] and ST398 was reported in animal and human infections [8], and may present high virulence [38].

This research indicates an alert to the microbiologists regarding a difficulty in recognition and identifying SCVs of *S. aureus* and contributed to the implementation of the method in our laboratory routine. In addition, these results show a concern with treatment since all the isolates demonstrated to be multiresistant.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Central Laboratory of Paraná (LACEN), Paraná, Brazil for performing the MALDI-TOF assay and the staff of the Life Sciences Core Facility (GOSeq Biotecnologia) from Federal University of Paraná (UFPR) for DNA sequencing.

AUTHOR CONTRIBUTIONS STATEMENT

DS, LC, NR and JP conceived the idea and designed the study. DS, CR, and NR performed the sample collections. DS, LC, AT, and JP execute lab experiments. LD, DS, AT, DC, and JP carried out the DNA sequencing. DS, LC, and JP interpreted the data and wrote the manuscript. All authors have read and approved the final version of this manuscript.

FUNDING

DC PhD and AT MSc fellowship were funded by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil, Finance Code 001.

REFERENCES

1. Besier S, Ludwig A, Ohlsen K, Brade V, Wichelhaus TA. Molecular analysis of the thymidine auxotrophics small colony variant phenotypes of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 2007a;297:217–25.
2. Kahl BC. Small colony variants (SCVs) of *Staphylococcus aureus* - A bacterial survival strategy. Infect Genet Evol 2014 Jan; 21:515-22.
3. Kahl BC, Becker K, Löffler B. Clinical Significance and Pathogenesis of Staphylococcal Small Colony Variants in Persistent Infections. Clin Microbiol Rev 2016;29(2):401-27.
4. Kittinger C, Toplitsch D, Folli B, Masoud Landgraf L, Zarfel G. Phenotypic Stability of *Staphylococcus aureus* Small Colony Variants (SCV) Isolates from Cystic Fibrosis (CF) Patients. Int. J. Environ. Res. Public Health 2019;16:1940; doi:10.3390/ijerph16111940
5. Lee J, Zilm PS, Kidd SP. Novel Research Models for *Staphylococcus aureus* Small Colony Variants (SCV) Development: Co-pathogenesis and Growth Rate. Front Microbiol (2020);11:321.
6. Balaban NQ, Merrin J, Chait R, Kowalik L, Leibler S. Bacterial persistence as a phenotypic switch. Science (2004);305:1622-5.
7. Kriegeskorte A, Lore NI, 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 (2015);59:7265-72.
8. de Souza DC, Cogo LL, Palmeiro JK, Dalla-Costa LM, de Oliveira Tomaz AP, Riedi CA, et al. Thymidine-auxotrophic *Staphylococcus aureus* small-colony variant

- bacteremia in a patient with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* (2020); 55(6):1388-1393. doi: 10.1002/ppul.24730.
9. Precit MR, Wolter DJ, Griffith A, Emerson J, Burns JL, Hoffman LR. Optimized In Vitro Antibiotic Susceptibility Testing Method for Small-Colony Variant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* (2016);60:1725-35.
 10. Maduka-Ezeh A, Seville MT, Kusne S, Vikram HR, Blair JE, Greenwood-Quaintance K, et al. Thymidine auxotrophic *Staphylococcus aureus* small-colony variant endocarditis and left ventricular assist device infection. *J Clin Microbiol* (2012);50:1102-5.
 11. Yagci S, Hascelik G, Dogru D, Ozcelik U, Sener B. Prevalence and genetic diversity of *Staphylococcus aureus* small-colony variants in cystic fibrosis patients. *Clin Microbiol Infect* (2013);19:77-84.
 12. Jolley KA, Bray JE, Maiden MCJ. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome Open Res* (2018);3:124.
 13. Proctor RA, Kriegeskorte A, Kahl BC, Becker, K, Löffler B, Peters G. *Staphylococcus aureus* Small colony variants (SCVs): A Road map for the metabolic pathways involved in persistent infections. *Front Cel Infect Microbiol* 2014; 4(99).
 14. Proctor RA, Von Eiff C, Kahl BC, 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* 2006;4:295-305.
 15. 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* 2007;59:893-99.

16. 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 2015;63(6):683-87.
17. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin Microbiol Infect (2012);18:268-81.
18. Besier S, Ludwig A, Ohlsen K, Brade V, Wichelhaus AT. Molecular analysis of the thymidine-auxotrophic small colony variant phenotype of *Staphylococcus aureus*. Int J Med Microbiol 297 (2007b) 217–225.
19. Masoud-Landgraf L, Zarfel G, Kaschnigg T, Friedl S, Feierl G, Wagner-Eibel U, et al. Analysis and Characterization of *Staphylococcus aureus* Small Colony Variants Isolated From Cystic Fibrosis Patients in Austria. Curr Microbiol (2016);72:606-11.
20. 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 2016;47(3):475-84.
21. Black PN. Anti-inflammatory effects of macrolide antibiotics. Eur Respir J 1997;10:971-72.
22. Phaff SJ, Tiddens HA, Verbrugh HA, et al. Macrolide resistance of *Staphylococcus aureus* and *Haemophilus* species associated with long-term azithromycin use in cystic fibrosis. J Antimicrob Chemother 2006;57:741-46.

23. Ghanbari F, Ghajavand H, Havaei R, Jami MS, Khademi F, Heydari L. et al. Distribution of *erm* genes among *Staphylococcus aureus* isolates with inducible resistance to clindamycin in Isfahan, Iran. *Adv Biomed Res* 2016;5(62).
24. Matsuoka M, Inoue M, Nakajima Y, Endo Y. New *erm* Gene in *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46(1):211-15.
25. Chroboczek T, Boisset S, Rasigade JP, 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* 2013;8:(11).
26. Elkammoshi AM, Ghasemzadeh-Moghaddam H, Nordin SA, Taib NM, Subbiah SK, 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* 2016;9(10) e37148.
27. Dasenbrook EC, Checkley W, Merlo CA, Konstan MW, Lechtzin N, Boyle M.P. Association Between Respiratory Tract Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Survival in Cystic Fibrosis. *JAMA* 2010;303(23):2386-92.
28. Garcia EC, Gonzalez RG, Torres AR, Albor AAR, Schettino PMS. *Staphylococcus aureus* small colony variants in diabetic foot infections. *Diabetic Foot & Ankle* 2015;6:26431 - <http://dx.doi.org/10.3402/dfa.v6.26431>
29. 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* 2015; 38:235-43.

30. 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 2016;11(11): e0166220. doi:10.1371/journal.pone.0166220.
31. Wolter DJ, Emerson JC, McNamara S, Buccat AM, 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 2013; 57:384-91.
32. Gilligan PH, Gage PA, Welch DF, Muszynski RW. Prevalence of Thymidine-Dependent *Staphylococcus aureus* in Patients with Cystic Fibrosis. J Clin Microbiol 1987;25(7):1258-61.
33. Green N, Burns JL, Mayer-Hamblert N, Kloster M, Lands LC, 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 2011;49(7):2772-73.
34. Guérillot R, Xenia Kostoulas X, Donovan L, Lia L, Glen P, Cartera GP, Hachania A, et al. Unstable chromosome rearrangements in *Staphylococcus aureus* cause phenotype switching associated with persistent infections. PNAS 2019;116(40):20135–40.
35. Chatterjee I, Kriegeskorte A, Fischer A, Deiwick S, Theimann N, Proctor RA. In Vivo Mutations of Thymidylate Synthase (Encoded by *thyA*) Are Responsible for Thymidine Dependency in Clinical Small-Colony Variants of *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol 2008;190(3):834-42.
36. Dodémont M, Argudín MA, Willekens J, Vanderhelst E, Pierard D, Miendje Deyi VY. Emergence of livestock-associated MRSA isolated from cystic fibrosis patients: Result of a Belgian national survey. J. Cyst Fibros 2019;18:86–93.

37. Jamrozy DM, Fielder MD, Butaye P, Coldham NG (2012) Comparative Genotypic and Phenotypic Characterisation of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* ST398 Isolated from Animals and Humans. PLoS ONE 7(7): e40458. doi:10.1371/journal.pone.0040458
38. Kashif A, McClure J-A, Lakhundi S, Pham M, Chen S, Conly JM and Zhang K (2019). *Staphylococcus aureus* ST398 Virulence Is Associated With Factors Carried on Prophage _Sa3. Front. Microbiol. 10:2219. doi: 10.3389/fmicb.2019.02219

Supplementary table 1. Primers sequences used for PCR in this study

Genes	Sequence (5' - 3')	Fragment size (bp)	PCR conditions	Reference
<i>nuc</i>	F GCCACGTCCATATTTATCAG R TATGGTCCTGAAGCAAGTG	117	94°C/ 1 min; 52°C/ 30 s; 72°C/ 30 s	[1]
<i>thyA</i>	F GCAATGACTACACTGCTATTGG R GAGGTGTTATCGCATATGTTG	957	94°C/ 45 s; 56°C/ 45 s; 72°C/ 45 s	This study
<i>mecA</i>	F TCCAGATTACAACCTCACCAGG R CCACTTCATATCTTGTAACG	162	94°C/ 1 min; 52°C/ 30 s; 72°C/ 30 s	[2]
<i>ermA</i>	F TCTAAAAAGCATGTAAAAAGAA R CTTCGATAGTTTATTAATATTAGT	645	94°C/ 30 s; 52°C/ 1 min; 72°C/ 1,5 min	[3]
<i>ermB</i>	F GAGTGAAAAGGTACTIONCAACCAAATAA R TTGGTGAATTAAGTGACACGAA	208	94°C/ 30 s; 52°C/ 1 min; 72°C/ 1,5 min	[4]
<i>ermC</i>	F TCAAAACATAATATAGATAAA R GCTAATATTGTTAAATCGTCAAT	642	94°C/ 30 s; 47°C/ 1 min; 72°C/ 1,5 min	[5]
<i>msrA</i>	F TATAGCGCTCGTAGGTGCAA R GTTCTTTCCCACTCAAA	270	94°C/ 1 min; 52°C/ 30 s; 72°C/ 30 s	[4]
<i>msrB</i>	F TGTGGATGGCCTAGCTTTTC R TCGCCATAACCAATTCTTC	230	94°C/ 1 min; 52°C/ 30 s; 72°C/ 30 s	[4]

REFERENCES

- [1] Silbert S, Menezes SC, Monteiro J, Ribeiro MGC, Pereira SC, Pignatari ACC, Screening of MRSA: A Comparison between One and Multiple Sites Sample Collection Using the New ESwab MRSA Collection Kit™, 109th General Meeting, American Society for Microbiology, Philadelphia, PA, 2009.
- [2] Oliveira DC, de 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* (2002);46:2155-61.
- [3] McDougal LK, Fosheim GE, Nicholson A, Bulens SN, Limbago BM, Shearer JE, et al. Emergence of resistance among USA300 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates causing invasive disease in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* (2010);54:3804-11.
- [4] 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* (2013);303:61-9.
- [5] Chen J, Yu Z, Michel FC, Jr., 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* (2007);73:4407-16.

APENDICE 3 - TERCEIRO ARTIGO – em correção: Role of thymidine-dependent *Staphylococcus aureus* in the lung function and nutritional status of patients with Cystic Fibrosis, a restrospective case-control study

Revista a ser submetido: Journal of Cystic Fibrosis

Role of thymidine-dependent *Staphylococcus aureus* in the lung function and nutritional status of patients with Cystic Fibrosis, a retrospective case-control study

Dilair Camargo de Souza^{*,1,2}, Laura Lúcia Cogo¹, Jussara Kasuko Palmeiro^{3,4}, Ana Paula de Oliveira Tomaz^{1,4}, Keite da Silva Nogueira^{1,5}, Ricardo Rasmussen Petterle⁶, Libera Maria Dalla-Costa⁴, Carlos Antônio Riedi⁷, Nelson Augusto Rosário Filho^{2,7}

¹ Laboratório de Bacteriologia, Complexo Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil

² Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil

³ Departamento de Análises Clínicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil

⁴ Faculdades e Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe, Curitiba, Paraná, Brasil

⁵ Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil

⁶ Departamento de Medicina Integrativa, Complexo Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil

⁷ Departamento de Pediatria, Complexo Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil

*Corresponding author. Rua Padre Camargo, 280, 1º andar, 80060-240, Alto da Glória, Curitiba, Paraná, Brazil. Tel. 55 (41) 3360-7975. E-mail address: dilair.souza@hc.ufpr.br

Keywords: *S. aureus*; TD-SCVs; Antropometria, Função pulmonar

Resumo

Introdução: A exacerbação pulmonar é uma das manifestações graves em pacientes com Fibrose Cística (FC), que está relacionada a muitos microorganismos, entre eles *Staphylococcus aureus*. Tem se observado que em pacientes com FC colonizados por esta bactéria, as colônias variantes pequenas de *S. aureus* dependente de timidina (TD-SCVs) estão sendo isoladas com maior frequência e associadas a outros microorganismos, podem ocasionar em perda da função pulmonar e desnutrição. O objetivo desse trabalho foi avaliar as relações entre o isolamento de TD-SCVs e o estado nutricional e a função pulmonar dos pacientes com FC, bem como avaliar o uso de sulfametoxazol-trimetoprim (TMP/SMX) no surgimento desse grupo de micro-organismos.

Métodos: Foi elaborado um estudo de caso controle 1:2 em pacientes com FC, atendidos no período de 2013 a 2018 nos ambulatórios de FC do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná. Os dados demográficos, clínicos, espirométricos, antropométricos e microorganismos isolados foram coletados dos prontuários e analisados por métodos estatísticos.

Resultados: Dos 246 pacientes atendidos, 57 foram incluídos no estudo, sendo 19 casos (grupo TD-SCVs) e 38 controles (sem TD-SCVs), 58% eram do sexo masculino, e a mediana de idade de 11 anos. Foram encontradas associações positivas entre o uso de TMP-SXM e surgimento de TD-SCVs ($p < 0,001$), isolamento de TD-SCVs e alteração da função pulmonar pela avaliação do Volume Expiratório Forçado em 1 segundo, dos valores de VEF₁/L ($p 0,03$) e VEF₁% ($p 0,05$), internações e isolamento de TD-SCVs ($p 0,004$), isolamento de TD-SCVs e *Stenotrophomonas maltophilia* ($p 0,03$). O estado nutricional e de função pulmonar mostrou que 18,5% do grupo TD-SCVs tinham baixo peso e função pulmonar em estado grave em relação a 3,0% do grupo controle.

Conclusões: O surgimento de TD-SCVs demonstrou estar relacionado com a perda da função pulmonar e déficit do estado nutricional, impactando na qualidade de vida dos pacientes com FC.

Palavras chaves: *S. aureus*; TD-SCVs; Antropometria, Função pulmonar

1. Introdução

A Fibrose Cística (FC) é uma doença considerada multissistêmica, que acomete os sistemas digestório, reprodutivo e respiratório (Ratjen; Döring, 2003). No trato respiratório estão relacionadas com broncopatias crônicas obstrutivas causadas por infecções recorrentes (Bucher, 2016). A enfermidade é de origem genética, causada por mutações no gene *Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator (CFTR)*, o qual codifica para canais proteicos que transportam os íons cloreto para o exterior das células (ROMMENS et al., 1989).

Devido à hipertonicidade de íons cloreto no pulmão, ocorre a produção de muco espesso que favorece a colonização e a infecção por diferentes microorganismos. Entre eles as bactérias, sendo reconhecidas como importantes patógenos *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, complexo *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Achromobacter xylosoxidans* (JUNGE et al., 2016; WOLTER et al., 2013; DUPONT et al., 2017).

O patógeno *Staphylococcus aureus* costuma ser encontrado como o agente envolvido nas primeiras infecções pulmonares de pacientes com FC (Dodémont, 2019). Tem se observado que em pacientes com FC colonizados por esta bactéria, as colônias variantes pequenas (do inglês *Small Colony Variants - SCVs*) de *S. aureus* estão sendo isoladas com maior frequência (MELTER; RADOJEVIC, 2010). O termo SCVs refere-se a muitas condições que causam a indução e a seleção deste tipo fenotípico, entre eles o auxotrofismo que determinam a dependência à hemina, menadiona e timidina (KAHL et al., 2016).

Os SCVs deficientes de timidina (TD-SCVs) sofrem mutações no gene *thyA*, gene que codifica a produção da proteína timidilato sintase, que é essencial para a síntese do DNA bacteriano (KRIEGESKORTE et al., 2014). TD-SCVs estão associados ao uso prolongado de sulfametoxazol-trimetoprim (TMP-SMX), promovendo resistência a este antimicrobiano

(KRIEGESKORTE et al., 2015). Em alguns isolados ocorre a reversão do fenótipo SCV para o fenótipo normal, fenômeno que pode estar relacionado com as infecções recidivantes (KITTINGER et al., 2019) e difícil tratamento (DODÉMONT et al., 2019).

O fenótipo TD-SCV é mais comumente isolado de amostras clínicas de pacientes com FC (Kittinger, 2019), e já foi demonstrado em alguns estudos que quando co-infectados com outros microorganismos como *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Achromobacter xylosoxidans* podem levar a piora ou ainda falha da função pulmonar (Wolter et al., 2013; Junge et al., 2016).

Para avaliar a função pulmonar, o exame de espirometria é realizado a partir dos 5 anos de idade (ATHANAZIO et al., 2017), tornando-se um teste diagnóstico importante para o controle da doença pulmonar (HEINZMANN-FILHO et al., 2015). A avaliação da função pulmonar tem na observação do declínio de VEF₁, um marcador de maior risco de hospitalização e mortalidade (Heinzmann, 2015; Ramsey, 2014).

Outra manifestação clínica apresentada nos pacientes com FC associada à deteriorização da função pulmonar é a desnutrição, a qual muitas vezes é originária da disfunção pancreática e infecções crônicas apresentadas, impactando na redução da sobrevivência desses indivíduos. Assim, é importante que os pacientes também sejam acompanhados quanto ao estado nutricional pelo monitoramento dos dados antropométricos de peso e altura relacionados à idade e gênero (HAUSCHILD et al., 2018).

Considerando que FC é uma doença de morbidade importante e que ainda apresenta uma alta taxa de mortalidade nos primeiros anos de vida, muitas vezes relacionada às infecções, ampliar o conhecimento quanto aos mecanismos do surgimento de TD-SCVs de *S. aureus* e associar com a clínica poderá contribuir na melhora do prognóstico desses pacientes.

O objetivo principal desse trabalho foi determinar o isolamento de TD-SCVs e sua relação com o estado nutricional e a função pulmonar dos pacientes com FC. Porém, também

foram avaliadas a possibilidade de associações entre o surgimento de TD-SCVs, o uso de TMP/SMX e os principais microorganismos encontrados.

2. Métodos

2.1. Caso-Controle

Foram atendidos 246 pacientes nos ambulatórios de Fibrose Cística do Complexo Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, no período de julho de 2013 a julho de 2018. Para o estudo de caso-controle foram selecionados 57 pacientes com FC, determinando uma relação de 1:2. A presença de TD-SCVs foi determinada a partir de culturas do trato respiratório (amostras de escarro ou *swab* de orofaringe). Os pacientes que apresentaram pelo menos uma cultura positiva para TD-SCVs foram definidos como grupo TD-SCV (n = 19) em comparação ao grupo controle (n = 38), quando os pacientes apresentaram cultura negativa para TD-SCVs. A escolha dos indivíduos do grupo controle levou em consideração sexo, idade e isolamento de *S. aureus*.

2.2. Dados Clínicos e Microbiológicos

As informações pessoais, clínicas e de exames dos pacientes foram obtidas através da busca em prontuários. Foram considerados idade, gênero, testes de detecção da FC (Tripsinogênio Imunorreativo - ITR, eletrólitos no suor e mutações no gene *CFTR*), bronquiectasias, insuficiência pancreática, internações, óbito, dados antropométricos, valores espirométricos e tratamento com TMP-SXM. Também foram anotadas a presença dos microorganismos *S. aureus*, *P. aeruginosa*, Complexo *B. Cepacia*, *A. xylosoxidans*, *S. maltophilia* e *Aspergillus* spp. isolados a partir das amostras respiratórias no período de 2

anos, considerando um ano até o isolamento de TD-SCVs e um ano depois. A frequência de co-infecção ou colonização entre os microorganismos e TD-SCVs considerou apenas os microorganismos isolados após o seu surgimento.

Os parâmetros da função pulmonar foram expressos em Volume Expiratório Forçado em um segundo - VEF₁ (L) e VEF₁% do previsto, obtidos através do exame de espirometria. O teste foi realizado de acordo com o padrão estabelecido pela *American Thoracic Society* (AST) (CFF, 2019).

A análise de dados antropométricos foi realizada de acordo com a padronização do Center Disease Control (CDC) e que são recomendados para pacientes com FC (CFF, 2019), considerando a interpretação dos percentis do Índice de Massa Corporal (IMC/I) para crianças e adolescentes com idades de 2 a 19 anos, e o valor do IMC para adultos com idades superiores a 20 anos.

2.3. Análise Estatística

Foram realizados testes estatísticos para os dados demográficos, clínicos, espirométricos, antropométricos e dos microorganismos isolados. Para os microorganismos foi avaliado se havia associação entre eles, associação entre cada micro-organismo e o isolamento de TD-SCVs, e a associação entre a co-infecção de TD-SCVs com cada um dos microorganismos e o decréscimo da função pulmonar, utilizando os resultados do VEF₁ absoluto e do VEF₁ percentual do previsto.

A análise descritiva dos dados foi feita por meio de frequência absoluta (n) e relativa (%) para variáveis qualitativas; média, mediana, desvio padrão e amplitude (mínimo-máximo) para variáveis quantitativas. A normalidade dos dados foi investigada pelo teste de Shapiro-Wilk, e possíveis associações entre as variáveis foram obtidas pelos testes Exato de Fisher e Qui-quadrado. Além disso, possíveis diferenças entre variáveis quantitativas foram avaliadas

pelo teste de Mann-Whitney. O nível de significância adotado no estudo foi de 5% ($p < 0.05$). Toda análise dos dados foi feita no software estatístico R (R Core Team, 2020) versão 3.6.3.

2.4. Ética

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas em Seres Humanos (CEP) do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC/UFPR) sob o número CAAE 45063115.9.0000.0096, seguindo as normas da Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde. A obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi dispensada por se tratar de um estudo retrospectivo.

3. Resultados

Do total de 246 pacientes atendidos pelo serviço de FC do CHC-UFPR, em 208 (85%) isolou-se *S. aureus* a partir das amostras respiratórias. Destes em 23 (11%) foi isolado TD-SCVs. Foram excluídos do estudo 3 pacientes dos quais não tivemos acesso aos prontuários e um paciente com 57 anos por não ter com quem comparar os dados, totalizando os 19 pacientes denominados grupo TD-SCVs. As medianas de idade foram de 11 anos (amplitude de 5 a 26) e 12.5 anos (amplitude de 3 a 24) nos grupos TD-SVCs e controle respectivamente.

As análises estatísticas mostraram associações positivas entre o uso de TMP-SMX e surgimento de TD-SCVs e internações e o isolamento deste fenótipo. Ocorreu também associação entre o estado nutricional e a função pulmonar, como apresentado na Tabela 1, onde estão sumarizadas as características demográficas e clínicas dos pacientes.

TABELA 1 - CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS, CLÍNICAS, FREQUÊNCIA E ASSOCIAÇÕES DOS MICROORGANISMOS ISOLADOS.

Variáveis	Grupo TD-SCVs	Grupo Controle	p-valor
	n=19 (%)	n=38 (%)	
Idade em anos (média/mediana)	13.7 /11	13.3/11	-
Gênero masculino	11 (58.0)	22 (58.0)	1.00
Mutação gene <i>CFTR</i>			
F508del	9 (52.9)	22 (62.9)	0.621
G542X	5 (29.4)	12 (34.3)	0.832
Homozigote (F508del + G542X)	3 (17.6)	11 (31.4)	0.477
Outras mutações	6 (35.3)	5 (14.3)	0.249
Insuficiência pancreática	17 (89.5)	35 (92.1)	0.741
Bronquiectasia	17 (89.5)	30 (78.9)	0.419
Internações	7 (36.8)	2 (5.26)	0.004
Alteração em VEF₁%	9 (53.0)	4 (11.4)	<0.001
Óbitos	3 (15.8)	1 (2.6)	0.103
Uso de TMP/SMX	14 (73.7)	8 (21.0)	< 0.001
Espirometria x Antropometria			
VEF ₁ % x IMC/idade	12 (80.0)	25 (86.2)	0.037
Co-infecção			
<i>P. aeruginosa</i>	9 (47.4)	19 (50.0)	1.00
<i>C. B. cepacia</i>	5 (26.3)	5 (13.2)	0.275
<i>A. xylooxidans</i>	1 (5.26)	3 (7.90)	1.00
<i>S. maltophilia</i>	7 (36.8)	4 (10.5)	0.03
<i>Aspergillus</i> spp	4 (21.1)	9 (23.7)	1.00
VEF₁% alterado x <i>S. maltophilia</i>	5 (33.3)	3 (8.8)	0.459

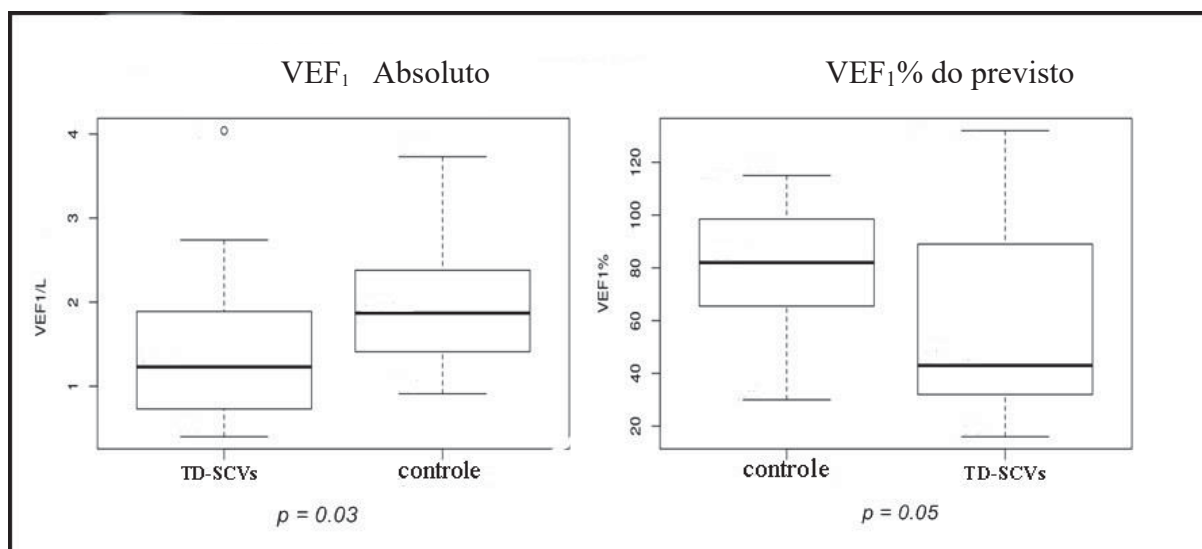
A mutação F508del foi a mais encontrada entre os grupos TD-SCVs e controle, seguida pela mutação G542X. Porém, não foi encontrada associação positiva entre o surgimento de TD-SCVs e o tipo de mutação apresentada.

Ao avaliar a frequência do isolamento dos microorganismos, *S. aureus* foi o microorganismo mais isolado entre os 57 pacientes e *P. aeruginosa* o mais presente na co-infecção ou colonização com TD-SCVs. Porém, com exceção de TD-SCVs e *S. maltophilia* com valor de *p* significativo, não foi encontrada associação positiva de co-infecção entre os demais microorganismos. Não houve associação positiva quando comparado a co-infecção de TD-SCVs e *S. maltophilia* com o Distúrbio Ventilatório Obstrutivo (DVO), pela análise do VEF₁%.

Na avaliação de cada microorganismos com a alteração de VEF₁ no total de 49 pacientes, somente para TD-SCVs e *Aspergillus* spp apresentou associação com a alteração da espirometria. *Aspergillus* spp foi isolado em 12 (24.5%) dos pacientes e destes 11 (91.6%) com a função pulmonar alterada, com valor de *p* 0.016.

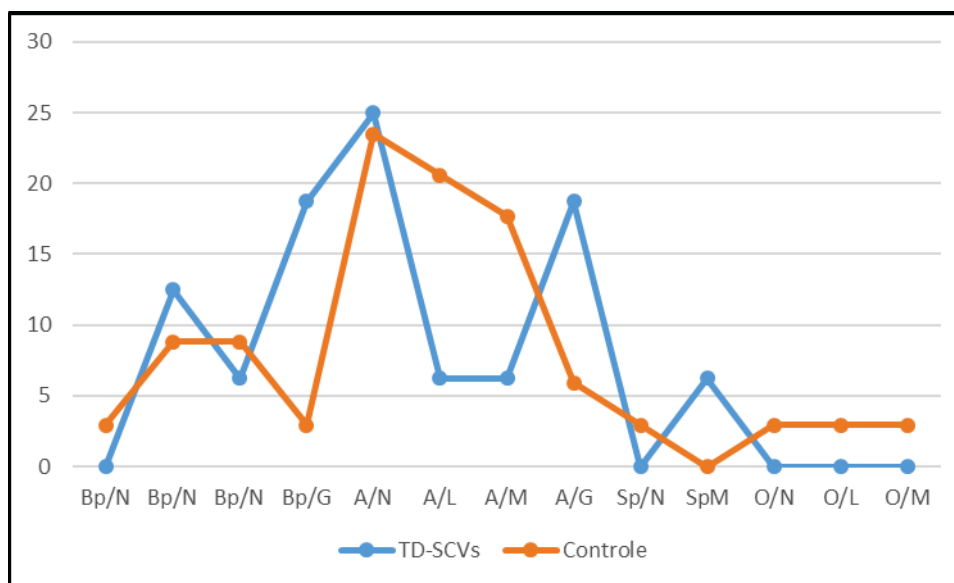
A perda da função pulmonar pela análise de VEF₁ (absoluto e % do previsto) estava associada com o isolamento de TD-SCVs, como demonstrado na Figura 2.

FIGURA 2 - MEDIANA DO VOLUME EXPIRATÓRIO FORÇADO – VEF₁ (ABSOLUTO E % PREVISTO) NO PERÍODO DE SURGIMENTO DO TD-SCVs – (N = 43)



A análise dos dados antropométricos demonstrou que 9 de 16 (56.3%) pacientes do grupo TD-SCVs e 22 de 34 (64.7%) do grupo controle estavam dentro dos limites da normalidade para o estado nutricional. E quando comparado, segundo as classificações utilizadas para categorizar o DVO pela análise do VEF₁ na espirometria (de normal a muito severa), e as classificações do estado nutricional considerando os índices dos dados antropométricos IMC/I e P/I (de sobre-peso a baixo peso), para pacientes menores de 20 anos, observou-se que houve correlação entre a função pulmonar e o estado nutricional (Tabela 1). E que 18,5% do grupo TD-SCVs tinham baixo peso e função pulmonar em estado grave em relação a 3,0% do grupo controle, como representado na Figura 3.

FIGURA 3 – AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DA ANTROPOMETRIA (IMC/I – PERCENTIL E IMC) COM A ESPIROMETRIA (VEF₁ %)



Legenda: Antropometria (IMC): Baixo peso (Bp), Adequado (A), Sobrepeso (Sp), Obeso (O).
Espirometria (VEF₁%): Normal (N), Leve (L), Moderado (M), Grave (G).

4. Discussão

Nós realizamos um estudo de caso-controle com pacientes colonizados/infectados por TD-SCVs atendidos em um grande centro de referência em FC e os achados são únicos em nosso país. O estudo chama a atenção para TD-SCVs, um patógeno emergente associado a infecções crônicas e que pode influenciar o curso da doença ao longo do tempo.

No período em que se realizou a pesquisa, foi encontrada uma prevalência de 11% do fenótipo TD-SCVs nos pacientes com FC, assim como observado no estudo de Schwerdt et al., (2018). A mediana do surgimento desse fenótipo é variável de acordo com o grupo etário estudado. Em nosso estudo a mediana do surgimento de TD-SCVs (11 anos) ficou próxima às encontradas por Wolter et al., 2013 e Yagci et al., 2013, os quais verificaram 9,1 anos e 14,4

anos respectivamente. Porém Morelli et al., 2015 encontrou uma mediana mais elevada (23 anos).

Em relação às variáveis analisadas, não encontramos associação positiva para os dados clínicos de insuficiência pancreática e bronquiectasia, porém o grupo TD-SCVs necessitou mais de internações, devido a exacerbações mais graves e piora da função pulmonar, uma vez que ocorreu associação entre estas duas variáveis. O número de óbitos entre os pacientes do grupo TD-SCVs e grupo controle não apresentaram associação significativa, porém, ocorreram mais óbitos no grupo TD-SCVs. Não encontramos na literatura descrição de dados correlacionando o isolamento de TD-SCVs e óbito.

Em nosso estudo o uso de TMP-SMX foi significativamente maior no Grupo TD-SCVs e como já descrito por outros pesquisadores (Krigeskorte *et al.*, 2015; Suwantarat et al., 2018; Esposito et al., 2019), foi confirmado como um fator de risco para o surgimento deste fenótipo. O antimicrobiano TMP-SMX é comumente utilizado no tratamento de *S. aureus* MRSA, *C. B. cepacia* e *S. maltophilia* (Wolter et al., 2013), microorganismos muitas vezes isolados em pacientes com FC (CFF 2019).

A frequência dos microorganismos isolados no período do estudo não apresentou diferença estatística entre os dois grupos, provavelmente por se tratar em ambos os grupos de pacientes com FC e que apresentam as mesmas chances de exposição/colonização aos microorganismos. O microorganismo mais encontrado foi *S. aureus*, sendo os fenótipos (normal e SCV) de *S. aureus* MRSA pouco isolados entre os pacientes, porém o isolamento entre pacientes com FC tem aumentado em todo o mundo associado com perda acelerada da função pulmonar e maior mortalidade (Dodémont et al., 2019).

Nos últimos anos tem se observado que a colonização/infecção por *S. aureus* está mais frequente do que *P. aeruginosa* (CFF, 2019), que foi a segunda bactéria mais isolada com prevalência semelhante entre os grupos TD-SCVs (52.6%) e grupo controle (68.4%),

apresentando prevalência próxima a encontrada entre os casos (43%) no estudo de Berdah et al, (2017). O ambiente pulmonar hipóxico favorece a co-infecção entre *S. aureus* e *P. aeruginosa* em pacientes com FC causando perda da função pulmonar e aumento das exacerbações (PALLET et al., 2019).

Associação positiva de co-infecção entre os microorganismos foi encontrada somente para TD-SCVs e *S. maltophilia* ($p=0.03$), mas quando comparado o isolamento concomitante destas duas bactérias causando DVO pela alteração de VEF₁%, não se observou associação entre estas características, provavelmente, devido ao baixo número de pacientes. No estudo de Berdah et al., (2017), foi observado um declínio de VEF₁ nas infecções por *S. maltophilia*, assim como Junge et al., 2016 observaram que o isolamento de TD-SCVs e *S. maltophilia* estavam associados com a piora da função pulmonar.

O isolamento de *Aspergillus* spp estava associado positivamente com a alteração da função pulmonar, assim como encontrado por Junge et al., 2016. O micro-organismo *Aspergillus* spp é encontrado normalmente no meio ambiente, tornando-se patógeno oportunista em pacientes com FC. O isolamento de *Aspergillus* spp está associado ao uso de macrolídeos e corticosteróides inalados em pacientes com FC (Hong et al., 2018).

Através da análise dos valores absolutos de VEF₁ (L) e percentual do previsto, foi significativo o isolamento de TD-SCVs e a redução da função pulmonar, como já relatado por outros pesquisadores (Wolter et al., 2013), o que pode explicar o maior número de internações por exacerbação pulmonar destes pacientes.

Em relação ao estado nutricional, encontramos associação com a função pulmonar, como descrito por Hauschild et al., (2018). Embora os dados antropométricos demonstraram que a maioria dos pacientes do grupo TD-SCVs e grupo controle estavam dentro dos limites da normalidade, 18,5% dos pacientes com TD-SCVs tinham baixo peso e função pulmonar em estado grave em relação a 3,0% dos pacientes do grupo controle.

É importante ressaltar que a pesquisa pode apresentar limitações nos dados estatísticos, relacionadas ao pequeno número de amostras, porém TD-SCVs é ainda pouco diagnosticado em pacientes com FC, e raros estudos têm demonstrado o impacto das infecções por este fenótipo.

5. Conclusão

O uso de TMP/SMX provavelmente contribuiu para o surgimento do fenótipo TD-SCV, e seu isolamento demonstrou relação direta sobre o estado nutricional e pulmonar dos pacientes com FC estudados. Apesar de existirem inúmeras pesquisas sobre o auxotrofismo em *S. aureus* e sua importância, este tema ainda não é de conhecimento amplo entre os microbiologistas e clínicos, impactando na qualidade de vida dos pacientes.

Declaração de Conflito de Interesse

Nenhuma.

Financiamento

Esta pesquisa não recebeu nenhuma doação específica de agências de fomento nos setores público, comercial ou sem fins lucrativos.

Referências

1. Ratjen F, Döring Gerd. Cystic fibrosis. *Lancet* (2003);361(9358):681-9.
2. Bucher J, BoellePY, Hubert D, Lebourgeois M, Stremmler N, Durieu I. Lessons from a French collaborative case-control study in cystic fibrosis patients during the 2009 A/H1N1 influenza pandemic. *BMC Infect Dis* (2016);16:55.

3. Dodémont M, Argudín MA, Willekens J, Vanderhelst E, Pierard D, Miendje Deyi VY. Emergence of livestock-associated MRSA isolated from cystic fibrosis patients: Result of a Belgian national survey. *J Cyst Fibros* (2019);18:86-93.
4. Kittinger C, Toplitsch D, Folli B, Masoud Landgraf L, Zarfel G. Phenotypic Stability of *Staphylococcus aureus* Small Colony Variants (SCV) Isolates from Cystic Fibrosis (CF) Patients. *Int J Environ Res Public Health* (2019);16:1940; doi:10.3390/ijerph16111940
5. Kriegeskorte, A.; Lore, N.I.; Bragonzi, A.; Riva, C.; Kelkenberg, M.; Becker, K.; Proctor, R.A.; Peters, G.; Kahl, B.C. Thymidine-Dependent *Staphylococcus aureus* Small-Colony Variants are Induced by Trimethoprim-Sulfamethoxazole (SXT) and have Increased Fitness during SXT Challenge. *Antimicrob. Agents Chemother* (2015); 59:7265-7272.
6. Proctor RA, Kriegeskorte A, Kahl BC, Becker, K, Löffler B, Peters G. *Staphylococcus aureus* Small colony variants (SCVs): A Road map for the metabolic pathways involved in persistent infections. *Front Cel Infect Microbiol* 2014;4(99).
7. Wolter DJ, Emerson JC, McNamara S, Buccat AM, Qin S, Cochrane E, *et al.* *Staphylococcus aureus* Small-Colony Variants Are Independently Associated With Worse Lung Disease in Children With Cystic Fibrosis. *Clin. Infectious Dis.* 2013;57(3):384-91.
8. Junge S, Görlich D, den Reijer M, Wiedemann B, Tu"mmmler B, Ellemunter H, *et al.* (2016) Factors Associated with Worse Lung Function in Cystic Fibrosis Patients with Persistent *Staphylococcus aureus*. *PLoS ONE* (2016);11(11): e0166220. doi:10.1371/journal.pone.0166220

9. Heinzmann-Filho JP, Pinto LA, Marostica PJC, Donadio MVF. Variação na função pulmonar está associada com piores desfechos clínicos em indivíduos com fibrose cística. *J. Bras. Pneumol* (2015);41(6):509-515.
10. Ramsey KA, Sarath Ranganathan S, Park J, Skoric B, Adams AM, Simpson SJ, et al. Early Respiratory Infection Is Associated with Reduced Spirometry in Children with Cystic Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* (2014);190(10):1111-1116.
11. Savant AP, McColley SA. Cystic fibrosis year in review 2018, part 2. *Pediatr Pulmonol* (2019);54:1129-1140.
12. Hauschild DB, Rosa AF, Ventura JC, Barbosa E, Moreira EAM, Ludwig Neto, N. Association of Nutritional Status With Lung Function and Morbidity in Children and Adolescents with Cystic Fibrosis: A 36-Month Cohort. *Rev Paul Pediatr* (2018);36(1):31-38.
13. de Souza DC, Cogo LL, Palmeiro JK, Dalla-Costa LM, de Oliveira Tomaz AP, Riedi CA, et al. Thymidine-auxotrophic *Staphylococcus aureus* small-colony variant bacteremia in a patient with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* (2020);55:1388-99.
14. Maduka-Ezeh A, Seville MT, Kusne S, Vikram HR, Blair JE, Greenwood-Quaintance K, et al. Thymidine auxotrophic *Staphylococcus aureus* small-colony variant endocarditis and left ventricular assist device infection. *J Clin Microbiol* (2012);50:1102-5.
15. Lee J, Zilm PS, Kidd SP. Novel Research Models for *Staphylococcus aureus* Small Colony Variants (SCV) Development: Co-pathogenesis and Growth Rate. *Front. Microbiol* (2020);11(21).
16. Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry. 2018 Annual Data Report Bethesda, Maryland. 2019 Cystic Fibrosis Foundation.

17. Limoli DH, Hoffman LR. Help, hinder, hide and harm: what can we learn from the interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* during respiratory infections? *Thorax* (2019);74:684–92.
18. Kahl BC, Becker K, Löffler B. Clinical Significance and Pathogenesis of Staphylococcal Small Colony Variants in Persistent Infections. *Clin Microbiol Rev* 2016;29(2):401-27.
19. GRUPO BRASILEIRO DE ESTUDOS DE FIBROSE CÍSTICA. Registro Brasileiro de Fibrose Cística. Relatório Anual de 2014. Disponível em www.portalgbefc.org.br
20. R Core Team (2020). R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
21. Schwerdt M, Neumanna C, Schwartbeck B, Kampmeier S, Herzoga S, Görlich D. G. *Staphylococcus aureus* in the airways of cystic fibrosis patients – A retrospective long-term study. *Int J Med Microbiol* (2018);308:631–639.
22. Yagci S, Hascelik G, Dogru D, Ozcelik U, Sener B. Prevalence and genetic diversity of *Staphylococcus aureus* small-colony variants in cystic fibrosis patients. *Clin Microbiol Infect* (2013);19:77-84.
23. 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* (2015);38:235-43.
24. Santos GP, Santos C, Domingos MT, Wittig EO, Riedi CA, Rosário NA. Programa de triagem neonatal para fibrose cística no estado do Paraná: avaliação após 30 meses de sua implantação. *J Pediatr* (2005);81(3). <https://doi.org/10.2223/JPED.1333>

25. Casals T, Nunes V, Palacio A, Giménez J, Gaona, A, Ibáñez N. Cystic fibrosis in Spain: high frequency of mutation G542X in the Mediterranean coastal area. *Human Genetics* (1993);9:66-70.
26. Suwantarant N, Rubin M, Bryan L, Tekle T, Boyle MP, Carroll KC, et al. Frequency of small-colony variants and antimicrobial susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in cystic fibrosis patients. *Diagn Microbiol Infect Dis* (2018);90: 296-299.
27. Esposito S, Pennoni G, Mencarini V, Palladino N, Peccini L and Principi N. Antimicrobial Treatment of *Staphylococcus aureus* in Patients With Cystic Fibrosis. *Front Pharmacol* (2019);10:849.
28. Berdah L, Taytard J, Leyronnas S, Clement A, Boelle PY, Corvol H. *Stenotrophomonas maltophilia*: A marker of lung disease severity. *PediatrPulmonol* (2018);53:426–430.
29. Pallet R, Leslie LJ, Lambert PA, Milic I, Devitt A, Lindsay J. Marshall Lj. Anaerobiosis influences virulence properties of *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates and the interaction with *Staphylococcus aureus*. *Scientific Reports* (2019);9. 6748 doi.org/10.1038/s41598-019-42952-x
30. Scoffone VC, Chiarelli LR, Trespidi G, Mentasti M, Riccardi G and Buroni S. *Burkholderia cenocepacia* Infections in Cystic Fibrosis Patients: Drug Resistance and Therapeutic Approaches. *Front. Microbiol* (2017);8:1592. doi: 10.3389/fmicb.2017.01592
31. Hong G, Psoter KJ, Jennings MT, Merlo CA, Boyle MP, Hadjiliadis D, et al. Risk factors for persistent *Aspergillus* respiratory isolation in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* (2018);17(5): 624-630.

32. Granchelli AM, Adler FR, Keogh RH, Kartsonaki C, Cox DR, Liou TG. Microbial interactions in the cystic fibrosis airway. *J Clin Microbiol* (2018);56:e00354-18. <https://doi.org/10.1128/JCM.00354-18>
33. Guérillot R, Kostoulas X, Donovan L, Li L, Carter GP, Hachani A. Unstable chromosome rearrangements in *Staphylococcus aureus* cause phenotype switching associated with persistent infections. *PNAS* (2019);116(40):20135-20140.
34. 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* (2007);45:168-72.

5 CONCLUSÃO

- Os isolados de TD-SCVs apresentaram diferentes tipos de mutações no gene *thyA*. As mutações do tipo *frameshift* foram as mais frequentes no fenótipo estável. Já no fenótipo reversível foram evidenciadas mutações *missense* não conservativas.
- As linhagens ST5 e ST398 foram identificadas entre os isolados. Essas linhagens são as mais frequentes no Brasil, sendo que o ST398 é relacionado com maior virulência. Porém, há uma limitação a ser considerada, o fato de que a genotipagem foi realizada somente para os isolados com os genótipos definidos como SCVs.
- A presença de TD-SCVs foi associada com a perda da função pulmonar e o estado nutricional dos pacientes com FC, não apresentando relação com a co-infecção com outros microorganismos.
- O fenótipo TD-SCVs apresentou a capacidade de persistir no trato respiratório de alguns pacientes, sendo associado às exacerbações pulmonares.
- O diagnóstico laboratorial de TD-SCVs pode contribuir na conduta terapêutica, prevenindo uma evolução clínica desfavorável e melhorando a qualidade de vida dos pacientes com FC.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo permitiu observar que apesar de várias técnicas terem sido empregadas para esclarecer os mecanismos envolvidos no surgimento e características clínicas dos pacientes, análise do genoma ainda será necessário para elucidar algumas características do fenótipo apresentado e o genótipo encontrado em TD-SCVs.

REFERÊNCIAS

- ABDA, E. M.; et al. Phenotypic Heterogeneity Affects *Stenotrophomonas maltophilia* K279a Colony Morphotypes and β -Lactamase Expression. **Front. Microbiol.**, v. 6, 2015.
- ALGHAMDI, N. S.; et al. Serum IgE and IgG reactivity to *Aspergillus* recombinant antigens in patients with cystic fibrosis. **J. Med. Microbiol.**, v. 68, p. 924–929, 2019.
- ALMUZARA, M.; et al. In vitro susceptibility of *Achromobacter* spp. isolates: comparison of disk diffusion, Etest and agar dilution methods. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 35, p. 68–71, 2010.
- ANDRADE, E. F.; et al. Avaliação evolutiva da espirometria na fibrose cística. **J. Pneumol.**, v. 27, n. 3, p. 130-136, 2001.
- ARMBRUSTER, C. R.; et al. *Staphylococcus aureus* protein A mediates interspecies interactions at the cell surface of *Pseudomonas aeruginosa*. **mBio**, v. 7, n. 3, 2016.
- ATHANAZIO, R. A.; et al. Diretrizes brasileiras de diagnóstico e tratamento da fibrose cística. **J. Bras. Pneumol.**, v. 43, n. 3, p. 219-245, 2017.
- BEAUDOIN, Y. C. W.; et al. *Staphylococcus aureus* interaction with *Pseudomonas aeruginosa* biofilm enhances tobramycin resistance. **npj Biofilms and Microbiomes**, v. 3, n. 25, 2017.
- BESIER, S.; 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. (a)
- BESIER, S.; et al. Molecular analysis of the thymidine-auxotrophic small colony variant phenotype of *Staphylococcus aureus*. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 297, p. 217-225, 2007. (b)
- BISWAS, L.; et al. Small-Colony Variant Selection as a Survival Strategy for *Staphylococcus aureus* in the Presence of *Pseudomonas aeruginosa*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 75, p. 6910–6912, 2009.
- BOECK, K. Cystic fibrosis in the Year 2020: A disease with a new face. **Acta Paediatrica**, v. 109, p. 893–899, 2020.
- BRAKSTAD, O. G.; AASBAKK, K.; MAELAND, J. Á. Detection of *Staphylococcus aureus* by Polymerase Chain Reaction Amplification of the nuc Gene. **J. Clin. Microbiol.**, v. 30, n. 7, p. 1654-1660, 1992.
- BROOKE, J. S. *Stenotrophomonas maltophilia*: an Emerging Global Opportunistic Pathogen. **Clin. Microbiol. Rev.**, p. 2–41, 2012. doi:10.1128/CMR.00019-11

- BURNS, J. L.; ROLAIN, J. M. Culture-based diagnostic microbiology in cystic fibrosis: Can we simplify the complexity? **J. Cyst. Fibros.**, v. 13, p. 1–9, 2014.
- CARRARO, D. S.; et al. *Burkholderia cepacia*, cystic fibrosis and outcomes following lung transplantation: experiences from a single center in Brazil. **Clinics**, v. 73:e166, 2018.
- CHATTERJEE, I.; et al. In Vivo Mutations of Thymidylate Synthase (Encoded by *thyA*) Are Responsible for Thymidine Dependency in Clinical Small-Colony Variants of *Staphylococcus aureus*. **J. Bacteriol.**, v. 190, n.3, p. 834-842, 2008.
- CHAVES, F. Infecções por variantes de colônias pequenas de *Staphylococcus aureus*: implicações clínicas e microbiológicas. **Enferm. Infec. Microbiol. Clin.**, v. 32, n. 2, p. 67-69, 2014.
- CHERNISHEV, A. C. A. **Diversidade genética e fatores de virulência de *Stenotrophomonas maltophilia*, complexo *Burkholderia cepacia* e *Achromobacter xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans* isolados do trato respiratório de pacientes portadores de fibrose cística.** Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências. S. Paulo, 2008.
- COUTINHO, C. A. A. C.; et al. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mutations at a referral center for cystic fibrosis. **J. Bras. Pneumol.**, v. 39, n. 5, p. 555-561, 2013.
- CROSSLEY, J. R.; ELLIOTT, R. B.; SMITH, P. A. Dried-blood spot screening for cystic fibrosis in the newborn. **Lancet.**, v. 1, n. 8114, p. 472-474. 1979.
- CULLEN, L.; MCCLEAN, S. Bacterial Adaptation during Chronic Respiratory Infections. **Pathogens**, v. 4, p. 66-89, 2015.
- CYSTIC FIBROSIS FOUNDATION. Patient Registry Annual Data Report 2018. Cystic Fibrosis Foundation, Bethesda, MD. 2019. Available from www.cff.org. x
- DELGADO-VALVERDE, M.; et al. Variantes pequenas de *Staphylococcus aureus*: utilidade de distintas pruebas para su diagnóstico y estudio de sensibilidad. **Enferm. Infec. Microbiol. Clin.**, v. 32, n. 2, p. 96-98, 2014.
- DODÉMONT, M.; et al. Emergence of livestock-associated MRSA isolated from cystic fibrosis patients: Result of a Belgian national survey. **J. Cyst. Fibros.**, v. 18, p. 86–93, 2019.
- DUPONT, C.; et al. Impact of High Diversity of *Achromobacter* Populations within Cystic Fibrosis Sputum Samples on Antimicrobial Susceptibility Testing. **J. Clin. Microbiol.**, v. 55, n. 1, p. 202-215, 2017.
- EICKMEIER, O.; et al. Clinical relevance of *Aspergillus fumigatus* sensitization in cystic fibrosis. **Clin. Exp. Allergy**, v. 50, p. 325–333, 2020.

- ENRIGHT, M. C.; et al. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.*, v. 38, p.1008–1015, 2000.
- ESPOSITO, A.; et al. Evolution of *Stenotrophomonas maltophilia* in Cystic Fibrosis Lung over Chronic Infection: A Genomic and Phenotypic Population Study. **Front. Microbiol.**, v. 8, 2017.
- ESPOSITO, S.; et al. Antimicrobial Treatment of *Staphylococcus aureus* in Patients With Cystic Fibrosis. **Front. Pharmacol.**, v. 10, n. 849, 2019.
- FILKINS, L. M.; et al. Coculture of *Staphylococcus aureus* with *Pseudomonas aeruginosa* Drives *S. aureus* towards Fermentative Metabolism and Reduced Viability in a Cystic Fibrosis Model. **J. Bacteriol.**, v. 197, n. 14, p. 2252-2264, 2015.
- FIRMIDA, M. C.; et al. Clinical impact of *Achromobacter xylosoxidans* colonization/infection in patients with cystic fibrosis. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 49, n. 4, p. 1-7, 2016.
- FOLESCU, T. W.; et al. *Burkholderia cepacia* complex: clinical course in cystic fibrosis patients. **BMC Pulm. Med.**, v. 15, n. 158, 2015.
- FUGÈRE, A.; 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.
- GARBACZ, K.; et al. Emergence and spread of worldwide *Staphylococcus aureus* clones among cystic fibrosis patients. **Infect. Drug Resist.**, v. 11, n. 11, p. 247–255, 2018.
- GARCIA, B. A.; et al. Implementation of a successful eradication protocol for *Burkholderia Cepacia* complex in cystic fibrosis patients. **BMC Pulm. Med.**, v. 18, n. 35, 2018.
- GILLIGAN, P. H.; GAGE, P. A.; WELCH, D. F.; MUSZYNSKI, M. J.; WAIT, K. R. Prevalence of thymidine-dependent *Staphylococcus aureus* in patients with cystic fibrosis. **J Clin Microbiol.**, n. 25, p. 1258–1261, 1987.
- GOODLET, K. J.; et al. Successful Lung Re-transplant in a Patient with Cepacia Syndrome due to *Burkholderia ambifaria*. **J. Cyst. Fibros.**, v. 18, 2019.
- GRANCHELLI, A. M.; et al. Microbial interactions in the cystic fibrosis airway. **J. Clin. Microbiol.**, v. 56, n. 8, 2018.
- GRUPO BRASILEIRO DE ESTUDOS DE FIBROSE CÍSTICA. **Registro Brasileiro de Fibrose Cística**. Relatório Anual de 2018. Disponível em www.portalgbefc.org.br
- GUERILLOT, R.; et al. Unstable chromosome rearrangements in *Staphylococcus aureus* cause phenotype switching associated with persistent infections. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 116, p. 20135–20140, 2019.

GUO, X.; et al. Clinical and genetic characteristics of cystic fibrosis in CHINESE patients: a systemic review of reported cases. **Orphanet J. Rare Dis.**, v. 13, n. 224, 2018.

HAUSCHILD, D. B.; et al. Associação do Estado Nutricional com Função Pulmonar e Morbidade em Crianças e Adolescentes com Fibrose Cística: coorte de 36 meses. **Rev. Paul. Pediatr.**, v. 36, n. 1, p. 31-38, 2018.

HAUSER, A. R.; et al. Clinical Significance of Microbial Infection and Adaptation in Cystic Fibrosis. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 24, n. 1, p. 29-70, 2011.

HEATHER, J. M.; CHAIN, B. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. **Genomics**, v. 107, 2016. doi.org/10.1016/j.ygeno.2015.11.003

HEINZMANN-FILHO, J. P.; et al. Variação na função pulmonar está associada com piores desfechos clínicos em indivíduos com fibrose cística. **J. Bras. Pneumol.**, v. 41, n. 6, p. 509-515, 2015.

HÉRY-ARNAULD, G.; BOUTIN, S.; CUTHBERTSON, L.; ELBORN, S. J.; TUNNEY, M. M. The lung and gut microbiome: what has to be taken into consideration for cystic fibrosis? **J. Cyst. Fibros.**, v. 18, p. 13-21, 2019.

HOFFMAN, L. R.; 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.

HONG, G.; et al. Risk factors for persistent *Aspergillus* respiratory isolation in cystic fibrosis. **J. Cyst. Fibros.**, v. 17, n. 5, p. 624–630, 2018.

HOTTERBEEKX, A.; et al. *In vivo* and *In vitro* Interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus* spp. **Front. Cell. Infect. Microbiol.**, v. 7, n. 106, 2017.

HOWE, R. A.; et al. Susceptibility testing of *Stenotrophomonas maltophilia* to carbapenems. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 40, n. 1, p. 13-17, 1997.

HU, Y.; et al. Genomic insights into intrinsic and acquired drug resistance mechanisms in *Achromobacter xylosoxidans*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 59, p.1152–1161, 2015.

HURLEY, M. N. *Staphylococcus aureus* in cystic fibrosis: problem bug or an innocent bystander? **Breathe**, v. 14, p. 87–90, 2018.

JANAHI, I. A.; REHMAN, A.; AL-NAIMI, A. R. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in patients with cystic fibrosis. **Ann. Thorac. Med.**, v. 12, n. 2, p. 74–82, 2017.

JOLLEY, K. A.; BRAY, J. E.; MAIDEN, M. C. J. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. **Wellcome Open Res** (2018);3:124.

JORGENSEN, J. H et al. **Manual of Clinical Microbiology**. 11 ed, ASM press, Washington D.C., 2015.

JUNGE, S.; et al. Factors Associated with Worse Lung Function in Cystic Fibrosis Patients with Persistent *Staphylococcus aureus*. **PLoS ONE**, v. 11, n. 11, 2016.

JURCISEK, J. A.; et al. Nontypeable Haemophilus influenzae releases DNA and DNABII proteins via a T4SS-like complex and ComE of the type IV pilus machinery. **PNAS**, v. 114, n. 32, E6632-E6641, 2017.

KAHL, B.; HERRMANN, M.; EVERDING A. S.; KOCH, H. G.; BEKER, K.; HARMS, E.; et al. Persistent infection with small colony variant strains of *Staphylococcus aureus* in patients with cystic fibrosis. **J. Infect. Dis.**, v. 177, p. 1023–1029, 1998.

KAHL, B. C.; et al. Thymidine-Dependent Small-Colony Variants of *Staphylococcus aureus* Exhibit Gross Morphological and Ultrastructural Changes Consistent with Impaired Cell Separation. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, n. 1, p. 410–413, 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.

KITTINGER, C.; et al. Phenotypic Stability of *Staphylococcus aureus* Small Colony Variants (SCV) Isolates from Cystic Fibrosis (CF) Patients. **Int. J. Environ. Res. Public Health**, v. 16, 2019.

KRIEGESKORTE, A.; 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.; 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.

LEE, J.; ZILM, P. S.; KIDD, S. P. Novel Research Models for *Staphylococcus aureus* Small Colony Variants (SCV) Development: Co-pathogenesis and Growth Rate. **Front. Microbiol.**, v. 11, n. 21, 2020.

LEONARSKI, F.; UWINIARSKA, M.; LEV, A. Asymmetric Behavior of Thymidylate Synthase Dimer Subunits in Denaturing Solvent Observed with Molecular Dynamics. **Computational Biology Journal**, 2015, Article ID 389018, doi.org/10.1155/2015/389018

LIMA, D. F.; et al. Pantone-Valentine leukocidin (PVL) gene carriage among *Staphylococcus aureus* strains with SCCmec types I, III, IV, and V recovered from cystic fibrosis pediatric patients in Brazil. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 78, n. 1, p. 59-62, 2014.

LIMA, D. F.; et al. Genomic information on multidrug-resistant livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 isolated from a Brazilian patient with cystic fibrosis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 112, n. 1, p. 79-80, 2017.

LIMOLI, D. H.; HOFFMAN, L. R. Help, hinder, hide and harm: what can we learn from the interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* during respiratory infections? **Thorax**, v. 74, p. 684–692, 2019.

LIU, Y.; et al. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from pediatric patients with cystic fibrosis. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 32, n. 162, 2016.

LOPES-PACHECO M. CFTR Modulators: Shedding Light on Precision Medicine for Cystic Fibrosis. **Front. Pharmacol.**, v. 7, n. 275, 2016.

LUMERTZ, M. S.; et al. False-negative newborn screening result for immunoreactive trypsinogen: a major problem in children with chronic lung disease. **J. bras. pneumol.**, v. 45, n. 3, 2019.

LUTZ, L.; et al. BACTERIOLOGIA DA FIBROSE CÍSTICA. **Rev. HCPA**, v. 31, n. 2, p.168-184, 2011.

MADUKA-EZEH, A.; et al. Thymidine Auxotrophic *Staphylococcus aureus* Small-Colony Variant Endocarditis and Left Ventricular Assist Device Infection. **J. Clin. Microbiol.**, v. 50, n. 3, p. 1102–1105, 2012.

MANFREDINI, R. A. **Desenvolvimento e Validação de Método de Análise de Sequências Genômicas Baseada em Padrões de Entropia, Coeficiente de Clusterização e Periodicidade.** Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando a obtenção do grau de Doutor em Biotecnologia. Caxias do Sul, 2015.

MARQUES, E. A. Perfil Microbiológico na Fibrose Cística. **Ver. Hosp. Univ. Pedro Ernesto**, v. 10, n. 4, 2011.

MARSON, F. A. L. **Análise de genes modificadores relacionados à gravidade clínica da fibrose cística.** Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas - UNICAMP para obtenção do título de Mestre em Saúde da Criança e do Adolescente, área de concentração em Saúde da Criança e do Adolescente. Universidade Estadual de Campinas – Unicamp, Campinas, 2011.

MASOUD-LANDGRAF, L.; 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.

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

MITCHELL, G.; et al. SigB Is a Dominant Regulator of Virulence in *Staphylococcus aureus* Small-Colony Variants. **PLOS ONE** |, v. 8, n.5, p. 1-14, 2013.

MOJICA, M. F.; et al. Population Structure, Molecular Epidemiology, and β -Lactamase Diversity among *Stenotrophomonas maltophilia* Isolates in the United States **mBio.**, v. 10, n. 4, 2019.

NIELSEN, X. C.; et al. Management of recurrent pacemaker-related bacteraemia with small colony variant *Staphylococcus aureus* in a haemodialysis patient. **BMJ**. Published online 2009 Aug 20.

NOGUEIRA, K. S. **Prevalência e caracterização molecular de beta-Lactamases de Espectro Ampliado (ESBL) em enterobactérias isoladas no Hospital de Clínicas de Curitiba**. Universidade Federal do Paraná (UFPR). Curitiba, 2011.

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.

PALLET, R.; et al. Anaerobiosis influences virulence properties of *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates and the interaction with *Staphylococcus aureus*. **Scientific Reports**, v. 9, 2019. 6748 | doi.org/10.1038/s41598-019-42952-x

PALMEIRO, J. K. **Epidemiologia Molecular e Caracterização dos Determinantes Genéticos de Resistência aos Antimicrobianos em Isolados Clínicos de Enterobacteriaceae**. Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Aplicada à Saúde da Criança e do Adolescente da Faculdades Pequeno Príncipe – Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe (FPP/IPPPP) para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia Aplicada à Saúde da Criança e do Adolescente. Curitiba, 2018.

PANDEY, S.; SALAM, L.; PAREEK, N. Evolution and Epidemiology of Antimicrobial Resistance: *Staphylococcus aureus*. **Biomed. J. Sci. & Tech. Res.**, v. 1, n. 5, 2017.

PARACCHINI, V.; Cystic Fibrosis Newborn Screening: Distribution of Blood Immunoreactive Trypsinogen Concentrations in Hypertrypsinemic Neonates. **JIMD.**, v. 4, p. 17–23, 2012.

PEREIRA, C. A. C. Espirometria. **J. Pneumol.**, v. 28, n. 3, p. 1-82, 2002.

PEREIRA, C. A. C.; SATO, T.; RODRIGUES, S. C. Novos valores de referência para espirometria forçada em brasileiros adultos de raça branca. **J Bras Pneumol.**, v. 33, n. 4, p. 397-406, 2007.

PRICE, J. R.; et al. Whole genome sequencing in the prevention and control of *Staphylococcus aureus* Infection, **J. Hosp. Infect.**, v. 83, p. 14-21, 2013.

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

PROCTOR R. A.; et al. *Staphylococcus aureus* Small colony variants (SCVs): A Road map for the metabolic pathways involved in persistent infections. **Front. Cell. Infect. Microbiol.**, v.4, 2014.

RHODES, K. A.; SCHWEIZER, H. P. Antibiotic Resistance in *Burkholderia* Species. **Drug Resist Updat.** v. 28, p. 82–90, 2016.

ROMMENS, J. M.; et al. Identification of Cystic Fibrosis Gene: Chromosome Walking and Jumping. **Science**, v. 245, p. 1059-1065, 1989.

R: R Core Team (2020). R: A Language and Environment for Statistical Computing. **R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria**. URL <https://www.R-project.org/>.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SCOFFONE, V. C.; et al. *Burkholderia cenocepacia* Infections in Cystic Fibrosis Patients: Drug Resistance and Therapeutic Approaches. **Front. Microbiol.**, v. 8, 2017.

SCOFFONE, V. C.; et al. Quorum Sensing as Antivirulence Target in Cystic Fibrosis Pathogens. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 20, 2019; doi:10.3390/ijms20081838.

SHOORAJ, F.; et al. Clonal diversity of *Haemophilus influenzae* carriage isolated from under the age of 6 years children. **BMC. Res. Notes**, v. 12, n. 565, 2019.

SHTEINBERG, M.; et al. Lung function and disease severity in cystic fibrosis patients heterozygous for p.Arg117His. **ERJ. Open Res.** v.3, 2017; doi.org/10.1183/23120541.00056-2016

SIMON, M.I.; et al. Association of nutritional status, plasma, albumin levels and pulmonary function in cystic fibrosis. **Nutr. Hosp.**, v. 26, p. 1322-1327, 2011.

SISVAN. Norma Técnica do Sistema de Vigilância Alimentar e Nutricional. Ministério da Saúde. Brasília – DF, 2011.

SOUZA, H. A. P. H. M.; et al. MALDI-TOF: A useful tool for laboratory identification of uncommon glucose non-fermenting Gram-negative bacteria associated with cystic fibrosis. **J. Med. Microbiol.**, v. 63, p. 1148-1153, 2014.

SOUZA, D. C.; COGO, L. L.; ROSARIO FILHO, 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.

SOUZA, D. C. **Detecção de colônias pequenas variantes de *staphylococcus aureus* em amostras respiratórias de pacientes com fibrose cística.** Dissertação (Mestrado em Medicina Interna e Ciências da Saúde) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2017.

SOUZA, D. C.; et al. Thymidine-auxotrophic *Staphylococcus aureus* small colony variant bacteremia in a patient with cystic fibrosis. **Pediatr. Pulmonol.**, v. 55, n. 6, p. 1388–1393, 2020.

SPARHAM, P. D.; LOBBAN, D. I.; SPELLER, D. C. Isolation of *Staphylococcus aureus* from sputum in cystic fibrosis. **J. Clin. Pathol.**, v.31, p. 913–918. 1978

SPITZNOGLE, S. L.; AITKEN, S. L. Evaluating the Role of New Beta-Lactam Agents for Uncommun Pathogens. **Society of Infectious Diseases Pharmacists**. v. 4, n. 5, 2019.

STEINMANN, J.; et al. Analysis of Phylogenetic Variation of *Stenotrophomonas maltophilia* Reveals Human-Specific Branches. **Front. Microbiol.**, v. 9:806. doi: 10.3389/fmicb.2018.00806

SUWANTARAT, N.; et al. Frequency of small-colony variants and antimicrobial susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in cystic fibrosis patients. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v.90, p. 296–299, 2018.

SWINGLE, E. L. Studies on small colony variants of *Staphylococcus aureus*. **J. Bacteriol.** v.29, n.5, p.467-489, 1935.

TETART, M.; et al. Impact of *Achromobacter xylosoxidans* isolation on the respiratory function of adult patients with cystic fibrosis. **ERJ Open Res.**, v.5, 2019. doi.org/10.1183/23120541.00051-2019.

TRINDADE, A. M.; SOUSA, T. L. F.; ALBUQUERQUE, A. L. P. A interpretação da espirometria na prática pneumológica: até onde podemos avançar com o uso dos seus parâmetros? **Pulmão RJ.**, v. 24, n. 1, p. 3-7, 2015.

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

TUCHSCHERR, L.; et al. Clinical *S. aureus* Isolates Vary in Their Virulence to Promote Adaptation to the Host. **Toxins**, v. 11, n. 135, 2019.

TUCHSCHERR, L.; LÖFFLER, B.; PROCTOR, R. A. Persistence of *Staphylococcus aureus*: Multiple Metabolic Pathways Impact the Expression of Virulence Factors in Small-Colony Variants (SCVs). **Front. Microbiol.**, v. 11, n. 1028, 2020.

WARRIS, A.; BERCUSSON, A.; ARMSTRONG-JAMES, D. · Aspergillus Colonization and Antifungal Immunity in Cystic Fibrosis Patients. **Med. Mycol.**, v.1, n. 57, S118-S126, 2019.

WATERS, V.; et al. *Stenotrophomonas maltophilia* in Cystic Fibrosis Serologic Response and Effect on Lung Disease. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 183, p. 635–640, 2011.

WATERS, V.; et al. Chronic *Stenotrophomonas maltophilia* infection and mortality or lung transplantation in cystic fibrosis patients. **J. Cyst. Fibros.**, v. 12, p. 482–486, 2013.

WATERS, V.; GRIMWOOD, K. Defining chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. **J. Cyst. Fibros.**, v. 17, n. 3, p. 292-293, 2018.

WESTPHAL, C.; et al. Antibiotic Treatment and Age Are Associated with *Staphylococcus aureus* Carriage Profiles During Persistence in the Airways of Cystic Fibrosis Patients. **Front. Microbiol.**, v. 11, n. 230, 2020.

WINDMÜLLER, N.; et al. Transcriptional adaptations during long-term persistence of *Staphylococcus aureus* in the airways of a cystic fibrosis patient. **Int. J. Med. Microbiol**, v. 305, n. 1, p. 38-46, 2015.

WOLTER, D. J.; 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. 384-91, 2013.

YAGCI, S.; et al. 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.

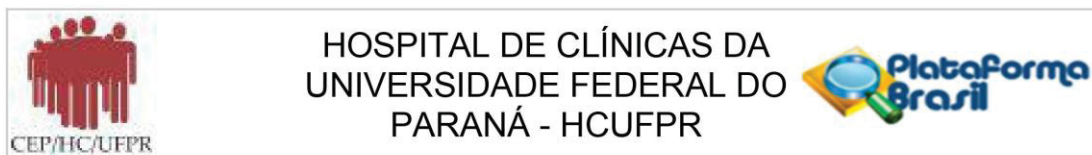
YAMAMOTO, G. L. **Aplicabilidade clínica da técnica de sequenciamento de nova geração com enfoque em displasias esqueléticas**. Tese apresentada à Faculdade de Medicina de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências, Programa de Pediatria. São Paulo, 2017.

TABELA SUPLEMENTAR 1 – SEQUENCIAMENTO SANGER DO GENE *thyA*

Isolate ID	Alteration(s) in <i>thyA</i>	Genotype
Sa1	Missense non-conservative mutation (Gln206Arg)	SCV
Sa2	Silent point mutations	WT
Sa3	Missense conservative mutation (Val16Gly) Frameshift mutation (-12 nt from amino acid 17)	sSCV
Sa4	Silent point mutation Frameshift mutation (+2 nt from amino acid 40)	sSCV
Sa5	Missense conservative mutation (Ile19Leu) Silent point mutations Frameshift mutation (-12 nt from amino acid 197)	sSCV
Sa6	Frameshift mutation (-13 nt from amino acid 197)	sSCV
Sa7	Missense non-conservative mutation (Gln217Arg)	SCV
Sa8	Silent point mutations	WT
Sa9	Missense conservative mutation (Ile19Leu) Silent point mutations Frameshift mutation (-12 nt from amino acid 256)	sSCV
Sa10	Frameshift mutation (-11 nt from amino acid 198)	sSCV
Sa11	Missense non-conservative mutation (Leu64Phe) Frameshift mutation (-1 nt from amino acid 66)	sSCV
Sa12	Missense conservative mutation (Asp165Glu)	WT
Sa13	Silent point mutations	WT
Sa14	Nonsense mutation (Lys150Stop)	sSCV
Sa15	Silent point mutations	WT
Sa16	Silent point mutations	WT
Sa17	No mutation	WT
Sa18	Silent point mutations	WT
Sa19	Frameshift mutation (-12 nt from amino acid 197)	sSCV
Sa20	Missense conservative mutation (Ile19Leu) Silent point mutations Frameshift mutation (-12 nt from amino acid 197)	sSCV
Sa21	Silent point mutations Frameshift mutation (-12 nt from amino acid 197)	sSCV
Sa22	Silent point mutations Nonsense mutation (Gln130Stop)	sSCV
Sa23	Silent point mutations Frameshift mutation (-13 nt from amino acid 115)	sSCV
Sa24	Silent point mutations Frameshift mutation (-10 nt from amino acid 225)	sSCV
Sa25	-2 nt frameshift mutation (- 2nt from amino acid 222)	sSCV

Legenda: WT – wild type; sSCV – SCV stable

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: 5

CAAE: 45063115.9.0000.0096

Instituição Proponente: MATERNIDADE VICTOR FERREIRA DO AMARAL

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DA NOTIFICAÇÃO

Tipo de Notificação: Envio de Relatório Parcial

Detalhe:

Justificativa: Envio de relatório parcial

Data do Envio: 30/09/2020

Situação da Notificação: Parecer Consubstanciado Emitido

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.344.596

Apresentação da Notificação:

RELATÓRIO PARCIAL

Objetivo da Notificação:

RELATÓRIO DE EVOLUÇÃO DA PESQUISA.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

NÃO SE APLICA

Comentários e Considerações sobre a Notificação:

PROJETO DENTRO DO PRAZO DE EXECUÇÃO.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

NÃO SE APLICA

Endereço: Rua Gal. Carneiro, 181

Bairro: Alto da Glória

CEP: 80.060-900

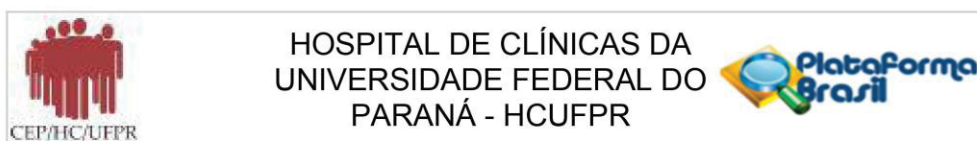
UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-1041

Fax: (41)3360-1041

E-mail: cep@hc.ufpr.br



Continuação do Parecer: 4.344.596

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

RELATÓRIO APROVADO E SEM PENDÊNCIAS

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 da Notificação. Solicitamos que sejam apresentados a este CEP relatórios semestrais sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos. Manter os documentos da pesquisa arquivados.

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.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Envio de Relatório Parcial	relatorio_parcial_e_ou_final_da_pesquisa.docx	30/09/2020 21:05:49	Dilair Camargo de Souza	Postado

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CURITIBA, 17 de Outubro de 2020

Assinado por:
maria cristina sartor
(Coordenador(a))

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 - FICHA PARA BUSCA DE DADOS DEMOGRÁFICOS E CLÍNICOS.

FICHA CLÍNICA - CASO CONTROLE - ficha nº

REGISTRO:	NOME:	
SEXO: M () F ()	RAÇA: Branca () Preta () Parda ()	DATA DE NASCIMENTO:
Diagnóstico de FC :	teste do pézinho - Data: / /	teste do suor – Data: / /

Teste genotípico – Data: / / CFTR - variante 1: variante 2:

AMBULATÓRIO:	DATA:					
ANTIBIÓTICOS						
	AZI	SUT(dias)	CIP	TOB	AMC	outros
Em uso						
usar						
AZI - Azitromicina; SUT - Sulfa-trimetoprim; CIP - Ciprofloxacina; TOB - Tobramicina; AMC - Amoxicilina-Clavulonato; Outros antibióticos.						
EXACERBAÇÃO						
Queixa respiratória Sim () Não () dor no peito () tosse produtiva ()						
expectoração: escarro amarelo () verde ()						
pneumonia () IVAS () bronquiectasia () dispneia () asma ()						
EXAMES						
1. CULTURA	DATA: / /					
Tipo de amostra: Orofaringe () Escarro () Traqueal () Lavado ()						
Micro-organismo isolado						
<i>S. aureus</i> - MSSA () MRSA () SCVs () <i>P. aeruginosa</i> - normal () mucóide () <i>C. B. cepacia</i> () <i>A. xylosoxidans</i> () <i>S. maltophilia</i> () <i>Haemophilus</i> spp () outros NF () SDB ()						

ÒBITO: NÃO ()
SIM () Data: __ / _ / ____

2. ESPIROMETRIA (antes e depois de SCVs)

	Data:
CVF	
VEF ₁ (L)	
VEF ₁ (%) previsto	

3. Outros exames (antes e depois de SCVs)

Exames	data:
Peso	
Altura	
IMC	
Insuficiência pancreática*	

- Uso ou não de enzima*