

Universidade de Lisboa

Faculdade de Medicina



**Caracterização genómica de *Staphylococcus aureus* isolados
de infeção invasiva em idade pediátrica em Portugal**

YENINE TELMA SANTOS MARTINS

Orientador: Prof. Doutor Marcos Daniel Caetano Borges de Pinho

Dissertação especialmente elaborada para obtenção do grau de mestre em Microbiologia
Clínica e Doenças Infecciosas Emergentes

2024

Universidade de Lisboa
Faculdade de Medicina



**Caracterização genómica de *Staphylococcus aureus* isolados
de infeção invasiva em idade pediátrica em Portugal**

YENINE TELMA SANTOS MARTINS

Orientador: Prof. Doutor Marcos Daniel Caetano Borges de Pinho

Dissertação especialmente elaborada para obtenção do grau de mestre em Microbiologia
Clínica e Doenças Infeciosas Emergentes

2024

A impressão desta dissertação foi aprovada pelo Conselho Científico da Faculdade de Medicina de Lisboa em reunião de 16/04/2024.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Doutor Mário Ramirez, agradeço a disponibilidade e oportunidade de integração na sua equipa de investigação no laboratório MRamirez, e por todos os ensinamentos transmitidos ao longo deste longo e desafiante período.

Ao meu orientador neste trabalho final, Prof. Doutor Marcos Pinho agradeço toda a disponibilidade, supervisão, orientação, confiança e amizade partilhada. Serei eternamente grata.

A todas as pessoas do laboratório MRamirez, Joana Silva, Bruno Capistrano, Fábio Limpo e Melissa Sousa agradeço por estarem sempre presentes e disponíveis para orientar e ajudar na minha integração e desenvolvimento dos meus projetos no laboratório.

Aos meus companheiros de todos os momentos, Yara Almeida, Nuno Leal e Melissa Jassy obrigada pela amizade, por estarem sempre presentes quando mais precisei, pelos conselhos, ensinamentos e principalmente, por nunca me deixarem desistir.

Ao Helder, um grande obrigado por tudo, pela presença, por todos os desabafos, por todas as orientações, por todo o amor, carinho, companheirismo, paciência, disponibilidade e por todo o incentivo.

Por último, mas não menos importante, à minha família, o meu pai, a minha mãe e a minha irmã, que mesmo estando longe durante todos estes anos, sempre confiarem em mim, sempre apoiaram incondicionalmente, e principalmente acreditaram em mim. Não foi fácil, e estando longe, ainda mais difícil foi. Espero ter conseguido deixar a todos vós orgulhosos da filha e irmã que criaram.

Pai, hoje é um dia especial. Há um ano que o céu ganhou uma estrela brilhante. Foste, és e para todo o sempre serás o meu porto seguro, a minha força, a minha maior e melhor inspiração. Por ti, pai, e contigo no coração entrego hoje a minha dissertação. Sei que era algo que tu tanto querias e que ficarias muito orgulhoso da tua “princesa”. Perdoa-me por não o fazer mais cedo, enquanto tu ainda aqui estavas. Falhei.

Pai, fazes muita falta, e sentimos muitas saudades tuas.

Obrigada por tudo papa.

Staphylococcus aureus is a Gram-positive cocci in the Micrococcaceae family, that can be found as a commensal or pathogenic agent in humans. Nowadays, *S. aureus* is recognized as one of the main agents of community and hospital infections. This study aimed at identifying the main *S. aureus* lineages causing pediatric (<18 years) invasive infections in Portugal, evaluating antimicrobial susceptibility and the distribution of virulence genes. A total of 205 isolates were recovered from blood (n=180), synovial fluid (n=12) or other normally sterile fluids/tissues (n=13) in 10 Portuguese hospitals between 2015 and 2020. Genomic sequences (Illumina) were obtained for all isolates. Multilocus sequence typing (MLST) profiles, virulence and antimicrobial resistance genes were identified from the genomic sequences. Antimicrobial susceptibility to fourteen antimicrobial agents was determined by disk diffusion or E-test..

Isolates belonged to 36 sequence types grouped into 17 clonal complexes (CCs) and one singleton. CC398 (16.6%), CC30 (16.1%), CC5 (13.7%) and CC45 (10.7%) were the most frequent CCs. Overall penicillin resistance was 87.3% and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) strains accounted for 17.1% (n=35) of the isolates, with SCCmec types IV (n=17), VI (n=8) and II (n=8) being identified. MRSA isolates belonged to CC5 (51.4%), CC22 (31.4%), CC8 (11.4%), CC72 and CC152 (2.9% each). Resistance to other antimicrobial agents included erythromycin (29.8%), clindamycin (28.8%), norfloxacin (15.1%), fusidic acid (7.3%) or gentamicin (6.8%). Panton-Valentine leucocidin (PVL) genes were detected in 10 isolates (4.9%), including two MRSA. Toxic shock syndrome toxin-1 gene was found in 15.6% (n=32) of the isolates while exfoliative toxins ETA (2.9%) and ETB (2.4%) genes were carried by a minority of isolates, despite the severity of some cases. *S. aureus* causing pediatric invasive infections in Portugal showed considerable diversity, albeit representing widely disseminated lineages.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, invasive pediatric infections, antibiotic resistance, MRSA, MSSA.

Staphylococcus aureus são cocos Gram-positivos da família Micrococcaceae, podendo ser comensais ou patogênicos no ser humano. Atualmente, é um dos principais agentes infecciosos na comunidade e em ambiente hospitalar. Este estudo procurou identificar as principais linhagens responsáveis por infecções invasivas pediátricas (<18 anos) em Portugal, avaliando a suscetibilidade a antimicrobianos e a distribuição de genes de virulência. Um total de 205 estirpes de *S. aureus* foram isoladas de amostras de sangue (n=180), líquido sinovial (n=12) ou outros fluidos/tecidos normalmente estéreis (n=13) em 10 hospitais portugueses entre 2015 e 2020. A partir das sequências genómicas (Illumina) obtidas para todas as estirpes, identificaram-se perfis de *multilocus sequence typing* (MLST), genes de virulência e de resistência a antimicrobianos. Foi determinada a suscetibilidade a 14 agentes antimicrobianos.

As estirpes pertenciam a 36 tipos de sequência agrupados em 17 complexos clonais (CCs) e um *singleton*. CC398 (16.6%), CC30 (16.1%), CC5 (13.7%) e CC45 (10.7%) foram os mais frequentes. A resistência à penicilina foi de 87.3% (n=179) e as estirpes de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) representaram 17.1% (n=35) das estirpes, com os tipos *SCCmec* IV (n=17), VI (n=8) e II (n=8) identificados. As estirpes de MRSA pertenciam aos CC5 (51.4%), CC22 (31.4%), CC8 (11.4%), CC72 (2.9%) e CC152 (2.9%). Foi também detetada resistência à eritromicina (29.8%), clindamicina (28.8%), norfloxacina (15.1%), ácido fusídico (7.3%) e à gentamicina (6.8%). Os genes da leucocidina de Panton-Valentine (PVL) foram detetados em 10 estirpes (4.9%), incluindo duas estirpes MRSA. O gene da toxina-1 da síndrome do choque tóxico foi encontrado em 15.6% (n=32) das estirpes, enquanto os genes das toxinas esfoliativas ETA (2.9%) e ETB (2.4%) estavam presentes numa minoria, apesar da severidade de alguns casos. As estirpes de *S. aureus* responsáveis por infecções invasivas pediátricas em Portugal apresentaram uma diversidade considerável, apesar da identificação de linhagens amplamente disseminadas.

Palavras – chave: *Staphylococcus aureus*, infecção pediátrica invasiva, resistência antimicrobiana, MRSA e MSSA.

AGRADECIMENTOS	II
ABSTRACT	IV
RESUMO	V
ÍNDICE	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
ÍNDICE DE TABELAS	IX
LISTA DE ABREVIATURAS	X
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E IDENTIFICAÇÃO DE <i>S. AUREUS</i>	1
1.2 NICHOS ECOLÓGICOS E TRANSMISSÃO	4
1.3 INFEÇÕES POR <i>S. AUREUS</i>	5
1.4 GENOMA DE <i>S. AUREUS</i>	7
1.5 FATORES DE VIRULÊNCIA	7
1.5.1 Componentes estruturais	8
1.5.2 Toxinas	10
1.5.3 Enzimas	11
1.6 MÉTODOS DE TIPAGEM DE <i>S. AUREUS</i>	11
1.6.1 Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE).....	12
1.6.2 spa typing	12
1.6.3 “Multilocus sequence typing” (MLST)	13
1.6.4 Sequenciação do genoma completo (“Whole-genome sequencing”, WGS)	14
1.7 ANTIMICROBIANOS	15
1.7.1 Tratamento das infecções por <i>S. aureus</i>	15
1.7.2 β -lactâmicos.....	16
1.7.3 Macrólidos e lincosamidas	19
1.7.4 Vancomicina.....	20
1.7.5 Outros antimicrobianos	22
1.8 EPIDEMIOLOGIA DAS INFEÇÕES POR <i>S. AUREUS</i>	24
1.8.1 MRSA.....	24

2. OBJETIVOS	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
3.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	29
3.2 AMOSTRAS EM ESTUDO	29
3.3 CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO E MORFOLOGIA DAS COLÓNIAS.....	30
3.4 TESTE DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS	30
3.5 SEQUENCIAÇÃO GENÓMICA DE ALTO DÉBITO.....	31
3.5.1 Extração de DNA	31
3.5.2 Controlo de qualidade e quantificação do DNA extraído.....	32
3.5.3 Sequenciação de DNA.....	32
3.5.4 Análise gene-por-gene e relações genéticas entre as estirpes.....	33
3.5.5 Determinantes de resistência e fatores de virulência.....	34
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	34
4. RESULTADOS.....	35
4.1 CARATERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS EM ESTUDO	35
4.2 “MULTILOCUS SEQUENCE TYPING” (MLST).....	35
4.3 SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS	38
4.4 FATORES DE VIRULÊNCIA	45
5. DISCUSSÃO	48
5.1 DIVERSIDADE CLONAL.....	49
5.2 SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA	51
5.3 DISTRIBUIÇÃO DOS FATORES DE VIRULÊNCIA	53
6. CONCLUSÃO.....	55
6.1 PERSPETIVAS FUTURAS	56
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
8. ANEXOS	76

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Morfologia celular ao microscópio ótico de <i>S. aureus</i> com coloração de Gram	3
Figura 2 - Morfologia das colónias <i>S. aureus</i> após crescimento em gelose de sangue... 3	3
Figura 3 - Infecções por <i>S. aureus</i> 4	4
Figura 4 - Fatores de virulência de <i>S. aureus</i> 8	8
Figura 5 - Estrutura dos elementos <i>SCCmec</i> em <i>S. aureus</i> 18	18
Figura 6 - Teste da difusão em disco para <i>Staphylococcus spp</i> 20	20
Figura 7 - Mecanismo de resistência de estirpes à vancomicina..... 22	22
Figura 8 - Prevalência mundial de <i>S. aureus</i> resistente à metilina adquirido em hospitais..... 25	25
Figura 9 - Prevalência de estirpes MRSA em infecções invasivas (todas as idades) em países da União Europeia (2022)..... 25	25
Figura 11 - Evolução da resistência à metilina em estirpes invasivas de <i>S. aureus</i> em Portugal - 1999 a 2022 27	27
Figura 12 - Distribuição das estirpes de <i>S. aureus</i> isoladas ao longo do período de estudo..... 29	29
Figura 13 - Distribuição das idades dos doentes em estudo..... 35	35
Figura 14 - Diagrama de GoeBURST das 205 estirpes de <i>S. aureus</i> 37	37
Figura 15 - Prevalência dos CCs identificados ao longo do período de estudo 38	38
Figura 16 - Distribuição das estirpes MRSA e MSSA pelos CCs..... 40	40
Figura 17 - Diagrama de GoeBURST das 205 estirpes de <i>S. aureus</i> mostrando a distribuição das estirpes MRSA 40	40
Figura 18 - Distribuição de CIMs à vancomicina das 205 estirpes de <i>S. aureus</i> 41	41
Figura 19 - Distribuição de CIMs à daptomicina das 205 estirpes de <i>S. aureus</i> 42	42
Figura 20 - Taxa de resistência a antimicrobianos das estirpes MRSA e MSSA..... 43	43
Figura 21 - Perfil de resistências para cada antibiótico nos diferentes CCs..... 44	44

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Principais clones de HA-MRSA.....	26
Tabela 2 - Distribuição dos STs e CCs definidos por MLST das 205 estirpes	36
Tabela 3 - Taxa de resistência aos antimicrobianos	39
Tabela 4 - Distribuição dos tipos SCCmec pelos STs e CCs	41
Tabela 5 - Distribuição de genes de fatores de virulência nas 205 estirpes de <i>S. aureus</i>	45
Tabela 6 - Distribuição de fatores de virulência pelos CCs.....	47
Tabela 7 (A1) - Lista de Centros hospitalares que participaram no estudo.....	76
Tabela 8 (A2) - Informação detalhada sobre a resistências das 205 estirpes aos antimicrobianos	77

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC – American Type Culture Collection

CC(s) – Complexo(s) clonal(is)

cgMLST – “core genome” MLST

CIM – Concentração inibitória mínima

CLSI – Clinical & Laboratory Standards Institute”)

cMLS_B – Fenótipo constitutivo de resistência a macrólidos, lincosamidas e estreptograminas B

DNA – Ácido desoxirribonucleico (“deoxyribonucleic acid”)

EUCAST – European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

HA-MRSA – *S. aureus* resistentes à meticilina associadas aos cuidados de saúde (“health-care-associated MRSA”). No presente documento a sigla é aplicada às estirpes ou às infecções por elas causadas.

CA-MRSA – *S. aureus* resistentes à meticilina associadas com origem na comunidade (“community-associated MRSA”). No presente documento a sigla é aplicada às estirpes ou às infecções por elas causadas.

IC 95% – Intervalo de confiança de 95%

iMLS_B – Fenótipo induzido de resistência a macrólidos, lincosamidas e estreptograminas B

MALDI-TOF MS – “Matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry”

MGEs – Elementos genéticos móveis (“mobile genetic elements”, MGEs)

MLST – Tipagem de sequência multilocus (“multilocus sequence typing”)

mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro

MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (“methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*”)

MSSA – *Staphylococcus aureus* suscetível à meticilina (*methicillin-susceptible Staphylococcus aureus*)

NCBI – “National Center for Biotechnology Information”

OR – “Odds Ratio”

PBPs – Proteínas de ligação à penicilina (“penicillin binding proteins”)

- PBP2a** – Proteína de ligação à penicilina 2a (PBP2a)
- PCR** – Reação em cadeia de polimerase (“polymerase chain reaction”)
- PFGE** – Eletroforese em gel de campo pulsado (“pulsed-field gel electrophoresis”)
- PVL** – Leucocidina de Panton -Valentine (“Panton-Valentine leucocidin”)
- RNA** – Ácido ribonucleico
- SID** – Índice da diversidade de Simpson (“Simpson’s index of diversity”)
- SLVs** – “single locus variants”
- ST** – Tipo de sequência (“sequence type”)
- tRNA** – Ácido ribonucleico de transferência
- TSST-1** – Toxina da síndrome do choque tóxico-1 (“toxic shock syndrome toxin-1”)
- VISA** – *Staphylococcus aureus* com resistência intermédia à vancomicina (“Vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*”)
- VRSA** – *Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina (“Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*”)
- WGS** – “Whole genome sequencing”

1. INTRODUÇÃO

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) são bactérias pertencentes à família *Staphylococcaceae* que podem ser encontrados como agentes comensais ou patogênicos no ser humano e noutras espécies animais¹. Inicialmente descrito como agente etiológico de abscessos supurativos há mais de 130 anos, *S. aureus* é a espécie de maior relevância clínica para o Homem entre as mais de 50 incluídas no género *Staphylococcus*^{1,2}. *S. aureus* é atualmente reconhecido como um dos principais agentes de infeção tanto em contexto da comunidade como em ambiente hospitalar^{3,4}. Para além do elevado potencial patogénico conferido por inúmeros fatores de virulência presentes no seu genoma, as estirpes de *S. aureus* podem apresentar um conjunto de resistências a diversas classes de antibióticos⁵. As estirpes de *S. aureus* resistentes à meticilina (“methicillin-resistant *S. aureus*” – MRSA) em particular, constituem uma preocupação major pela sua resistência a antibióticos beta-lactâmicos e outros antimicrobianos, que dificultam o tratamento das infeções e impõem a adoção de medidas de prevenção e controlo da infeção⁵.

1.1 Características morfológicas e identificação de *S. aureus*

S. aureus são cocos de Gram positivo, imóveis e não esporulados, anaeróbios facultativos, catalase positivos, oxidase negativos e que fermentam o manitol⁶. Quando observadas em amostras biológicas ao microscópio ótico, as células de *S. aureus* aparecem caracteristicamente organizadas em aglomerados com uma forma semelhante a um “cacho de uvas”, resultante da divisão celular segundo vários eixos de simetria, não obstante ser possível observar células isoladas, aos pares ou em cadeias curtas (**Figura 1**)⁶.

S. aureus é uma bactéria nutricionalmente pouco exigente, capaz de crescer num intervalo de temperaturas entre os 15°C e os 45°C e em concentrações de até 15% de NaCl^{7,8}. Quando cultivado em meios de cultura artificiais forma colónias com aproximadamente 0.5 mm a 1.5 mm de diâmetro, que podem ser descritas como colónias grandes arredondadas, lisas e brilhantes, podendo apresentar cores variadas, sendo que quanto maior o tempo de incubação, mais amarelada são as colónias⁷.

Quando crescidas em placas de agar enriquecidas com sangue, algumas estirpes de *S. aureus* podem apresentar colónias com beta-hemólise, isto é, ocorre a lise dos eritrócitos presentes no meio dando origem a halos transparentes à volta das colónias⁷ (**Figura 2**). O diagnóstico laboratorial das infeções causadas por *S. aureus* inclui um exame direto de esfregaços sujeitos a coloração de Gram para a observação dos cocos de Gram positivo, seguido de cultura e isolamento da bactéria em meios enriquecidos (por exemplo, gelose de sangue) ou seletivos (por exemplo, manitol salgado)^{9,10}. A seletividade deste último meio para bactérias do género *Staphylococcus* advém do facto de conter na sua composição uma concentração de NaCl aumentada que inibe o crescimento de outras bactérias¹¹. O meio de manitol salgado é ainda diferencial para *S. aureus*, dado que esta espécie fermenta o manitol contrariamente à maioria das outras espécies do género habitualmente encontradas em infeção humana¹¹. As provas da catalase (para diferenciação de outros géneros de cocos de Gram positivo) e da coagulase podem ser utilizadas durante o processo de identificação presuntiva de colónias suspeitas de *S. aureus*¹⁰. A prova de produção da coagulase é tradicionalmente utilizada para fazer a distinção entre os estafilococos coagulase positivos e os coagulase negativos, sendo *S. aureus* coagulase positiva^{7,12}. Esta prova consiste na formação de um coágulo, quando uma colónia de *S. aureus* é suspensa numa amostra de plasma, por ação da enzima coagulase que se liga a um fator sérico. O complexo formado converte o fibrinogénio em fibrina resultando no coágulo⁶. A identificação definitiva de *S. aureus* obtêm-se habitualmente com recurso a galerias de testes bioquímicos ou através de “*Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry*” (MALDI-TOF MS)¹³. Este último método, mais recente, baseia-se na ionização das proteínas ribossomais das bactérias e avaliação da sua composição por espectrofotometria de massa, permite que a partir de uma colónia se consiga obter uma identificação a nível da espécie das bactérias em estudo em apenas alguns minutos¹³.

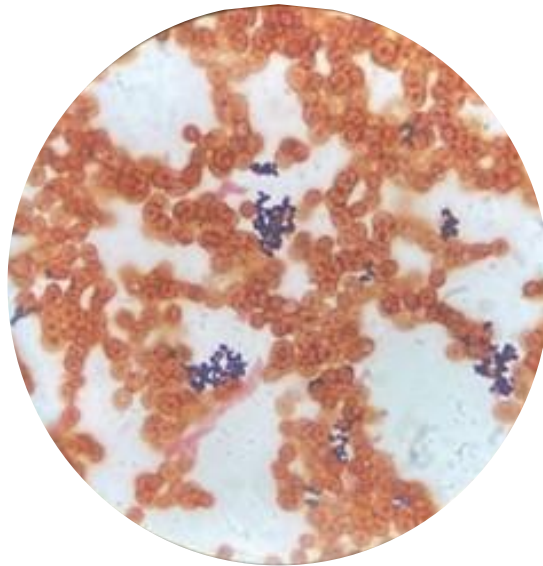


Figura 1 - Morfologia celular ao microscópio ótico de S. aureus com coloração de Gram

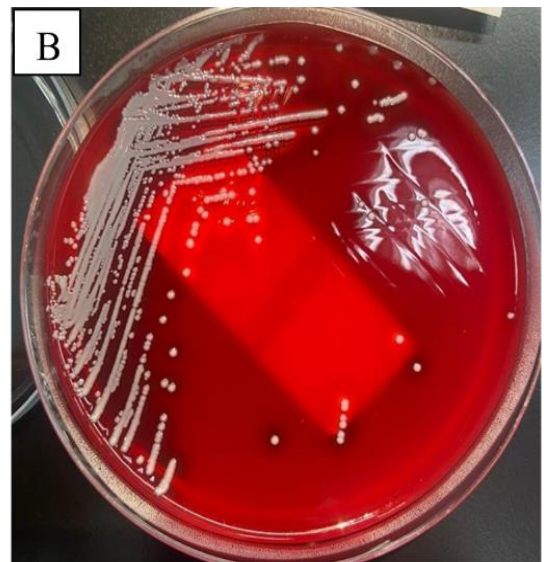
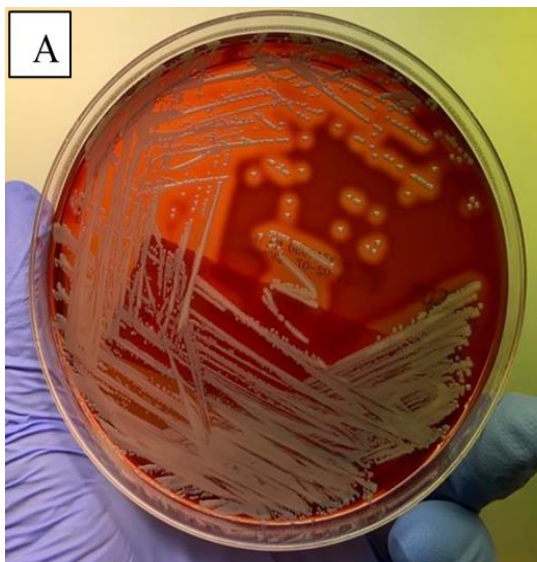


Figura 2 - Morfologia das colónias S. aureus após crescimento em gelose de sangue

A- Padrão de hemólise B- Características morfológicas das colónias de S. aureus

1.2 Nichos ecológicos e transmissão

S. aureus coloniza a pele e a superfície das mucosas do Homem e de algumas espécies animais^{7,8}. No ser humano pode ser isolado da mucosa nasal de 20% a 40% de portadores saudáveis, sendo assim o principal local de colonização, podendo também colonizar a faringe, a vagina, o períneo ou o trato gastrointestinal² (**Figura 3**).

S. aureus é transmitido por contato direto, a partir dos locais de colonização ou infecção, mas pode também ocorrer transmissão através do contacto com fontes ambientais e ocasionalmente com animais^{3,14,15}. *S. aureus* é um dos principais agentes de infecções associadas aos cuidados de saúde em todo o mundo^{1,2}. Profissionais de saúde e doentes em contacto com o ambiente

hospitalar apresentam habitualmente uma maior taxa de colonização relativamente à população em

geral, em particular de estirpes de *S. aureus* resistentes aos antibióticos¹⁶. Desta forma é importante a monitorização não só de doentes internados, mas também dos profissionais de saúde, que também podem ser responsáveis pela transmissão deste microrganismo, para travar possíveis surtos de infecções¹⁷⁻¹⁹. Apesar de *S. aureus* poder causar infecções em qualquer indivíduo, doentes sujeitos a hemodiálise, com diabetes *mellitus*, com doenças hepáticas graves, imunocomprometidos (incluindo doentes infetados com o vírus da imunodeficiência humana) ou com doenças da pele (tais como eczemas, psoríase, melanoma, etc.) têm uma maior probabilidade de desenvolver infecção por *S. aureus*^{16,19}. Indivíduos que tenham a predisposição para dermatopatias ou que sejam imunocomprometidos, apresentam taxas de colonização por *S. aureus* superiores ao habitual, o que pode exacerbar a sua doença base²⁰⁻²². O uso de medicação, tais como antibióticos e imunossuppressores interfere de igual forma na taxa de colonização por *S. aureus*, induzindo o desequilíbrio da microbiota e a inibição dos mecanismos de defesas imunológicas dos indivíduos, respetivamente²³.

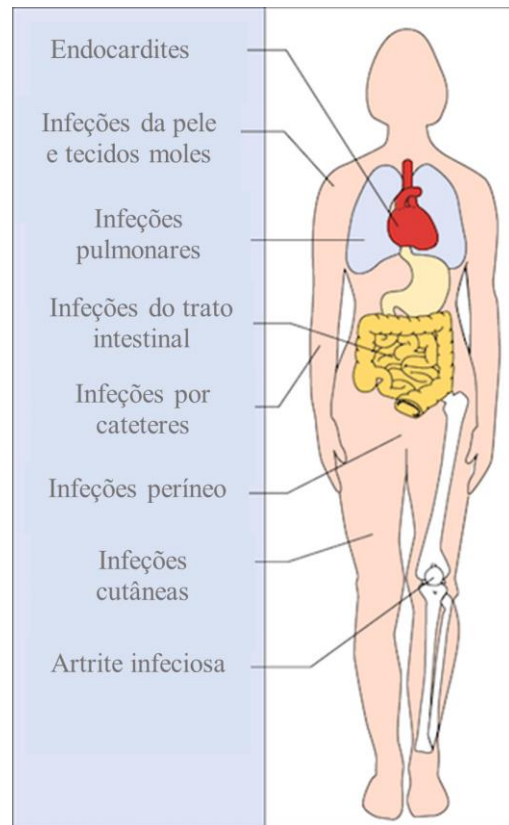


Figura 3 - Infecções por *S. aureus*.

Adaptado de ⁶⁾

Em crianças saudáveis as taxas de colonização por *S. aureus* podem variar de 10% a 60% dependendo de vários fatores, tais como a exposição a fontes de infecção, o ambiente em que vivem, o agregado familiar, as condições socioeconômicas, a higiene pessoal, o desmame precoce (que pode levar a uma diminuição da imunidade da criança), ou a frequência de creches ou ambientes escolares (onde existe mais contato físico e partilha de objetos)^{20,21}. Além disso, a ocorrência de lesões cutâneas como dermatite atópica também pode influenciar as taxas de colonização^{20,21}. Alguns estudos relatam que recém-nascidos de mães colonizadas com *S. aureus* têm uma maior probabilidade de serem colonizados por esta bactéria²⁴. A colonização nasal varia substancialmente com a idade²⁰. De um modo geral, as crianças apresentam um padrão de colonização persistente e atuam como vetores disseminadores de *S. aureus* tanto na comunidade como em instituições de saúde²⁰. Um estudo longitudinal realizado no Reino Unido mostrou que mais de 70% dos bebês acompanhados tiveram pelo menos uma cultura nasal positiva para *S. aureus* ao longo do estudo, tendo a colonização nasal diminuído de 45% nas primeiras 8 semanas de vida para 21% aos 6 meses de idade^{19,25}. Em Portugal, um estudo conduzido entre 2006 e 2009 detetou uma taxa de colonização por *S. aureus* de 17% na nasofaringe de crianças com idades inferiores a 6 anos a frequentar creches/jardins de infância²⁶. Alguns estudos mostraram que a prevalência da colonização por estirpes MRSA aumentou significativamente entre hospedeiros saudáveis durante epidemias de MRSA na comunidade²⁸. Um estudo conduzido em Taiwan mostrou uma maior taxa de colonização nasal por estirpes MRSA em crianças e identificou a co-habitação com crianças como um fator de risco para a colonização por MRSA em adultos. Assim sendo, alguns autores consideram as crianças um importante reservatório de MRSA na comunidade²⁸.

1.3 Infecções por *S. aureus*

Apesar de *S. aureus* ser encontrado em colonização, existem casos em que pode ocorrer a rutura da barreira cutânea, permitindo o acesso aos tecidos mais profundos da pele e, eventualmente, à corrente sanguínea. Isto pode resultar em diferentes tipos de infecções, não só no local inicial, como também em locais distantes após disseminação sanguínea¹. *S. aureus* é agente etiológico de uma grande variedade de infecções em crianças, que podem ser divididos em três grandes grupos:

- Infecções superficiais da pele e tecidos moles, tais como foliculite, furúnculos, impetigo, celulite e infecções associadas a queimaduras, feridas operatórias ou à presença de dispositivos médicos^{29,30}
- Infecções sistêmicas, tais como bacteriemia, endocardite, miosite, pneumonia, infecções osteoarticulares ou septicemia³¹
- Infecções mediadas por toxinas, que incluem a intoxicação alimentar, a síndrome do choque tóxico ou a síndrome de pele escaldada (doença de Ritter)³².

A síndrome de pele escaldada é uma doença que é mais comum em crianças com menos de cinco anos de idade, pois estas têm o sistema imunológico menos desenvolvido e são mais suscetíveis à infecção³³⁻³⁵. Esta síndrome é caracterizada por uma erupção cutânea dolorosa, semelhante a uma queimadura, que causa descamação da pele. *S. aureus* liberta toxinas esfoliativas que afetam as células da camada mais externa da pele, causando a separação das camadas cutâneas e resultando na aparência de pele escaldada³³⁻³⁵. Surtos ocasionais desta síndrome podem ocorrer em ambientes como creches, hospitais ou outras instituições onde há contato direto entre crianças³³⁻³⁵.

Estudos anteriores mostraram que as faixas etárias mais frequentemente afetadas por infecções por *S. aureus* podem variar de acordo com particularidades de cada população, incluindo a exposição a nível comunitário e hospitalar a que as crianças são submetidas²⁸. Alguns estudos relataram surtos de infecções da pele e tecidos moles em recém-nascidos causados por estirpes MRSA³⁶. Wu *et al.*, observaram que 37.6% das infecções da pele e dos tecidos moles por *S. aureus* ocorre em crianças com menos de um ano de idade³⁷. *S. aureus* constitui cerca de 10% a 17% dos microrganismos mais frequentemente isolados nos doentes com sepsis e cerca de 10% das infecções hospitalares da corrente sanguínea em crianças é causada por *S. aureus*³⁸⁻⁴⁰. Na China, um estudo publicado por Qiao *et al.*, reiterou que a maioria das infecções invasivas pediátricas na comunidade ocorre em crianças menores de um ano de idade, incluindo bacteriemia e pneumonia⁴¹. A taxa de mortalidade causada pela bacteriemia em crianças por *S. aureus* pode variar entre 0.7% a 5.1% e até um terço dos doentes com esta patologia desenvolvem complicações graves^{40,42}.

1.4 Genoma de *S. aureus*

O genoma do *S. aureus* consiste de um cromossoma circular com aproximadamente 2.8 megabases (Mb) e um conteúdo de guanina-citosina de aproximadamente 32.7%⁴³. Estão disponíveis mais de 89000 genomas na base de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI)⁴³ (consultado a 05 de fevereiro de 2024).

O seu genoma completo é composto por genes centrais, genes variáveis e elementos genéticos móveis (“mobile genetic elements”, MGEs)⁴⁴. Os genes centrais são os genes essenciais para a sobrevivência e funcionamento básico da célula bacteriana e estão presentes em todas as estirpes de *S. aureus*⁴⁴. Os genes variáveis podem variar entre diferentes estirpes de *S. aureus* por meio de mutações, rearranjos genéticos ou aquisição de novos genes⁴⁴. Estes genes podem conferir características únicas às estirpes que os possuem, tais como resistência a antibióticos ou alteração da sua capacidade de causar infecções⁴⁴. Por último, MGEs são segmentos de DNA que se podem mover dentro do genoma bacteriano ou entre diferentes organismos bacterianos⁴⁴. Os MGEs podem constituir até 15% a 20% do genoma e incluem plasmídeos, transposões e bacteriófagos⁴⁴. Esses elementos genéticos são responsáveis pela mobilidade do DNA, permitindo a transferência horizontal de genes entre as bactérias^{45,46}. Desempenham um papel crucial na evolução e na capacidade de adaptação deste microrganismo a diferentes ambientes^{32,47}. Ao longo do tempo os genomas de *S. aureus* sofrem mutações e adquirem ou perdem MGEs que contém genes de resistência ou virulência³².

1.5 Fatores de virulência

O genoma de *S. aureus* possui uma variedade de genes que codificam potenciais fatores de virulência, entre os quais se incluem componentes estruturais, toxinas ou enzimas (**Figura 4**)⁴⁸⁻⁵¹. Grande parte destes fatores estão associados à superfície celular enquanto outros são secretados para o exterior da célula. As funções que desempenham incluem a evasão das defesas do hospedeiro, a ligação a componentes do hospedeiro ou a destruição tecidual⁵². Tendo em conta os fatores de virulência associados à bactéria, bem como os mecanismos de defesa do hospedeiro, a infecção pode ou não se propagar pelo organismo⁵³.

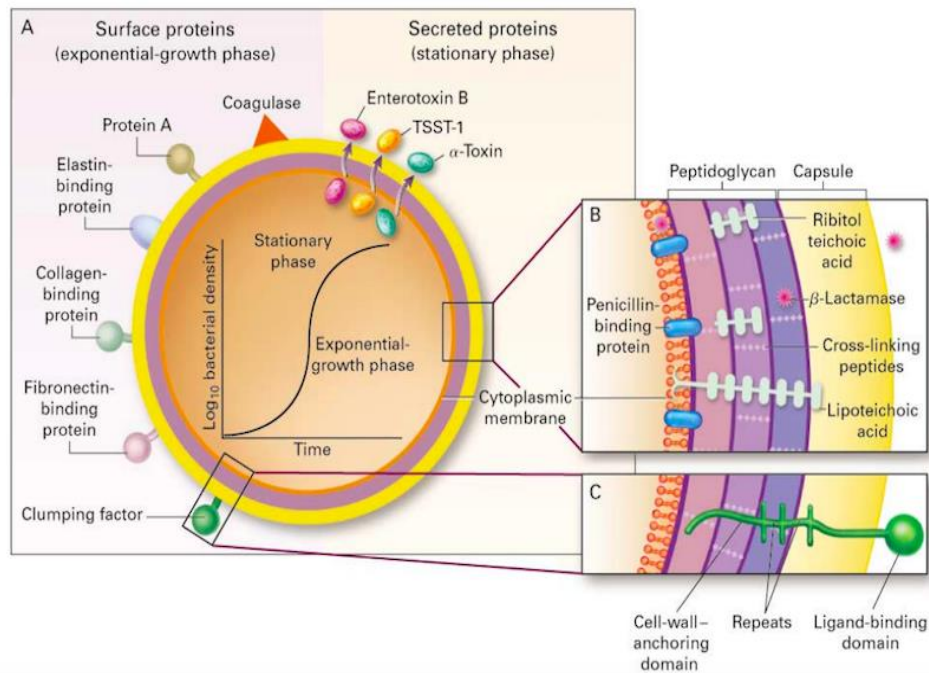


Figura 4 - Fatores de virulência de *S. aureus*.

Reproduzido de ⁽³²⁾

O painel A representa a superfície de *S. aureus* e as proteínas secretadas.

Os painéis B e C mostram seções transversais, membrana citoplasmática, parede celular e cápsula

1.5.1 Componentes estruturais

● Proteínas de superfície

S. aureus possui várias proteínas associadas à parede celular que são responsáveis por interações constantes com o hospedeiro. Estas proteínas caracterizam-se por um terminal N exposto ao ambiente extracelular, uma região hidrofóbica que atravessa a membrana plasmática e, por último, uma região de ligação localizada no terminal C, que liga à parede celular³².

Uma das principais proteínas de superfície é a proteína A estafilocócica (“Staphylococcal protein A”, SpA), a qual tem a capacidade de se ligar à região constante (Fc) das imunoglobulinas, impedindo assim a ligação dos anticorpos às regiões Fab do recetor de linfócitos B que promoveria a opsonofagocitose⁵⁴⁻⁵⁸.

As proteínas de superfície incluem igualmente um número considerável de MSCRAMMs (“Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules”), que são fatores de virulência que estabelecem ligações com proteínas da matriz extracelular do hospedeiro. Fazem parte deste grupo proteínas de ligação à elastina (EbpS) e as proteínas de ligação à fibrinogénio (FnbA e FnbB), por exemplo^{49,59}. Um outro exemplo de proteína

de superfície é o “clumping factor A” (ClfA), que se liga ao fibrinogénio imobilizado e é sintetizado e expresso durante as várias fases de crescimento de *S. aureus*, contribuindo para a colonização e formação de biofilmes⁶⁰⁻⁶². Um outro fator relacionado, “clumping factor B” (ClfB), está presente apenas na fase de crescimento exponencial de *S. aureus* em condições de anaerobiose e promove a agregação celular na presença de fibrinogénio solúvel^{49,61}. A “collagen binding protein” (Cna) medeia a aderência das bactérias ao colagénio⁴⁹.

- **Cápsula**

As estirpes de *S. aureus* produzem uma estrutura de natureza polisacarídica que envolve a parede celular bacteriana. A cápsula dificulta o acesso dos anticorpos às estruturas antigénicas localizadas na superfície da bactéria. Deste modo, interfere com a fagocitose das bactérias, para além de atuar como barreira para moléculas hidrofóbicas tóxicas e proporciona aderência a outras bactérias e proteínas de tecidos de hospedeiros^{6,63}.

Karakawa e Vann relataram pela primeira vez que a maioria das estirpes de *S. aureus* possuíam cápsulas⁶⁴. Estudos envolvendo a serotipagem de estirpes *S. aureus*, decorridos em diversas regiões geográficas, revelaram que as estirpes dos serotipos 5 e 8 representam aproximadamente 25% e 50%, respetivamente, das estirpes provenientes do Homem⁶⁵.

- **Peptidoglicano e ácidos teicóicos**

A parede celular das bactérias de Gram positivo é dividida em duas camadas funcionais de glicopolímeros compostas maioritariamente por peptidoglicano, em menor quantidade ácidos teicóicos e uma grande variedade de polissacarídeos e diferentes proteínas como as proteínas de ligação à penicilina (“penicillin binding proteins”, PBPs)⁶⁶⁻⁶⁹.

O peptidoglicano é uma macromolécula essencial para a viabilidade da bactéria cuja síntese é o alvo de várias classes de antibióticos, incluindo β -lactâmicos e glicopeptídeos^{69,70}.

Os ácidos teicóicos são polímeros capazes de conferir rigidez à parede celular, contribuindo para a manutenção da sua forma. Atuam igualmente na ligação à fibronectina e participam na divisão celular⁶. Desempenham funções importantes na resistência às condições adversas a que as bactérias estão sujeitas (ex. altas temperaturas)^{66,71}.

1.5.2 Toxinas

As estirpes de *S. aureus* podem produzir uma grande variedade de toxinas, que são agrupadas de acordo com os seus mecanismos de ação³². As citotoxinas induzem a formação de poros na membrana celular de células de mamíferos e provocam alterações no processo pró-inflamatório. Estes danos celulares podem ter como consequência uma infecção generalizada em todo o organismo³².

Entre as citotoxinas produzidas por *S. aureus* encontram-se as hemolisinas α , β , δ e γ . A α -hemolisina, que atua contra uma vasta gama de células do hospedeiro, tais como eritrócitos, células endoteliais, células epiteliais, monócitos, macrófagos, linfócitos T, entre outros⁷². A β -hemolisina cliva a esfingomiélin presente na membrana celular dos eritrócitos, leucócitos, entre outras células, em fosfolina e ceramida^{73,74}.

A leucocidina de Panton-Valentine (“Panton-Valentine leucocidin” – PVL) é uma das toxinas de *S. aureus* que mais interesse a nível clínico e epidemiológico tem suscitado. Esta é uma exotoxina leucocitolítica codificada por dois genes, *lukF-PV* e *lukS-PV*, que conduz à lise celular de leucócitos pela formação de poros na membrana celular destas células⁷⁵. A PVL foi epidemiologicamente associada a infeções cutâneas graves e casos de pneumonia necrotizante, tendo igualmente sido identificada uma maior prevalência desta toxina em estirpes MRSA adquiridas na comunidade^{6,32,76}.

S. aureus produz ainda várias enterotoxinas que podem atuar como toxinas pirogênicas, as quais partilham semelhanças na sequência de aminoácidos e por isso estão estruturalmente relacionadas. Estas funcionam como superantígenos ligando-se às proteínas do complexo major de histocompatibilidade (MHC) de classe II, causando uma proliferação exacerbada de linfócitos T e consequentemente libertação de citoquinas. Diferentes domínios da molécula de enterotoxina são responsáveis pela síndrome do choque tóxico e intoxicação alimentar. Apesar da pouca homologia da sequência de aminoácidos, a toxina da síndrome do choque tóxico-1 (TSST-1) é estruturalmente semelhante às enterotoxinas B e C³². Estudos anteriores indicam que o gene da TSST-1 pode ser encontrado em até 20% das estirpes de *S. aureus*^{74,77}.

As toxinas esfoliativas, que incluem as toxinas epidermolíticas A e B, causam eritema e separação da camada mais exterior da pele, dando origem à síndrome da pele escaldada estafilocócica referido anteriormente^{78,79}.

1.5.3 Enzimas

S. aureus produz ainda um grande número de enzimas. Entre estas incluem-se lípases, que hidrolisam os lípidos e assim sendo garantem a sobrevivência de *S. aureus* nas zonas sebáceas do corpo como a pele e mucosas e contribuem para a colonização e subsequente infecção^{32,80}. A hialuronidase que hidrolisa os ácidos hialurónicos da matriz celular, facilita a disseminação do agente patogénico e promove a invasão dos tecidos hospedeiros^{32,80}. A coagulase que converte o fibrinogénio em fibrina insolúvel e protege o *S. aureus* da resposta imunológica do hospedeiro, pela formação de coágulo ao longo das células bacterianas^{32,80}. A fibrinolisinase (também designada por estafiloquinase) que dissolve os coágulos de fibrina ou a DNase, capaz de hidrolisar o DNA, facilitando a disseminação da infeção^{6,81,82}.

1.6 Métodos de tipagem de *S. aureus*

A aplicação de métodos de tipagem tem vários objetivos, entre os quais rastrear a origem e a disseminação de microrganismos patogénicos, identificar as fontes de infeção, caracterizar clones associados a surtos ou epidemias ou monitorizar a disseminação de linhagens resistentes a antibióticos, tal como as estirpes MRSA⁸³. São importantes também para perceber as relações evolutivas entre diferentes linhagens de um microorganismo⁸³.

Nos anos sessenta, quando surgiram as primeiras estirpes de MRSA, vários métodos de tipagem foram desenvolvidos na tentativa de monitorizar a disseminação destas estirpes. Inicialmente, foram desenvolvidos métodos fenotípicos e de seguida métodos genotípicos⁸⁴. Entre os métodos fenotípicos usados para a caracterização de estirpes de *S. aureus* contam-se a serotipagem com base nos antígenos capsulares ou a tipagem fágica⁸⁵. Vários métodos de genotipagem foram aplicados à caracterização das estirpes de *S. aureus* ao longo dos anos de modo a definir as principais linhagens genéticas causadoras de infeção.

1.6.1 Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE)

A PFGE é um método de tipagem molecular de referência na medida em que apresenta um elevado poder discriminatório⁸⁶. Este método consiste na extração do DNA total de uma estirpe bacteriana seguido da sua fragmentação através do uso de enzimas de restrição de corte pouco frequente que reconhecem vários locais no cromossoma bacteriano. Os fragmentos de DNA são posteriormente separados por eletroforese que permite a separação de fragmentos de alto peso molecular⁸⁷. Como resultado, obtêm-se um padrão de bandas para cada uma das estirpes analisadas. A comparação dos padrões correspondentes às diversas estirpes permite aferir quão relacionadas são⁸⁶. A PFGE foi durante longos anos um método de tipagem muito utilizado para estudar a epidemiologia local durante surtos de *S. aureus*^{83,84}. Esta técnica permite também avaliar a diversidade de uma população bacteriana, bem como identificar a presença de clones específicos. No caso de *S. aureus*, clones epidémicos (como USA300 ou EMRSA-15, por exemplo) foram definidos com base na utilização de PFGE^{88,89}. No entanto, uma das maiores limitações deste método é a comparação de resultados obtidos em diferentes laboratórios, a qual está dependente da rigorosa padronização dos protocolos^{83,84}. A implementação de metodologias que permitem a sequenciação completa do genoma, contribuíram para a diminuição da utilização da PFGE.

1.6.2 *spa typing*

Um método igualmente utilizado na definição de linhagens clonais de *S. aureus* consiste na amplificação por reação em cadeia de polimerase (“polymerase chain reaction” – PCR) e sequenciação da região polimórfica X do gene da proteína SpA (gene *spa*). Esta região localiza-se após a região C-terminal que codifica a sequência de fixação na parede celular e contém um número variável de repetições. Esta região é extremamente polimórfica e por consequência permite a discriminação necessária para investigações de possíveis surtos^{90,91}. Nesta técnica um tipo *spa* é atribuído com base nas ferramentas fornecidas na Internet e a sua comparação com uma base de dados incluindo estirpes provenientes de vários locais do mundo^{90,91}.

A tipagem pelo método de *spa typing* é uma alternativa ao PFGE para fins epidemiológicos, tendo como vantagens a portabilidade dos dados e o facto de ser um método menos laborioso e mais rápido, com um poder discriminatório similar. Face a

métodos que implicam a amplificação por PCR e sequenciação de vários genes, como é o caso da tipagem de sequência multilocus (“multilocus sequence typing” – MLST) tradicional, tem a vantagem de ser também menos trabalhoso pois envolve apenas um *loci*^{84,91}. Contudo, também tem limitações e em algumas circunstâncias requer testes adicionais para garantir que se identifica com precisão certas linhagens definidas por MLST^{92,93}.

1.6.3 “Multilocus sequence typing” (MLST)

O MLST foi desenvolvido em 1998 e consiste na amplificação por PCR e sequenciação de genes “housekeeping” com o intuito de analisar a variação nas suas sequências. Estes genes estão presentes em todas as estirpes de uma determinada espécie bacteriana e codificam diferentes proteínas com funções celulares fundamentais. O MLST é considerado o método de referência para estudar e caracterizar a estrutura genética das populações de *S. aureus*⁹⁴. O esquema atualmente aplicado nesta espécie baseia-se em fragmentos internos com aproximadamente 450 pb de 7 genes “housekeeping”^{84,95}.

Os alelos de cada um dos sete *loci* são numerados e é determinado um perfil alélico que define o tipo de sequência (“sequence type”, ST) de cada estirpe. Esse ST serve para caracterizar a estirpe e atribuir uma nomenclatura para a mesma, utilizando a base de dados dos alelos conhecidos. Uma vez que existe uma grande variedade de alelos em cada um dos sete *loci*, é pouco provável que estirpes não relacionadas tenham o mesmo perfil alélico. Assim, estirpes que possuam o mesmo perfil alélico são consideradas membros do mesmo clone^{84,96}.

É utilizado algoritmos de agrupamento como eBURST⁹⁷ ou goeBURST para inferir os perfis alélicos e as relações filogenéticas entre vários STs⁹⁸. Estes algoritmos permitem estabelecer uma árvore de relações tendo em conta o número de diferenças no perfil alélico, e agrupa-os em complexos clonais (CCs)^{95,99}. Um determinado genótipo pode se tornar num clone fundador da população, quando há aumento da sua frequência na população, e este pode ser seguido por uma diversificação de forma contínua e gradual por meio de mutação e ou recombinação. Para cada CC, existe um ST fundador, definido como aquele que difere do maior número de outros STs somente num dos alelos, ou seja, aquele que tem o maior número de “single locus variants” (SLVs)^{95,99}. Do mesmo modo, podem ser definidos “double locus variants” (DLVs) quando diferem em dois alelos,

“triple locus variants” (TLVs) quando diferem em três, e assim sucessivamente^{95,97,99}. Este método é muito vantajoso visto que é possível comparar facilmente os resultados obtidos em diferentes laboratórios através do uso de uma base de dados a nível global^{84,96}.

1.6.4 Sequenciação do genoma completo (“Whole-genome sequencing”, WGS)

WGS é atualmente aceite como uma abordagem de alta resolução para a caracterização de estirpes bacterianas e para o controlo de infeções, pois permite obter um perfil genético para cada estirpe com uma resolução em paralelo noutros métodos de tipagem^{100,101}. A informação obtida por WGS pode ser utilizada para tipagem epidemiológica, possibilitando estudos de evolução de microrganismos e disseminação de linhagens clonais, bem como a vigilância, investigação e monitorização de surtos¹⁰². Desta forma melhora o controlo das investigações de surtos de MRSA, bem como a compreensão da sua propagação e evolução^{100,101}.

A bioinformática é neste caso uma ferramenta crucial, pois a partir dos dados de WGS consegue-se obter informações de tipagem anteriormente obtidas pelos métodos tradicionais¹⁰³. Por exemplo, as sequências dos *loci* utilizados em determinado esquema de MLST podem ser extraídas das sequências genómicas das estirpes. A WGS permite também construir esquemas de “core genome” MLST (cgMLST) em que são utilizados os *loci* presentes em todas as estirpes de uma dada espécie bacteriana, ao invés de um número limitado de genes como na MLST convencional. A utilização de WGS possibilita também o estudo da presença de genes específicos de virulência e resistência aos antibióticos. Esta tecnologia tem igualmente potencial de implementação em laboratórios de rotina clínica como ferramenta de diagnóstico¹⁰⁴.

1.7 Antimicrobianos

1.7.1 Tratamento das infecções por *S. aureus*

Nos tempos que precederam a utilização de antibióticos, as taxas de mortalidade por infecções causadas por *S. aureus* eram superiores a 80%^{69,105}.

S. aureus é um agente patogénico com uma elevada capacidade de adquirir resistência a diversas classes de antimicrobianos, pelo que o tratamento das infecções causadas por este microrganismo pode ser bastante desafiante com opções terapêuticas limitadas¹⁰⁶. Apesar das resistências reportadas, são suscetíveis à ação de vários medicamentos direcionadas para bactérias de Gram positivo como por exemplo macrólidos e lincosamidas, aminoglicosídeos, tetraciclina ou cloranfenicol, entre outros^{107,108}.

O uso de β -lactâmicos para o tratamento de infecções por *S. aureus* é limitado pelo facto de as resistências serem bastantes comuns nesta espécie. A penicilina é pouco eficaz pois a maioria das estirpes produz penicilinasas responsáveis pela sua inativação. Nas estirpes que apenas produzem β -lactamases, as opções de tratamento são penicilinas semi-sintéticas (como a flucloxacilina) ou as cefalosporinas, como por exemplo a ceftazolina ou a cefotaxima¹⁰⁹. A combinação da amoxicilina com o ácido clavulânico, um inibidor de β -lactamases, é também uma opção para infecções leves a moderadas causadas por estirpes suscetíveis à meticilina (“methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*, MSSA)¹¹⁰.

Para as estirpes resistentes à meticilina (MRSA) o tratamento é mais complexo devido não só à resistência à grande maioria dos β -lactâmicos, como ao facto das resistências concomitantes a outras classes de antibióticos. Neste caso, algumas opções terapêuticas incluem a vancomicina, daptomicina, linezolida ou a ceftarolina esta última uma cefalosporina com ação anti-MRSA⁴⁶.

Tendo em consideração que a resistência a antimicrobianos é frequente em *S. aureus*, a escolha do antibiótico a usar na terapêutica das infecções por esta bactéria deve ter em conta os testes de suscetibilidade aos antimicrobianos^{107,108}. No caso de infecções invasivas por *S. aureus* em crianças, as opções terapêuticas incluem a vancomicina, a daptomicina, a clindamicina ou a linezolida¹¹¹.

1.7.2 β -lactâmicos

Os β -lactâmicos são considerados a classe de antibióticos mais importantes a nível clínico, devido às suas características, nomeadamente a sua eficácia terapêutica e a baixa toxicidade para o Homem. Possuem um anel β -lactâmico constituído por três átomos de carbono (C) e um átomo de azoto (N) com radicais substituintes^{112,113}. O anel β -lactâmico determina o mecanismo de ação do antibiótico, isto é, liga às PBPs inibindo a síntese de peptidoglicano, da parede celular bacteriana^{112,113}. Os β -lactâmicos classificam-se em 4 grandes grupos (penicilinas, cefalosporinas, monobactams e carbapenems) que se distinguem pelos espectros de ação e resistência às β -lactamases¹¹⁴.

A resistência aos β -lactâmicos em *S. aureus* pode ser mediada por dois mecanismos distintos, nomeadamente pela produção de β -lactamase ou por produção de uma PBP com baixa afinidade para os antibióticos β -lactâmicos⁶⁹.

O primeiro mecanismo a ser descrito foi a produção de uma β -lactamase, PC1, codificada pelo gene *blaZ*, designada penicilinase. Esta, hidrolisa o anel β -lactâmico e consequentemente inativa o antibiótico¹¹⁵. Para além da penicilina, a β -lactamase produzida pelas estirpes de *S. aureus* confere resistência a antibióticos como a ampicilina ou amoxicilina, não tendo atividade contra penicilinas semissintéticas (tais como a meticilina e seus derivados oxacilina, flucloxacilina ou nafcilina⁶⁹), cefalosporinas, monobactams ou carbapenems¹¹³. Existem também inibidores de β -lactamases que se ligam de forma irreversível ao centro ativo das β -lactamases impedindo que as mesmas se liguem ao anel β -lactâmico e inativem o antibiótico. Assim sendo, a funcionalidade inicial do antibiótico é restabelecida. São exemplos destes inibidores o ácido clavulânico combinado com a amoxicilina, o sulbactam ou o tazobactam¹¹³. Atualmente, mais de 90% das estirpes de *S. aureus* produzem β -lactamases⁶⁹.

- **Resistência à meticilina**

O segundo mecanismo de resistência aos β -lactâmicos identificado em *S. aureus* e aquele que se reveste de maior importância clínica está associado à presença do gene *mecA*, o qual codifica a proteína de ligação à penicilina 2a (PBP-2a). Contrariamente às PBPs nativas de *S. aureus*, a PBP-2a têm baixa afinidade para os β -lactâmicos, permitindo a síntese de peptidoglicano mesmo na presença destes antibióticos¹¹⁶. A presença do gene *mecA* é a característica distintiva das estirpes MRSA. Este mecanismo confere resistência a virtualmente todos os β -lactâmicos, ainda que nos últimos anos tenham sido

desenvolvidas algumas cefalosporinas com ação anti-MRSA, como é o caso da ceftarolina¹¹⁶. O gene *mecA* está localizado num elemento designado de cassete cromossômica estafilocócica *mec* (*staphylococcal cassette chromosome mec, SCCmec*). O elemento *SCCmec* encontra-se integrado no mesmo local em todos os genomas de estirpes MRSA, numa “*open reading frame*” (ORF) denominada *orfX* e divide-se em vários tipos de acordo com a sua estrutura (**Figura 5**)¹¹⁷.

O elemento *SCCmec* é constituído por dois complexos essenciais: o complexo do gene *mec* e o complexo do gene *ccr*. O complexo *mec* contém para além do gene *mecA*, os genes do repressor *MecI* e do transdutor de sinal transmembranar *MecRI* responsáveis pela regulação da produção de PBP-2a¹¹⁷. Os genes do complexo *ccr* garantem a integração e a excisão da cassete. Os complexos de genes *mec* e *ccr* são ladeados por 3 regiões de junção altamente variáveis (J1, J2 e J3) que podem incluir sequências de inserção, transposões ou cópias de plasmídeos com genes de resistência a metais pesados e a outros antibióticos não β -lactâmicos¹¹⁷. A nomenclatura atual padronizada das estirpes MRSA inclui a identificação do contexto genómico pelo ST ou CC (definidos por MLST) e o tipo de elemento *SCCmec*, o qual é indicado por algarismos romanos de I a XIII de acordo com a sua estrutura¹¹⁸.

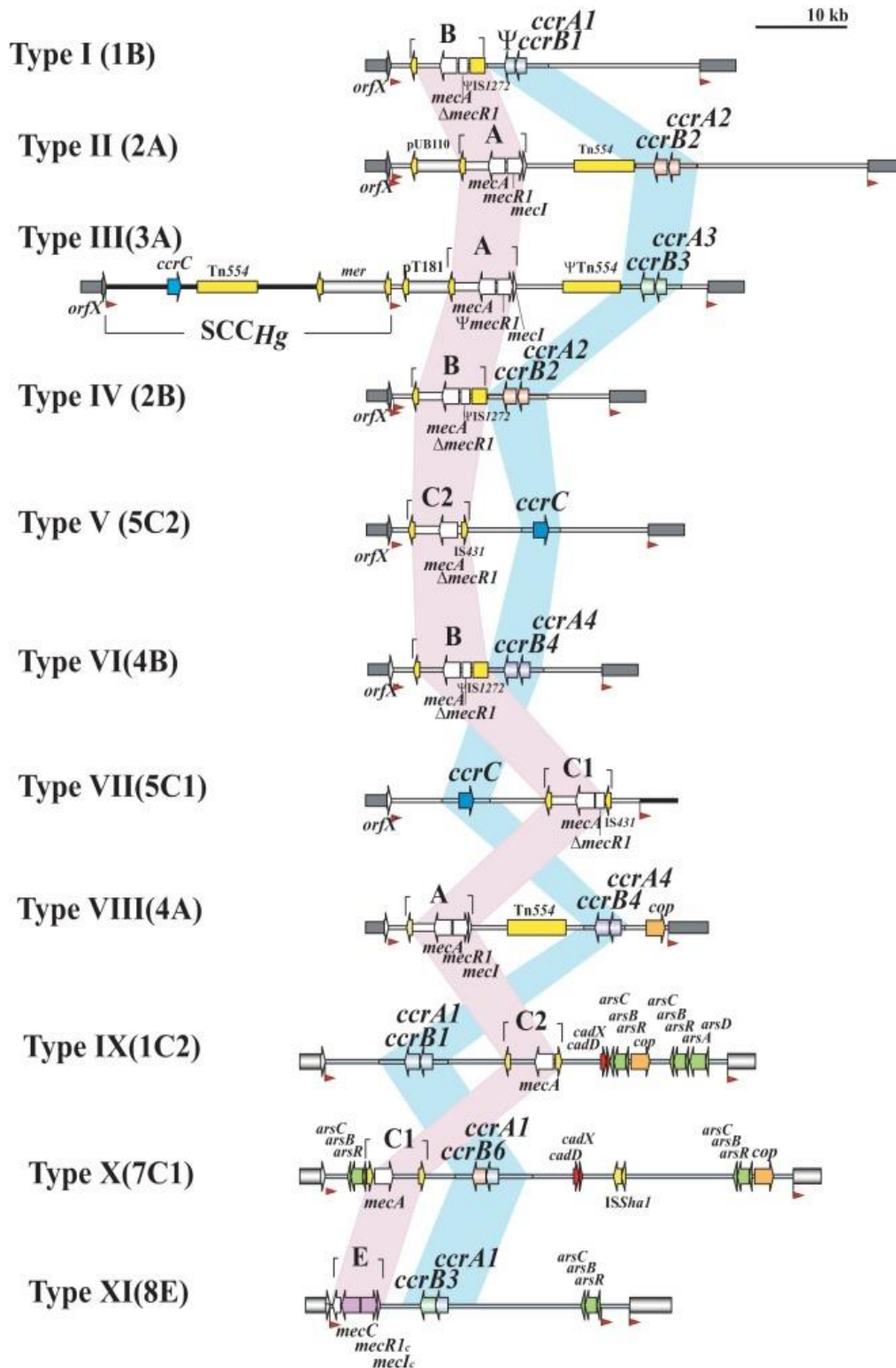


Figura 5 - Estrutura dos elementos SCCmec em *S. aureus*

Reproduzido de ⁽¹¹⁸⁾

1.7.3 Macrólidos e lincosamidas

Os macrólidos e as lincosamidas são duas classes de antibióticos distintas que ligam ao mesmo local na subunidade 50S do ribossoma da bactéria, impedindo o alongamento da cadeia proteica e inibindo a síntese proteica^{119,120}. O alongamento dessa cadeia decorre num domínio localizado na maior subunidade do ribossoma, onde serão adicionados os aminoácidos¹¹⁹. Estas classes de antibióticos podem ser utilizadas como alternativas em casos que não é possível administrar os β -lactâmicos, por exemplo, no caso de doentes com hipersensibilidade aos β -lactâmicos ou em caso de infeção com estirpe resistente a estes antibióticos¹²¹.

A resistência a macrólidos e lincosamidas em *S. aureus* ocorre mais frequentemente por um mecanismo de alteração do alvo, codificado por genes *erm*. Os genes *ermA*, *ermB* ou *ermC* são frequentemente detetados em *S. aureus*¹²²⁻¹²⁴. O gene *ermA* encontra-se localizado no transposição Tn554, o gene *ermB* está localizado no transposição Tn551 e o gene *ermC* foi descrito num elemento com 3.7 kb localizado no plasmídeo pE194^{125,126}. Um outro gene, *ermT*, foi inicialmente descrito em estirpes causadoras de infeções em animais, contudo, estudos realizados a posteriori detetaram a presença deste gene também em infeções humanas, causadas tanto por estirpes MRSA como MSSA¹²⁷.

Os genes *erm* codificam enzimas capazes de conferir resistência constitutiva ou indutível pela metilação do rRNA 23S, reduzindo a ligação de macrólidos, lincosamidas e estreptograminas B ao ribossoma. Na prática laboratorial, fenótipos de resistência a macrólidos, lincosamidas e estreptograminas B (MLS_B) podem ser determinados pelo teste de difusão em disco com recurso a discos de eritromicina (macrólido) e clindamicina (lincosamida) colocados em proximidade (**Figura 6**)¹²²⁻¹²⁴.

O gene *msr(A)* ("macrolide-streptogramin B resistance A") codifica uma proteína pertencente à família de proteínas transportadoras de efluxo, cuja função é remover os antibióticos do interior das células bacterianas, reduzindo a concentração intracelular dos antibióticos¹²⁵. A presença deste gene origina um fenótipo M, isto é, resistência apenas aos macrólidos.

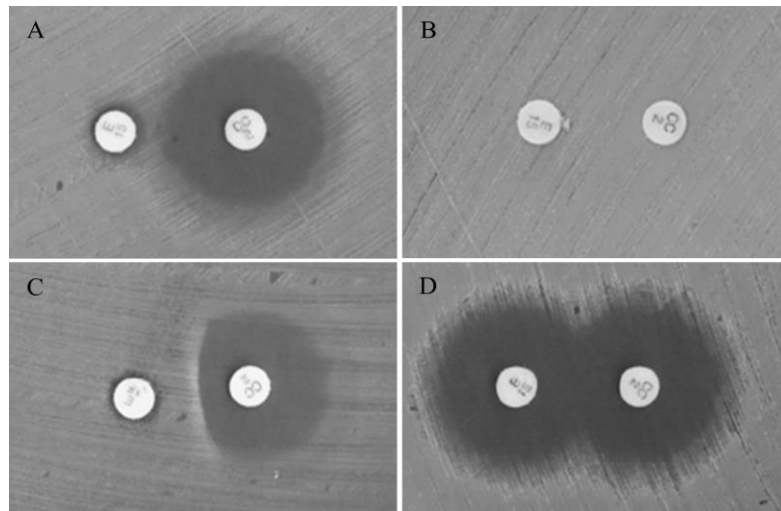


Figura 6 - Teste da difusão em disco para *Staphylococcus spp*

- a) **Fenótipo M** - resistência à eritromicina e halo de suscetibilidade à clindamicina sem qualquer interação entre os dois halos;
- b) **Fenótipo cMLS_B** - resistência constitutiva à eritromicina e à clindamicina, isto é, resistente a macrólidos e lincosamidas
- c) **Fenótipo iMLS_B** - resistência à lincosamida só é expressa na presença do macrólido, resultando numa deformação em forma de "D" do halo da clindamicina na zona de proximidade do disco de eritromicina
- d) Suscetibilidade à eritromicina e à clindamicina

1.7.4 Vancomicina

A utilização da vancomicina para o tratamento de infecções humanas foi aprovada em 1958. Contudo, só em finais dos anos 80 tornou-se num antibiótico de 1ª linha no tratamento de infecções por estirpes MRSA¹²⁸. Este glicopéptido inibe as reações de transglicosilação e transeptidação que medeiam a formação da parede celular^{4,129}. O mecanismo de ação da vancomicina nas bactérias de Gram positivo consiste na ligação não covalente (pontes de hidrogénio) aos resíduos D-alanina-D-alanina da cadeia de peptidoglicano recém sintetizada^{129,130}.

Em 2002, nos EUA, reportou-se o primeiro caso de *S. aureus* resistente à vancomicina ("vancomycin-resistant" *S. aureus*, VRSA)¹²⁸. A resistência à vancomicina nas estirpes VRSA (concentração inibitória mínima [CIM]>32 mg/L) é conferida pelo operão *vanA*. Ocorre devido à codificação no operão *vanA* de enzimas responsáveis por sintetizar um precursor de peptidoglicano com a sequência D-alanina-D-lactato em vez de D-alanina-D-alanina. Esta alteração impede a ligação do antibiótico ao peptidoglicano na parede celular bacteriana, o que resulta no aparecimento de resistência (Figura 7)^{4,129}. Um

número muito reduzido de estirpes VRSA estão descritas na literatura, mantendo-se a resistência à vancomicina uma situação rara em estirpes de *S. aureus*¹³¹.

Em 1997 no Japão isolou-se pela primeira vez uma estirpe de *S. aureus* com resistência intermédia à vancomicina (“vancomycin-intermediate” *S. aureus*, VISA)¹²⁸. Embora o mecanismo exato não seja completamente compreendido, foi sugerido que as estirpes VISA (CIMs entre 8 e 16 mg/L) podem conter mudanças na estrutura do peptidoglicano ou na produção de quantidades reduzidas de precursores de peptidoglicano D-alanina-D-alanina⁴. Outra teoria sugere que as estirpes VISA podem estar relacionadas com alterações na expressão de genes envolvidos na regulação do crescimento da parede celular, o que poderia levar a uma parede celular mais densa e menos permeável à vancomicina⁴. A diminuição da suscetibilidade à vancomicina está relacionada com a hospitalização, infeções recorrentes e uso do antibiótico^{132,133}.

Existem ainda estirpes de *S. aureus* com resistência heteróloga à vancomicina (hetero-VRSA), o que se refere a um fenómeno no qual uma estirpe de *S. aureus* desenvolve resistência à vancomicina (CIM \geq 4 mg/L), mas essa resistência não é linear na população bacteriana. Isto é, apenas uma subpopulação de bactérias dentro da mesma estirpe apresenta resistência à vancomicina, enquanto as outras permanecem suscetíveis ao antibiótico¹³⁴. Nos dias de hoje, a ocorrência de estirpes VRSA, VISA e hetero-VRSA mantém-se uma situação rara¹³².

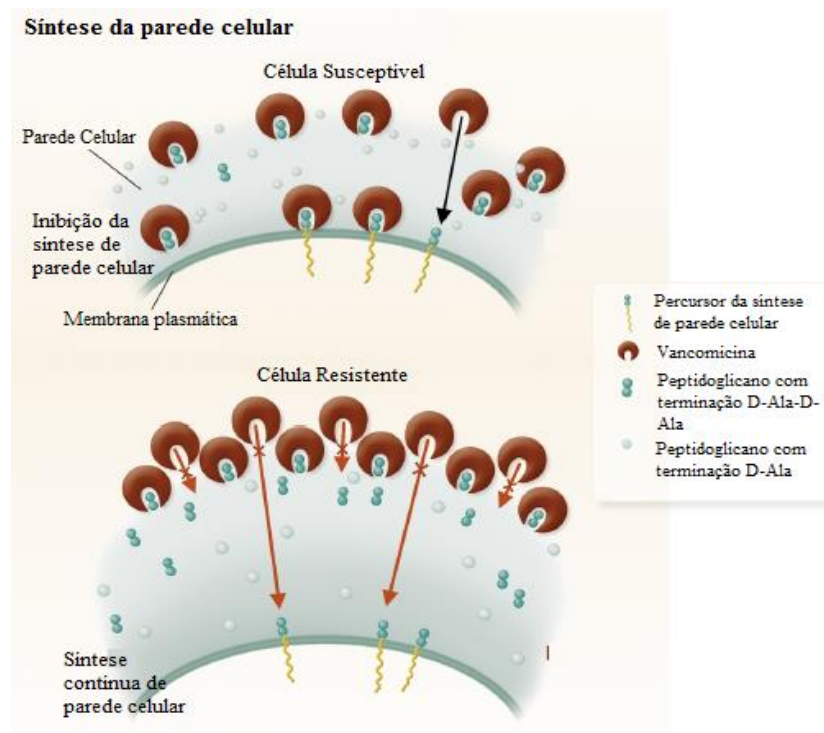


Figura 7 - Mecanismo de resistência de estirpes à vancomicina

Reproduzido de ⁽¹⁰⁶⁾

1.7.5 Outros antimicrobianos

As estirpes de *S. aureus* podem apresentar níveis de resistência variáveis a antimicrobianos de diferentes classes que podem ser considerados no tratamento de infecções por esta bactéria.

O ácido fusídico é usado habitualmente no tratamento tópico de infecções da pele e tecidos moles por *S. aureus*, mas também pode ser administrado por outras vias em caso de infecções mais graves¹³⁵. O ácido fusídico atua através da inibição do fator de alongamento G que é necessário à translocação de péptidos durante a síntese proteica. A resistência ao ácido fusídico é causada pela alteração do alvo, diminuição da permeabilidade a agentes externos e inativação pelos genes *fusA* e *fusB* em *S. aureus*¹³⁶.

As tetraciclinas constituem antibióticos semissintéticos que se ligam com uma elevada afinidade à subunidade ribossômica 30S da bactéria inibindo a síntese proteica¹³⁷. São agentes bacteriostáticos com atividade direcionada para uma grande variedade de microrganismos¹³⁷. A resistência à tetraciclina em *S. aureus* pode ser conferida por proteínas de proteção ribossomal, conferidas por genes como *tet(M)* ou *tet(O)* ou por bombas de efluxo, codificadas por genes como o *tet(L)* ou *tet(K)*¹³⁸. A utilização destes

antibióticos em crianças muito jovens é desaconselhado pelo risco de afetação do desenvolvimento ósseo e descoloração da dentição¹³⁹.

O cloranfenicol é um antibiótico bacteriostático que se liga à subunidade 50S do ribossoma, para inibir a síntese proteica da bactéria¹⁴⁰. A resistência a este agente é conferida pela degradação enzimática do antibiótico, mediada pela presença dos genes *cat*, os quais codificam acetiltransferases, e em alguns casos pela ação de bombas de efluxo¹⁴¹⁻¹⁴⁴.

A rifampicina atua na subunidade 13 da RNA polimerase DNA dependente das células procariontas, codificada pelo gene *rpoB*, inibindo a transcrição¹⁴⁵. Mutações na região de ligação do antibiótico originam resistência à rifampicina¹⁴⁶.

Os aminoglicosídeos atuam através da inibição da síntese proteica¹⁴⁷. O mecanismo de resistência aos aminoglicosídeos mais frequente é a inativação por ação de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos, tais como acetiltransferases ou fosfotransferases e nucleotidiltransferases¹⁴⁸. Estudos prévios apontam que a enzima mais frequente em estirpes estafilocócicas é a enzima bifuncional codificada pelo gene *aac(6')/aph(2'')*, que confere resistência à gentamicina, entre outros aminoglicosídeos¹⁴⁸.

As fluoroquinolonas, como a norfloxacin, são antibióticos de largo espectro utilizadas há várias décadas na terapêutica de infeções por bactérias de Gram negativo e Gram positivo, embora a sua utilização em idade pediátrica seja limitada por receio de possíveis danos em cartilagens com impacto no desenvolvimento das crianças¹⁴⁹. Esta classe de antibióticos liga às enzimas DNA girase e topoisomerase IV, inibindo o processo de replicação do DNA¹⁵⁰. Enquanto nas bactérias de Gram negativo o alvo primário das fluoroquinolonas é a DNA girase, nas bactérias de Gram positivo, como é o caso dos *Staphylococcus spp.*, atuam preferencialmente na topoisomerase IV^{151,152}. Nos Gram positivos a resistência ocorre por mutações nos genes que alteram o alvo ou pela redução da acumulação do fármaco mediada por bombas de efluxo¹⁵³.

A linezolid inibe o início da síntese de proteínas e consecutivamente a formação de um complexo ternário entre tRNA, N-formilmetionina (fMet), mRNA e o ribossoma^{154,155}.

O trimetoprim-sulfametoxazol (SXT) consiste numa combinação de forma proporcional e previamente estabelecida, de trimetoprim com uma sulfonamida (sulfametoxazol). Estes atuam sinergicamente inibindo diferentes etapas da síntese do ácido fólico bacteriano. A resistência ao SXT em estirpes de *S. aureus* é mediada por mutações no gene *folP*, que codifica a proteína dihidropteroato sintetase¹⁵⁶.

1.8 Epidemiologia das infeções por *S. aureus*

1.8.1 MRSA

As estirpes MRSA e as infeções por elas causadas são habitualmente divididas em associadas aos cuidados de saúde (HA-MRSA, “health-care-associated MRSA”) e aquelas com origem na comunidade (“community-associated MRSA”, CA-MRSA). Os primeiros casos de infeções por estirpes MRSA surgiram apenas dois anos após a introdução das penicilinas semissintéticas na prática clínica e aumentaram a prevalência nos anos seguintes¹⁵⁷. Inicialmente, as infeções por estirpes MRSA ocorriam em grande parte em ambiente hospitalar, contudo a partir de 1998, as estirpes MRSA começaram a surgir igualmente em doentes sem contacto prévio com instituições de saúde, ou seja, na comunidade (CA-MRSA)^{116,158}. A origem destas últimas estirpes resultou de processos evolutivos ainda pouco esclarecidos¹⁵⁹. Algumas destas linhagens foram responsáveis por infeções graves, tais como infeções músculo-esqueléticas ou pneumonias necrotizantes, e foram associadas à presença de PVL⁷⁵. Um exemplo é o clone CA-MRSA USA300, prevalente nos Estados Unidos da América, que se disseminou a nível mundial, inclusive em Portugal, estando associado a taxas de mortalidade e morbidade elevadas^{26,160,161}.

As estirpes HA-MRSA e CA-MRSA estão associados a diferentes tipos *SCCmec*. Nas estirpes HA-MRSA as formas mais comuns são os tipos I, II e III, enquanto nas estirpes CA-MRSA os tipos IV e V predominam⁶⁹. Dados epidemiológicos apontam para uma prevalência de HA-MRSA mais elevada na América do Norte, América do Sul, e Ásia (> 50%), taxas intermédias (entre os 25%–50%) na China, Austrália, África e alguns países do Sul da Europa (como Portugal, Grécia e Itália (37%) e menor prevalência em países do Norte da Europa (como é o caso de Países Baixos e países da Escandinávia) (**Figura 8**)⁹². A prevalência de estirpes MRSA em infeções invasivas em países da Europa em 2022 variou de 1.1% (Noruega) a 50.8% (Chipre) (**Figura 9**).

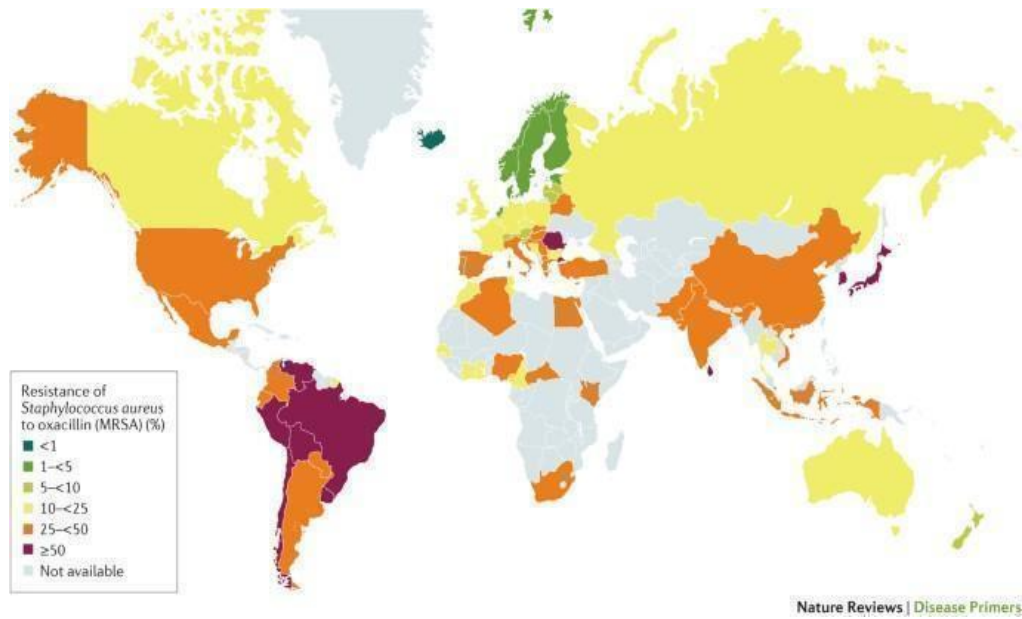


Figura 8 - Prevalência mundial de *S. aureus* resistente à metilina adquirido em hospitais

Reproduzido de (2)

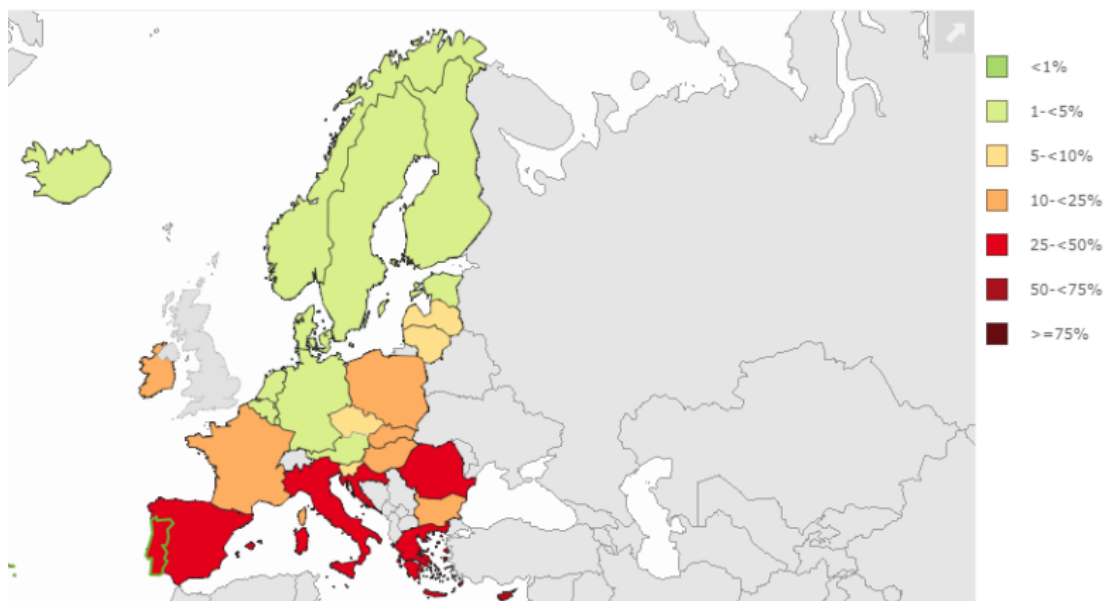


Figura 9 - Prevalência de estirpes MRSA em infeções invasivas (todas as idades) em países da União Europeia (2022)

Reproduzido <https://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx> acedido em 15/12/2023).

Inúmeros estudos epidemiológicos conduzidos ao longo das últimas décadas revelaram que os CCs de MRSA mais frequentemente detetados a nível mundial incluem CC5, CC8, CC22, CC30 ou CC45⁹². Na **Tabela 1** estão representados os principais clones de HA-MRSA, bem como o país onde foram relatados pela primeira vez.

*Tabela 1 - Principais clones de HA-MRSA.**Adaptado de (92)*

Clones	Linhagem (ST)	CC	Local	Ano
Ibérico ou UK-MRSA-5	ST247/ <i>SCCmec I</i>	CC8	Espanha	1989
Nova Iorque/Japão	ST5/ <i>SCCmec II</i>	CC5	Estados Unidos	1998
Brasileiro, húngaro	ST239/ <i>SCCmec III</i>	CC8	Brasil/Hungria	1992/3
EMRSA-15	ST22/ <i>SCCmec IV</i>	CC22	Reino Unido	1993
Pediátrico ou USA800	ST5/ <i>SCCmec IV</i>	CC5	Portugal	1992

Um estudo conduzido em Portugal mostrou que a colonização por estirpes MRSA em crianças no país era inferior a 1%¹⁶². Existem estudos recentes realizados em doentes sem contacto prévio com o ambiente hospitalar, que apontam as estirpes MRSA como responsáveis por até aproximadamente 25% das infeções¹⁶².

Apesar de nos últimos anos ter-se verificado um declínio do número de infeções por MRSA na União Europeia, Portugal continua a ter uma das maiores prevalências de estirpes MRSA a nível europeu¹⁶³. O valor mais elevado de estirpes MRSA em infeções invasivas em Portugal foi registado em 2011, com uma taxa de 54.6%¹⁶⁴. A taxa de resistência à meticilina tem diminuído continuamente desde então, atingindo um valor de 25.0% em 2022¹⁶⁴.

Na **Figura 10** está representada a evolução das taxas de MRSA provenientes de amostras invasivas, compreendidas entre os anos 1999 e 2022.

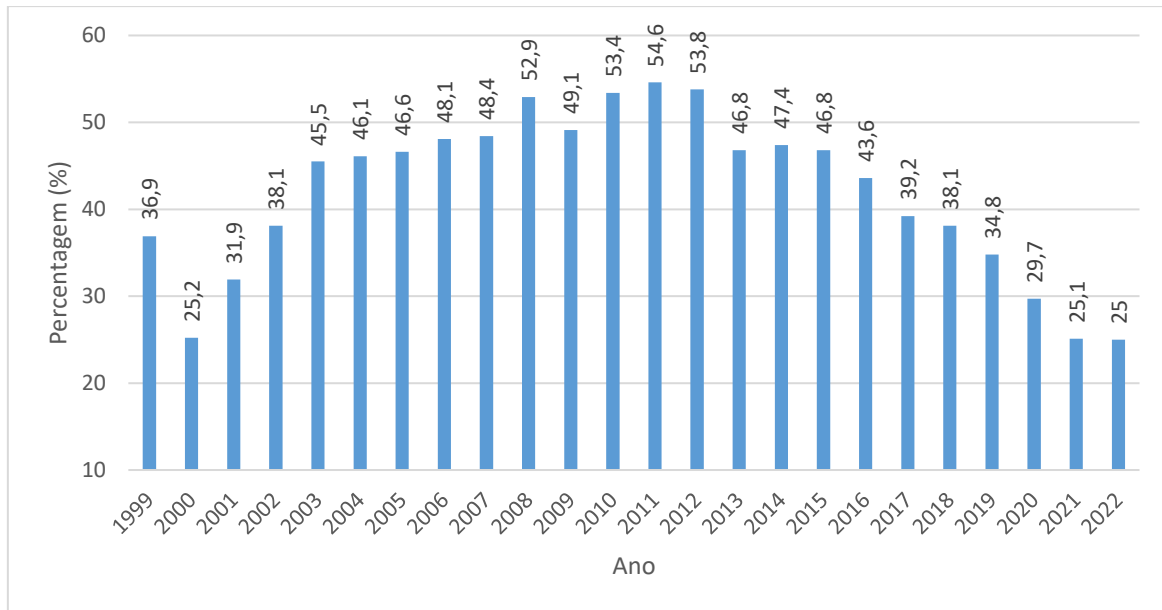


Figura 10 - Evolução da resistência à meticilina em estirpes invasivas de *S. aureus* em Portugal - 1999 a 2022

Dados obtidos de (<https://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx> acedido em 12/12/2023).

2. OBJETIVOS

As infeções por *S. aureus* são bastantes comuns e têm uma elevada importância clínica e social. Apesar de existirem na literatura científica vários estudos dedicados à tipagem molecular e caracterização das resistências aos antimicrobianos em estirpes de *S. aureus* em Portugal, em contexto de colonização e de infeção em diversas populações, os dados relativos à epidemiologia das infeções invasivas em idade pediátrica são raros. Assim, o presente estudo visa a caracterização das estirpes de *S. aureus* causadores de infeções invasivas em idade pediátrica em Portugal durante o período de 2015 a 2020.

Os objetivos específicos deste projeto são:

- Caracterizar as estirpes de *S. aureus* isoladas de infeções invasivas em doentes pediátricos provenientes de hospitais de Portugal.
- Avaliar a diversidade genética e identificar as linhagens clonais de *S. aureus* predominantes em infeção invasiva pediátrica no país.
- Caracterizar o conteúdo genético das linhagens clonais detetadas, identificando diferenças na distribuição de fatores de virulência e determinantes de resistência a antimicrobianos.
- Determinar o perfil de suscetibilidade a antimicrobianos das estirpes, identificando as resistências mais expressivas nesta população.
- Comparar os resultados obtidos com os dados disponíveis na literatura sobre a epidemiologia das infeções por *S. aureus* em Portugal e a nível global.

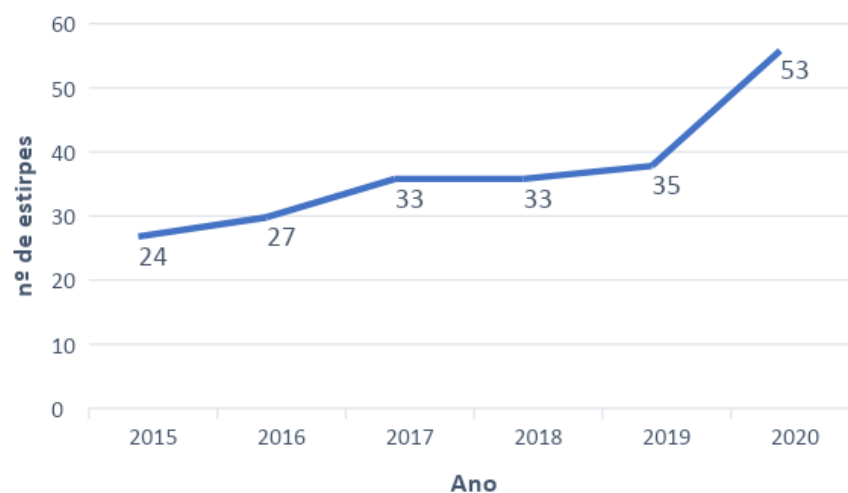
3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Considerações éticas

As estirpes utilizadas neste projeto foram recolhidas no âmbito de estudos previamente aprovados pela Comissão de Ética do Centro Académico de Medicina de Lisboa. Estes estudos foram considerados como atividade de vigilância, não obtendo novas informações relevantes para diagnóstico, estando isentos de consentimento informado. Além disto, decorreram segundo as diretrizes/regulamentos previstos e todos os dados e estirpes foram anonimizados, tornando impossível a sua associação com um indivíduo em particular. Assim, não estão envolvidas questões éticas neste projeto de dissertação.

3.2 Amostras em estudo

A coleção em estudo consistiu um total de 205 estirpes de *S. aureus* isoladas de infeções invasivas de doentes com idade inferior a 18 anos em Portugal entre os anos 2015 e 2020. A distribuição das estirpes por ano de estudo é indicada na **Figura 11**.



*Figura 11 - Distribuição das estirpes de *S. aureus* isoladas ao longo do período de estudo*

O estudo incluiu estirpes isoladas a partir de um produto biológico habitualmente estéril tais como o sangue (n=180; 87.8%), líquido sinovial (n=12; 5.9%), líquido cefalorraquidiano (n=2; 1%), líquido pleural (n=1; 0.5%), líquido peritoneal (n=1, 0.5%), e líquido pericárdico (n=1, 0.5%).

Foram ainda incluídas no estudo oito amostras obtidas de biópsias ósseas (n=4; 2.0%) biópsia ganglionar (n=1; 0.5%), abscesso inguinal (n=1; 0.5%), abscesso cerebral (n=1; 0.5%) e pus de artrite séptica (n=1; 0.5%). As estirpes em estudo foram isoladas e identificadas em 10 laboratórios de hospitais nacionais (**Tabela A1 – Anexos**), e posteriormente enviadas para o laboratório do Instituto de Microbiologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, no qual foram realizados todos os trabalhos de caracterização subsequentes. Uma única estirpe por doente foi incluída no estudo.

3.3 Condições de crescimento e morfologia das colónias

As 205 estirpes foram inoculadas em placas de gelose simples, “Tryptone Soya Agar” (TSA) (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido), e incubadas durante 24 horas a 35 °C em atmosfera não controlada. Após as 24 horas de incubação observou-se a morfologia das colónias, nomeadamente o tamanho e cor. Como teste confirmatório de identificação, procedeu-se à realização do teste da coagulase previamente à caracterização subsequente. Para tal, uma colónia com 24 horas de crescimento foi inoculada num tubo com 0.5mL de plasma de coelho (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, França) e incubada a 35°C em atmosfera não controlada. A observação da coagulação do plasma foi feita após um mínimo de 4 horas de incubação.

As estirpes foram armazenadas a –80 °C em “Tryptone Soya Broth” (TSB) (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido), suplementado com 15% (V/V) de glicerol (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA), a partir de culturas bacterianas com 24 horas de crescimento nas condições indicadas acima.

3.4 Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos

A suscetibilidade das estirpes a um conjunto de 16 antimicrobianos foi determinada segundo os procedimentos e critérios interpretativos da “European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing” (EUCAST) para os *Staphylococcus spp*¹⁶⁶.

A suscetibilidade à penicilina, cefoxitina, ceftarolina, eritromicina, clindamicina, norfloxacin, ácido fusídico, gentamicina, rifampicina, cloranfenicol, tetraciclina, tigeciclina, trimetoprima-sulfametoxazol (SXT) e linezolida foi determinada pelo método de difusão em disco de Kirby-Bauer utilizando discos comerciais (Oxoid, Hampshire, Reino Unido).

Para cada estirpe foi preparada uma suspensão com uma turbidez de 0,5 na escala de McFarland em 0.85% NaCl a partir de colónias com 24h de crescimento. Esta suspensão foi usada para inocular em placas de ágar Mueller-Hinton (Oxoid, Hampshire, Reino Unido). Após colocação dos discos, as placas foram incubadas durante 18 a 20 horas a 35 °C. As concentrações inibitórias mínimas (CIMs) à vancomicina e daptomicina foram determinadas utilizando tiras de E-test (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, França). Para a identificação dos fenótipos de resistência aos macrólidos, lincosamidas e estreptograminas B foi utilizado um teste de disco duplo com os discos de eritromicina e clindamicina. Estes discos foram inoculados no meio de cultura de Mueller Hinton Simple (MHE) com uma distância de 12 a 20 mm entre eles, tal como preconizado nas normas EUCAST¹⁶⁷. Deste procedimento resultaram os diferentes fenótipos de resistência (M, cMLS_B e iMLS_B). As estirpes que apresentaram fenótipo iMLS_B foram consideradas como resistentes à clindamicina de acordo com as normas do EUCAST. Para o controlo de qualidade na realização dos antibiogramas utilizou-se a estirpe de referência de *S. aureus* ATCC 29213.

3.5 Sequenciação genómica de alto débito

3.5.1 Extração de DNA

Para a extração de DNA genómico algumas colónias de *S. aureus* semeadas em gelose de sangue inoculadas em 5mL de meio líquido de TSB (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) e incubadas durante 4 horas a 37° C, com agitação (220 rpm), recorrendo-se ao agitador *Sanyo Orbital Incubator*. Mediu-se a densidade ótica usando o medidor de densidade celular WPA CO 8000 Biowave (Biochrom Ltd., Cambridge, Reino Unido) para se atingir uma densidade entre 0.7 – 0.9.

A extração do DNA bacteriano foi feita utilizando o kit *PureLink Genomic DNA Mini Kit* (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, EUA) seguindo as instruções e etapas estabelecidos pelo fabricante para se obter um volume final de 50 µl de DNA eluído. Inicialmente, centrifugou-se (1500 rpm; 5') 1mL da suspensão bacteriana e descartou-se o sobrenadante. De seguida, para lisar o DNA, adicionou-se 20 mg/mL de lisozima (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) e 75U de mutanolisa (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) e, após o tratamento com proteinase K (Roche), procedeu-se à adição de 400µg de RNase (disponibilizada no “kit”) com uma incubação de 1 minuto à temperatura ambiente. Este é de seguida adsorvido de forma seletiva para

uma coluna de sílica, onde vai ser sujeita a várias lavagens com tampão de lavagem. O processo de eluição do DNA conclui-se com a adição de um tampão de baixa concentração salina (*PureLink Genomic Elution Buffer*).

3.5.2 Controlo de qualidade e quantificação do DNA extraído

Após a extração do DNA, realizou-se a medição das razões de absorvância 260/280nm e 260/230nm através do espectrofotómetro Nanodrop 2000 (ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, EUA) para verificar a pureza do DNA.

A integridade do DNA foi visualizada após migração em gel de eletroforese, pela utilização de 5µl de DNA eluído com 2µL de *loading buffer* (LBI 6X) para o carregamento no gel e deixando migrar por cerca de 45 minutos a 100 V. A eletroforese realizou-se num gel de agarose (Bio-Rad, Hercules, Califórnia, EUA) a 1% (m/V) em tampão TBE 0.5% (Bio-Rad, Hercules, Califórnia, EUA) contendo brometo de etídio. Foi utilizado “1Kb plus” (Invitrogen, Carlsbad, California) como marcador de peso molecular. As imagens do gel foram obtidas usando o sistema AlphaImager.

Para quantificar o DNA genómico extraído utilizou-se o Qubit (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, EUA), e foram realizadas diluições com Tris-HCL 10mM pH 8 para obter uma concentração final de amostra de 10ng/µL para envio para sequenciação.

3.5.3 Sequenciação de DNA

A sequenciação total do genoma foi realizada no Instituto Gulbenkian de Ciência, Unidade Gene Express (Oeiras, Portugal). A análise bioinformática subsequente foi realizada no Instituto de Microbiologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa pelo grupo da bioinformática.

Com o “kit Nextera® XT DNA Library Prep paired-end”, o “kit Index v2” (Illumina®, San Diego, Califórnia, EUA) preparou-se as bibliotecas de sequenciação de alto débito e estas foram sequenciadas no sistema Illumina NextSeq® 500 (Illumina®) usando o “kit NextSeq® 500/550 Mid-Output” (versão 2) (300 ciclos). A avaliação, o controlo de qualidade e a montagem *de novo* das “reads paired-end” obtidas foi feita utilizando a pipeline INNUca (<https://github.com/B-UMMI/INNUca>). A versão 2.6 da pipeline INNUca, foi corrida utilizando a imagem Docker “ummidock/innuca:2.6” (<https://hub.docker.com/r/ummidock/innuca/>). Foi fornecido como “input” sequências de adaptadores Nextera XT para remoção de adaptadores e um tamanho de genoma previsto

de 2.1 Mb. A qualidade das “reads” nesta pipeline é avaliada e classificada recorrendo à ferramenta FastQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) e de seguida processada com o Trimmomatic¹⁶⁸. O SPAdes fez a montagem *de novo* das “reads” processadas em genomas. Estas montagens foram posteriormente corrigidas com o Pilon^{169,170}.

Foram anotados na pipeline Prokka v1.12¹⁷¹, os genomas rascunho que foram previamente polidos, com recurso a Docker “ummidock/prokka:1.12” (<https://hub.docker.com/r/ummidock/prokka/>). O SignalP (versão 4.1)¹⁷² foi o instrumento utilizado para identificar o péptido sinal nas regiões de codificação e RNAmmer (versão 1.2)¹⁷³ que foi fornecido externamente à imagem Docker, foi utilizado para identificar o RNA ribossomal. Para a correção do Prokka, foi utilizada uma base de dados composta por genomas completos de *S. aureus*, usando os parâmetros listados a seguir: --addgenes --usegenus --rfam --rnammer --gram pos --increment 10 --mincontiglen 1 --gcode 11 -- kingdom Bacteria --genus *Staphylococcus* --species *aureus*.

3.5.4 Análise gene-por-gene e relações genéticas entre as estirpes

Utilizou-se o esquema de MLST existente para *S. aureus* para estabelecer a relação genética das 205 estirpes em estudo. Utilizou-se o MLST (<https://github.com/tseemann/mlst>) disponível na pipeline INNUca para obter um perfil alélico (genes *arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi* e *yqi*) e o ST correspondente do genoma provisório de cada estirpe. Os perfis recém identificados e ou novos alelos foram submetidos à base de dados da PubMLST para atribuição de um número. Por outro lado, para definição dos CCs, usou-se o algoritmo goeBURST implementado no PHYLOViZ¹⁷⁴, incluindo na análise os perfis alélicos de todas as estirpes *S. aureus* presentes na base de dados a 4 de Março de 2022 (<https://pubmlst.org/organisms/staphylococcus-aureus>), que em conjunto com as estirpes caracterizadas neste trabalho totalizaram um total de 37424 perfis alélicos. Os CCs foram definidos ao nível SLV.

3.5.5 Determinantes de resistência e fatores de virulência

Os dados da sequenciação genómica de alto débito foram utilizados igualmente para obtenção de determinantes de resistência e fatores potencialmente associados à virulência. Os genes de resistência a antimicrobianos aos quais as estirpes apresentaram resistência foram obtidos das bases de dados “Comprehensive Antibiotic Resistance Database” (CARD) (<https://card.mcmaster.ca/home>), NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e megares (<https://megares.meglabs.org>). Os elementos *SCCmec* das estirpes MRSA foram identificados utilizando o *SCCmecFinder* 1.2¹¹⁸ que permite a identificação dos tipos *SCCmec* I a XI. Os ficheiros com os genomas montados foram submetidos usando as condições padrão disponíveis em (<https://cge.food.dtu.dk/services/SCCmecFinder/>).

Os factores de virulência foram pesquisados pelo uso da base de dados *Virulence Factors Database* (VFDB). Os dados de presença/ausência destes genes foram confirmados através do algoritmo BLAST no Geneious (versão 8.1.9).

3.6 Análise estatística

O cálculo do índice de diversidade de Simpson (*Simpson's index of diversity* – SID) e respetivos intervalos de confiança de 95% (IC 95%) foi utilizado para avaliar a diversidade da população em estudo. Para tal recorreu-se ao site *Comparing Partitions* (<http://www.comparingpartitions.info>). O índice calculado serve para estimar a diversidade das estirpes em estudo, bem como a probabilidade de duas estirpes da população, seleccionadas de forma aleatória, pertencerem a dois grupos diferentes. O valor do SID oscila de zero a um, sendo que, quanto maior for o valor de SID maior é a diversidade da população.¹⁷⁵

As *odds ratio* (OR) foram calculadas pelo método de Fisher usando as bibliotecas “*Epitools*” e “*multtest*” da linguagem “R”. Este foi determinado para avaliar possíveis associações entre variáveis e os valores de *p* obtidos foram corrigidos utilizando a taxa de descoberta de falsos positivos (FDR) para testes múltiplos. Utilizou-se o teste de Cochran-Armitage para avaliar as tendências entre duas variáveis. Um valor de *p value* <0.05 foi considerado estatisticamente significativo para todos os testes.

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização das amostras em estudo

A média de idade dos doentes dos quais foram isoladas estirpes invasivas de *S. aureus* foi de 4.5 anos e a mediana de 2 anos, variando entre os 3 dias e os 17 anos de idade, com um intervalo interquartis de 0.17-9. Um total de 16.6% (n=34) das estirpes foram isoladas de crianças com menos de um mês de idade e 40.5% (n=83) de crianças com menos de um ano de idade (**Figura 12**). A maioria das estirpes foram provenientes de crianças do sexo masculino n=117 (57.1%).

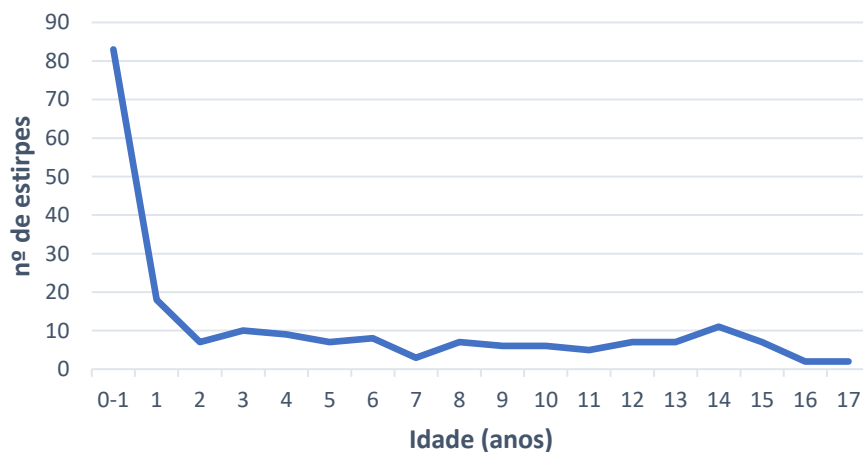


Figura 12 - Distribuição das idades dos doentes em estudo

4.2 “Multilocus sequence typing” (MLST)

A caracterização das estirpes isoladas por MLST permitiu a deteção de 36 STs diferentes (SID \pm IC 95%, 0.927 ± 0.015). Estes agruparam-se em 17 CCs e um *singleton* (SID \pm IC 95%, 0.899 ± 0.015). Os CCs mais frequentes foram CC398 (16.6%), CC30 (16.1%), CC5 (13.7%) e CC45 (10.7%), todos representados em mais de 10% das estirpes (**Tabela 2, Figura 13**).

Tabela 2 - Distribuição dos STs e CCs definidos por MLST das 205 estirpes

CC	ST(n)	N	%
398	398 (33), 752 (1)	34	16.6
30	30 (25), 34 (7), 7426 (1)	33	16.1
5	5 (18), 105 (5), 5269 (1), 7427 (3), 7429 (1)	28	13.7
45	45 (17), 54 (1), 508 (2), 2285 (1), 2498 (1)	22	10.7
72	72 (18)	18	8.8
22	22 (15)	15	7.3
121	121 (10), 3213 (1), 7432 (1)	12	5.9
8	8 (8), 7428 (1), 7430 (1)	10	4.9
7	7 (4), 789 (1), 7431 (1)	6	2.9
9	9 (2), 27 (3)	5	2.4
152	152 (5)	5	2.4
15	15 (4)	4	2.0
6	6 (3)	3	1.5
97	97 (3)	3	1.5
291	291 (3)	3	1.5
25	25 (2)	2	1.0
59	59 (1)	1	0.5
<i>Singleton</i>	2867 (1)	1	0.5

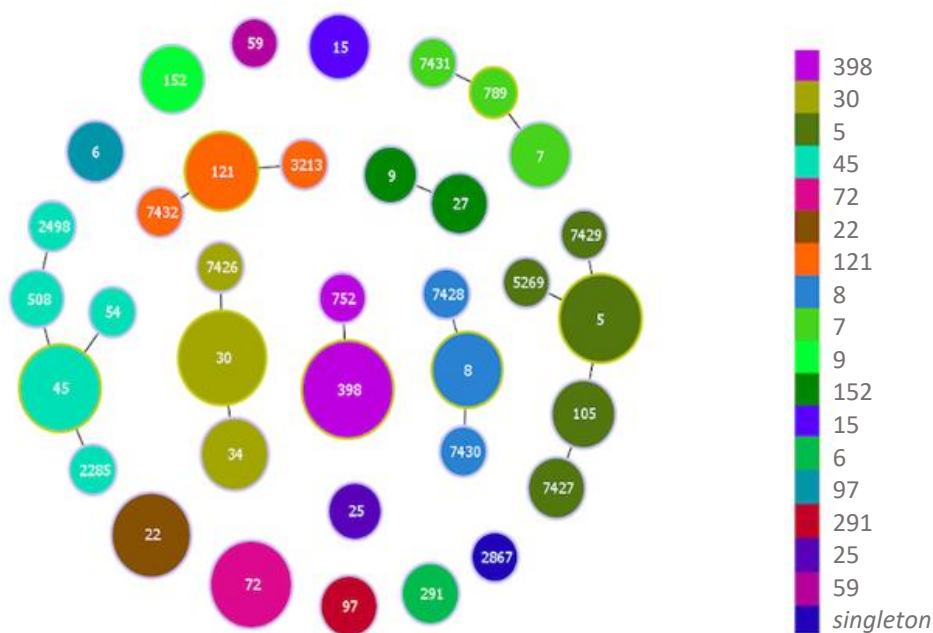


Figura 13 - Diagrama de GoeBURST das 205 estirpes de *S. aureus*

Nove estirpes tinham novos alelos pelo que as sequências foram submetidas à base de dados PubMLST (<https://pubmlst.org/organisms/staphylococcus-aureus>) para atribuição de um número de alelo. Foram identificados 3 novos alelos no locus *arcC* (alelos 865 a 867), 2 no *gmk* (alelos 577 e 578), 1 no *pta* (alelo 877) e 1 no *yqiL* (alelo 981). Estas estirpes corresponderam a 7 novos perfis alélicos aos quais foram atribuídos os STs 7426 a 7432.

A prevalência dos CCs individuais ao longo do período de estudo foi analisada para detetar possíveis alterações ao longo do tempo (**Figura 14**). Os quatro CCs mais frequentes, CC398, CC30, CC5 e CC45, foram detetados em todos os anos do estudo. Foi detetado um aumento das estirpes CC398 e um decréscimo de CC9 ($p < 0.05$) durante o período de estudo, mas em ambos os casos não houve suporte estatístico após correção FDR. No ano de 2020, último ano do estudo em que o laboratório recebeu um maior número de estirpes ($n=53$), não se observou um aumento desproporcional de qualquer um dos CCs relativamente aos anos anteriores.

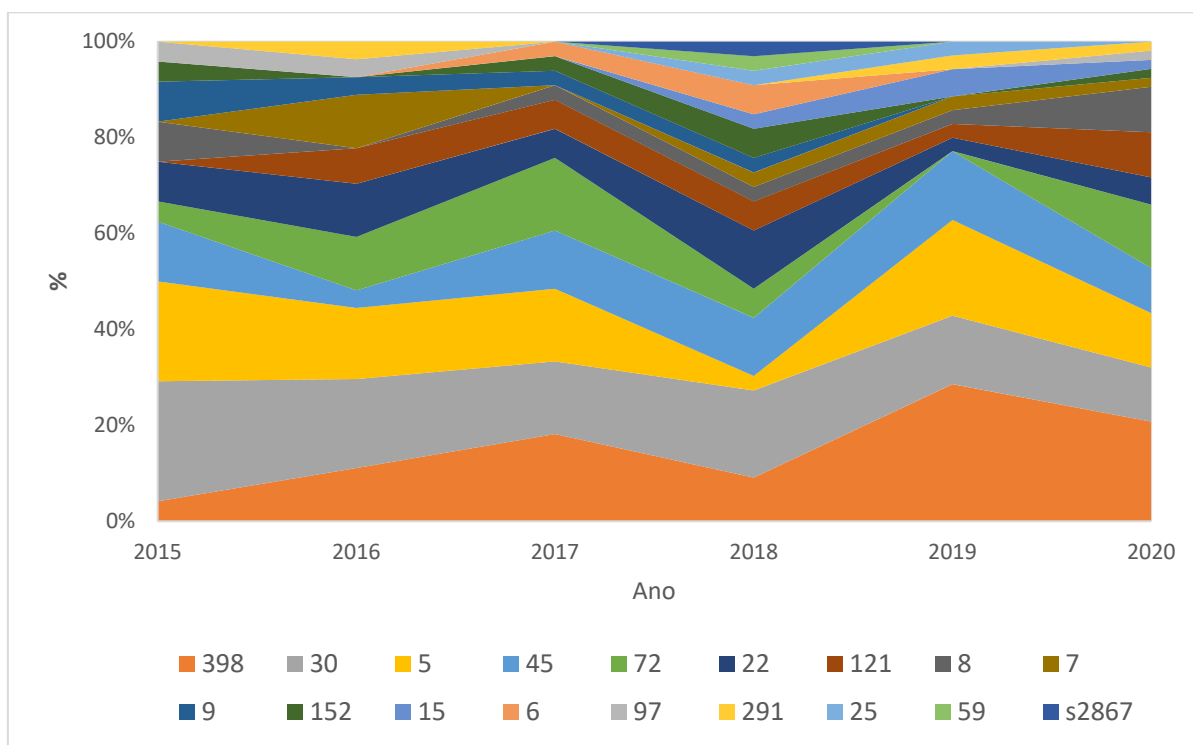


Figura 14 - Prevalência dos CCs identificados ao longo do período de estudo

4.3 Suscetibilidade aos antimicrobianos

A suscetibilidade aos antibióticos foi determinada para todas as 205 estirpes. Todas as estirpes analisadas neste estudo eram suscetíveis à vancomicina, daptomicina, ceftarolina, linezolida, tigeciclina e SXT.

Um total de 194 estirpes (94.6%) apresentou resistência a pelo menos um dos antimicrobianos testados. As taxas de resistência aos antimicrobianos das 205 estirpes de *S. aureus* do estudo estão representados na **Tabela 3**.

Tabela 3 - Taxa de resistência aos antimicrobianos

Antimicrobiano	Suscetível		Resistente	
	Nº	%	Nº	%
Penicilina	26	12.7	179	87.3
Cefoxitina	170	82.9	35	17.1
Eritromicina	144	70.2	61	29.8
Clindamicina	146	71.2	59 ¹	28.8
Norfloxacina	174	84.9	31	15.1
Ácido Fusídico	190	92.7	15	7.3
Gentamicina	191	93.2	14	6.8
Rifampicina	201	98.0	4	2.0
Cloranfenicol	202	98.5	3	1.5
Tetraciclina	204	99.5	1	0.5

¹ Inclui 55 estirpes de fenótipo iMLS_B

Um total de 179 (87.3%) estirpes apresentaram resistência à penicilina e 35 (17.1%) eram também resistentes à cefoxitina por presença do gene *mecA*, sendo classificadas como MRSA. O gene *blaZ* foi detetado em um total de 175 estirpes, 31 das quais também possuíam o gene *mecA*.

As estirpes MRSA apresentaram vários STs e foram detetados em cinco CCs, nomeadamente CC5 (n=18, 51.4% do total de estirpes MRSA), CC22 (n=11, 31.4%), CC8 (n=4, 11.4%), CC72 (n=1, 2.9%) e CC152 (n=1, 2.9%), que também agruparam estirpes suscetíveis à cefoxitina (**Figuras 15 e 16; Tabela 4**). Os tipos *SCCmec* IV (2B) (n=17), VI (4B) (n=8) e II (2A) (n=8) foram detetados entre as estirpes MRSA. Não se obteve um tipo de elemento *SCCmec* de duas estirpes MRSA pertencentes aos CCs 22 e 8 após submissão ao *SCCmecFinder* (<https://doi.org/10.1128/mSphere.00612-17>). A análise das sequências genómicas destas duas estirpes mostrou que o gene *mecA* se encontrava perto de zonas de quebra de *contigs*, sendo a não integridade da sequência do

elemento *SCCmec* nestas duas estirpes uma possibilidade para a não atribuição de um tipo *SCCmec* pelo programa.

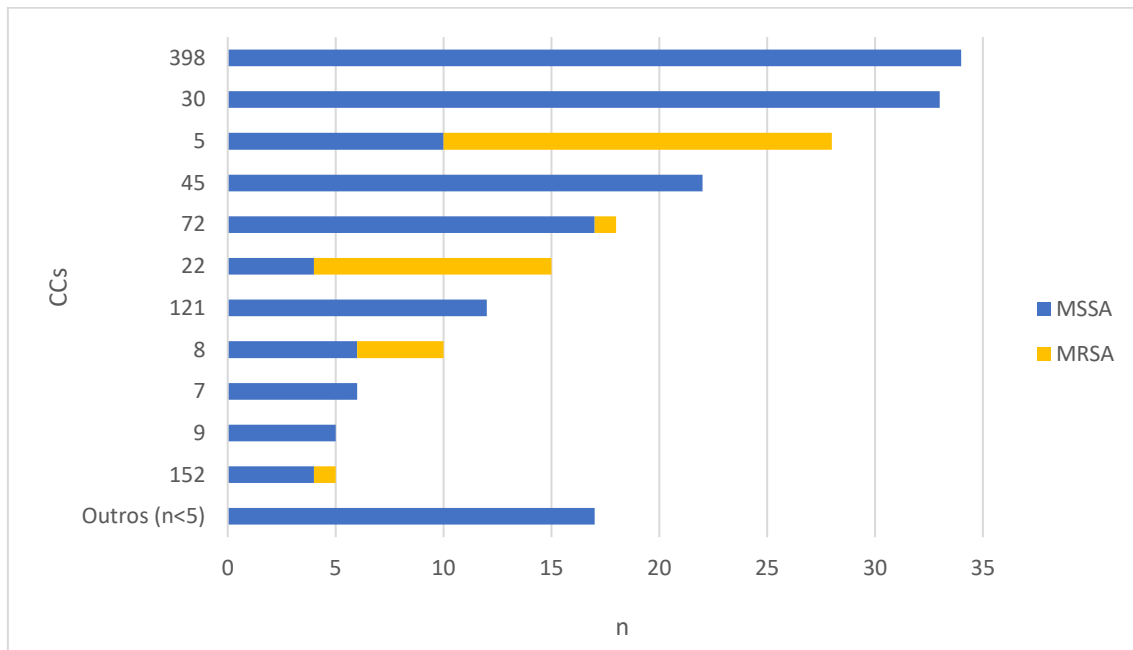


Figura 15 - Distribuição das estirpes MRSA e MSSA pelos CCs

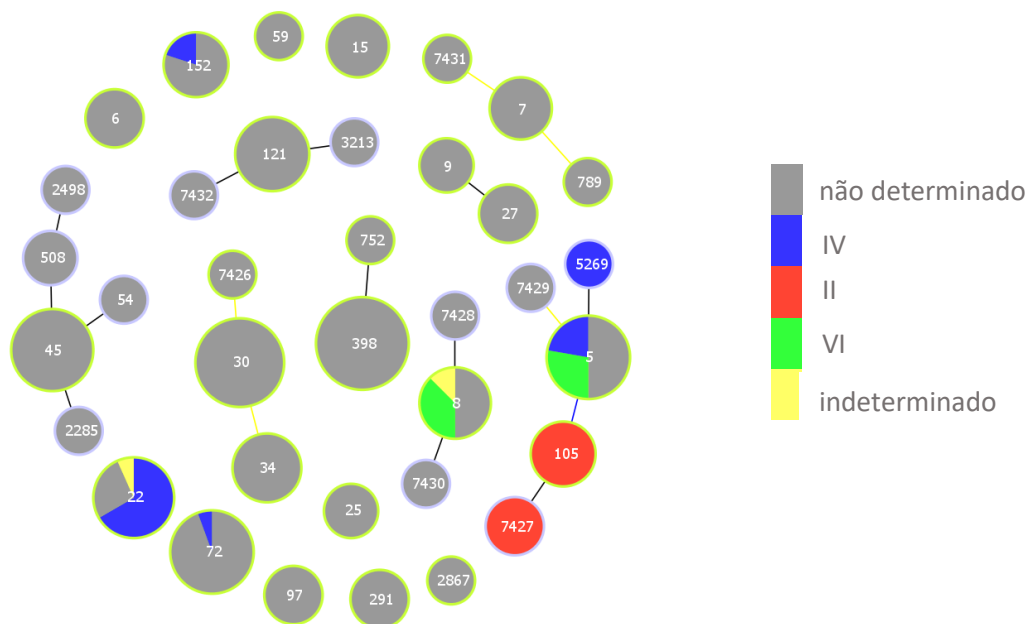


Figura 16 - Diagrama de GoeBURST das 205 estirpes de *S. aureus* mostrando a distribuição das estirpes MRSA

Tabela 4 - Distribuição dos tipos SCCmec pelos STs e CCs

CC	ST(n)	SCCmec
5	105 (5)	II
	7427 (3)	II
	5 (4)	IV
	5269 (1)	IV
	5 (5)	VI
22	22 (10*)	IV
8	8 (3*)	VI
72	72 (1)	IV
152	152 (1)	IV

*Incluía mais uma estirpe MRSA para a qual não foi possível determinar o tipo SCCmec

As estirpes MRSA no CC5 apresentaram grande diversidade sendo o único CC associado a diferentes tipos *SCCmec*. A maioria pertencia ao tipo *SCCmec* II (5 estirpes ST105 e 3 ST7427), seguido dos tipos IV (4 estirpes ST5 e uma ST5269) e VI (5 estirpes ST5). As CIMs determinadas para a vancomicina variaram entre 0.38 e 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($\text{CIM}_{50} = 1 \mu\text{g}/\text{mL}$ e $\text{CIM}_{90} = 1 \mu\text{g}/\text{mL}$), enquanto as CIMs à daptomicina variaram entre 0.064 e 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($\text{CIM}_{50} = 0.25 \mu\text{g}/\text{mL}$ e $\text{CIM}_{90} = 0.75 \mu\text{g}/\text{mL}$). Não foram detetadas diferenças nos valores de CIMs a estes dois antibióticos entre estirpes MSSA e MRSA (**Figuras 17 e 18**).

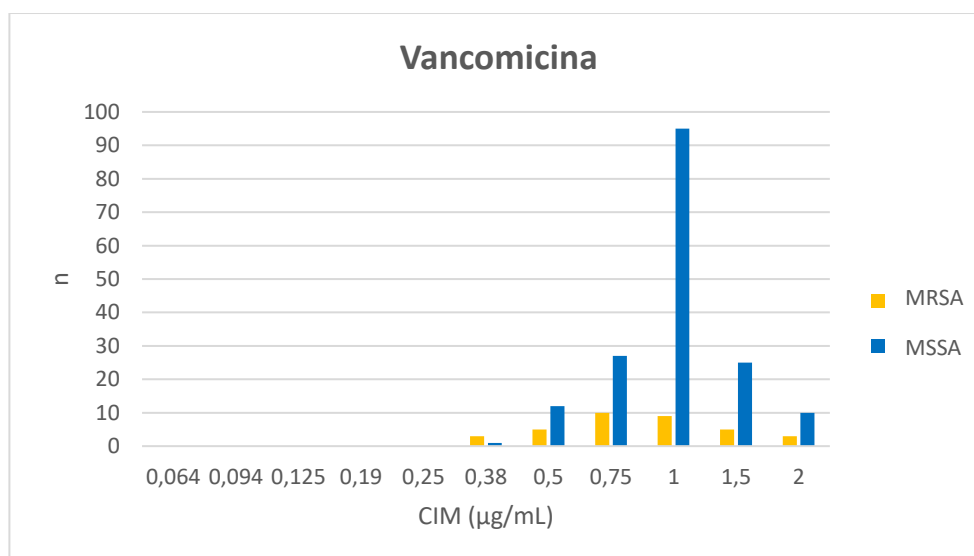


Figura 17 - Distribuição de CIMs à vancomicina das 205 estirpes de *S. aureus*

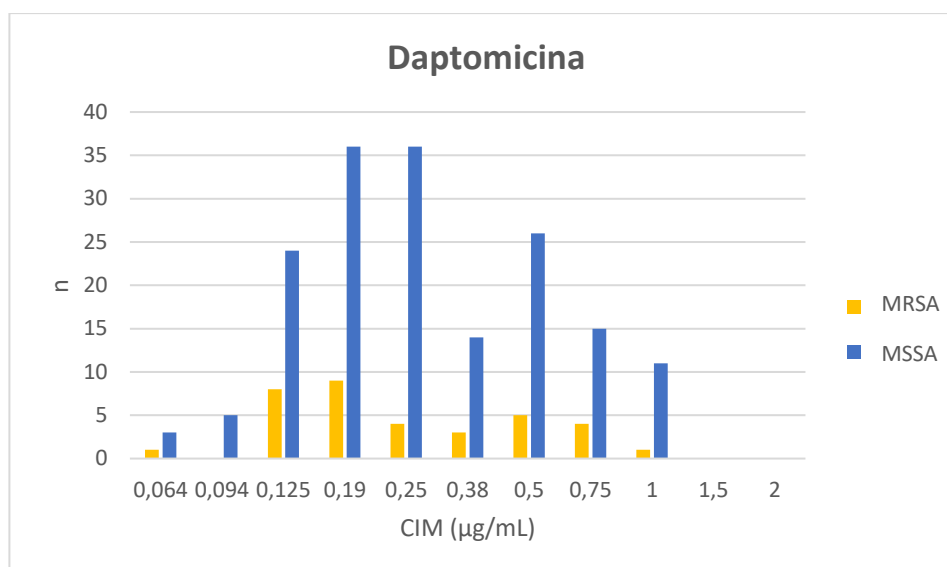


Figura 18 - Distribuição de CIMs à daptomicina das 205 estirpes de *S. aureus*

A resistência à eritromicina e à clindamicina foi detetada em 61 (29.8%) e 59 (28.9%) das estirpes, respetivamente. O fenótipo mais comum nas estirpes estudadas foi o iMLS_B (n=55, 26.8%), sendo conferido pelo gene *erm(T)* (n=32), *erm(C)* (n=14) ou *erm(A)* (n=8). O fenótipo cMLS_B foi expresso por 4 estirpes (1.9%), sendo que 3 destes possuíam o gene *erm(A)* e uma o gene *erm(B)*. O fenótipo M foi expresso em apenas 2 estirpes (0.98%), nas quais foi detetado o gene *msr(A)*. A resistência aos macrólidos e lincosamidas estava associada aos CC398 e CC5 (p<0.001) (**Figura 20**). As estirpes *erm(T)* positivas pertenciam todas ao CC398.

Foram detetadas 31 estirpes (15.1%) resistentes à norfloxacina e estas distribuem-se principalmente pelos CCs CC5 e CC22 (p<0.001), associados a estirpes MRSA.

A resistência ao ácido fusídico foi identificada em 15 estirpes (7.3%). No genoma de 12 destas estirpes estava presente o gene *fusC* (8 do CC5 e 4 do CC8) e noutra o gene *fusB* (ST7429, também do CC5). No genoma de duas estirpes resistentes ao ácido fusídico, ambas ST121 (CC121), não foram detetados genes que confirmam resistência a este agente antimicrobiano. Estas duas estirpes apresentaram um halo de inibição consideravelmente maior que as restantes estirpes resistentes (20mm contra 10mm das restantes).

A resistência à gentamicina foi detetada em 14 (6.8%) estirpes, distribuídos pelos CC398 (n=8), CC5 (n=4), CC8 (n=1) e CC22 (n=1). Todas estas estirpes possuíam o gene da enzima bifuncional *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*. Para além deste gene, foram detetados nos genomas de estirpes suscetíveis à gentamicina os genes *ant(9)-Ia* (n=9, 4.4%), *ant(4'-1b)*

(n=2, 1%) e *ant(6)* (n=1, 0.5%), genes que conferem resistências a outros aminoglicosídeos que não a gentamicina.

A resistência ao cloranfenicol foi detetada em 3 (1.5%) estirpes *S. aureus* MSSA não relacionadas (CC72, CC7 e CC152). Em duas delas a resistência era conferida pelo gene *catA7* e na restante pelo gene *catA8* (CC152).

As três estirpes resistentes à rifampicina pertenciam a três CCs distintos (CC22, CC30 e CC121).

A resistência à tetraciclina foi detetada em apenas uma (0.5%) estirpe de *S. aureus* MRSA (CC8), sendo conferida pelo gene *tetK*.

Mais de um terço das estirpes (35.6%, n=73) eram resistentes a pelo menos dois dos antimicrobianos testados e 20% (n=41) resistentes a três ou mais.

As estirpes MRSA apresentaram taxas de resistência aos antimicrobianos não beta-lactâmicos superiores às observadas em estirpes MSSA (**Figura 19**), nomeadamente com 65.7% das estirpes MRSA a serem resistentes a macrólidos, lincosamidas e estreptograminas B, 74.3% resistentes à norfloxacina em 31.4% ao ácido fusídico.

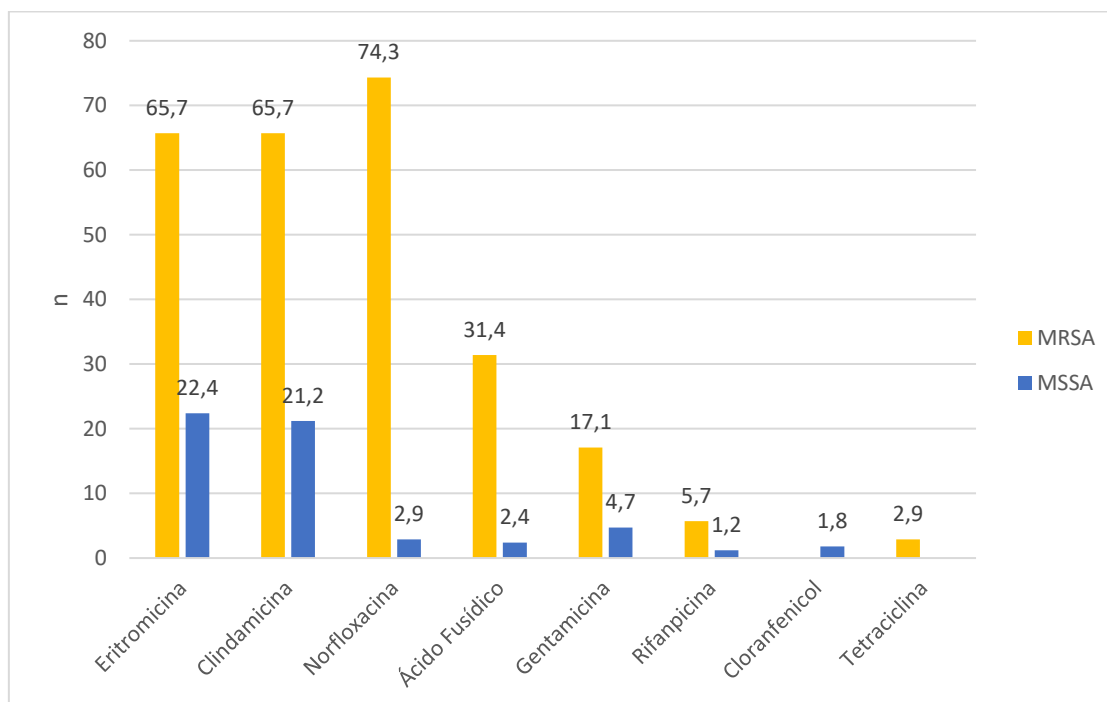


Figura 19 - Taxa de resistência a antimicrobianos das estirpes MRSA e MSSA

Na **Figura 20** estão detalhados os perfis de resistência aos antibióticos das 205 estirpes para cada CC identificado.

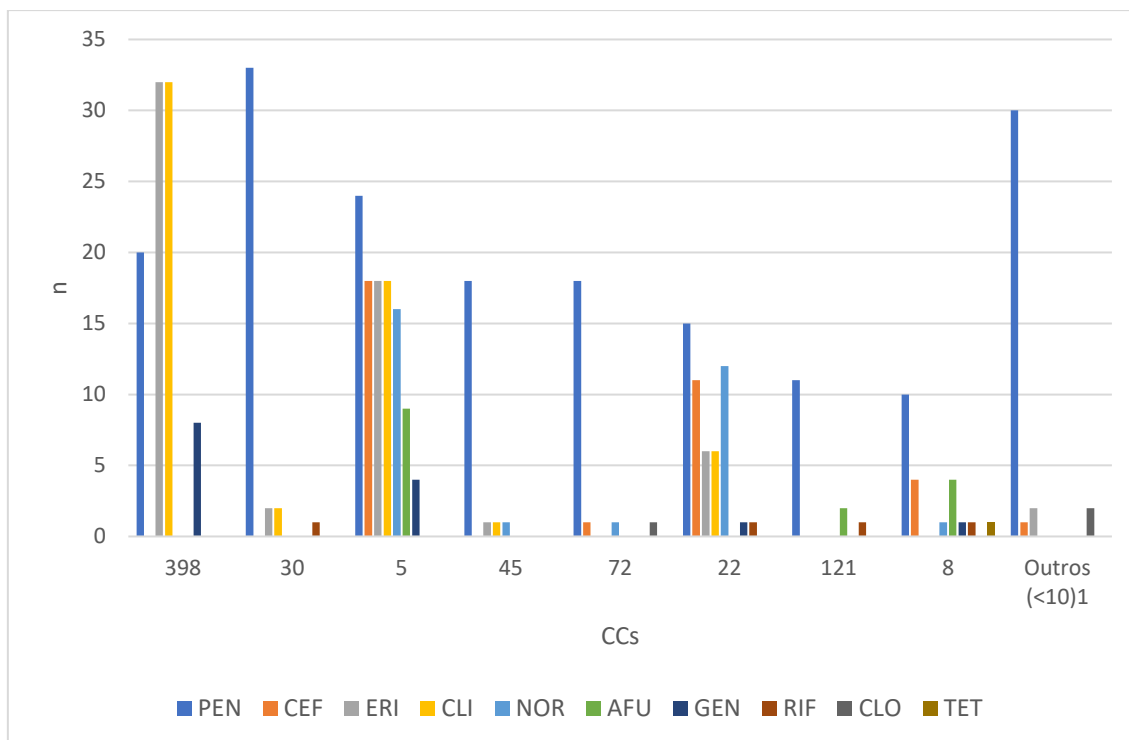


Figura 20 - Perfil de resistências para cada antibiótico nos diferentes CCs

¹ Incluí os restantes CCs identificados que contêm menos de 10 estirpes por CC e um *singleton*. Fazem parte destes CC7 (n=6), CC 9 (n=5), CC152 (n=5), CC15 (n=4), CC6 (n=3), CC97 (n=3), CC291(n=3), CC25(n=2) e CC59 (n=1).

As resistências apresentadas pelas 205 estirpes *de S. aureus* em estudo são apresentadas em detalhe na **Tabela A2 – Anexos**, com o respetivo ST, genótipo, tipo *SCCmec* e fenótipo de resistência *MLS_B*.

4.4 Fatores de virulência

A presença de genes possivelmente associados às virulências de *S. aureus*, incluindo exotoxinas, enzimas e fatores que interagem com o sistema imunitário do hospedeiro, foi pesquisada nas 205 estirpes em estudo e encontram-se sumarizados na **Tabela 5**.

Tabela 5 - Distribuição de genes de fatores de virulência nas 205 estirpes de S. aureus

GENE	PRODUTO	N	%
<i>hly/hla</i>	hemolisina α	205	100.0
<i>hlyb</i>	hemolisina β	205	100.0
<i>hlyd</i>	hemolisina δ	205	100.0
<i>hlyA; hlyB; hlyC</i>	hemolisina γ	205	100.0
<i>spa</i>	proteína A (SpA)	205	100.0
<i>aur</i>	aureolisina	205	100.0
<i>hysA</i>	hialuronidase	205	100.0
<i>geh</i>	lipase	205	100.0
<i>lip</i>	lipase	205	100.0
<i>sspA</i>	protease de serinas V8	205	100.0
<i>sspB</i>	protease de cisteína ("staphopain") SspB	205	100.0
<i>sspC</i>	"staphostatin" B	205	100.0
<i>coa</i>	coagulase	205	100.0
<i>adsA</i>	adenosina sintase A (AdsA)	205	100.0
<i>sbi</i>	proteína de ligação à IgG Sbi	205	100.0
<i>scn</i>	inibidor do complemento estafilocócico (SCIN)	195	95.1
<i>sak</i>	estafilocinase	158	77.1
<i>chp</i>	proteína inibidora de quimiotaxia (CHIPS)	155	75.6
<i>sea</i>	enterotoxina A	42	20.5
<i>sec</i>	enterotoxina C	28	13.7
<i>sell</i>	enterotoxina L	28	13.7
<i>seh</i>	enterotoxina H	7	3.4

GENE	PRODUTO	N	%
<i>selk</i>	enterotoxina K	3	1.5
<i>selq</i>	enterotoxina G	3	1.5
<i>tsst-1</i>	toxina do síndrome de choque tóxico-1 (TSST-1)	32	15.6
<i>lukF; lukS</i>	leucocidina de Panton-Valentine (PVL)	10	4.9
<i>etA</i>	toxina esfoliativa A (ETA)	6	2.9
<i>etB</i>	toxina esfoliativa B (ETB)	5	2.4
<i>etD</i>	toxina esfoliativa D	5	2.4

Todas as estirpes possuíam os genes das hemolisinas α , β , δ e γ , tal como os genes da coagulase, proteína A, aureolisina, hialuronidase, entre outros. Para além dos genes indicados na **Tabela 5**, foram ainda detetados em todas as estirpes os genes *isdA* a *isdG*, que codificam um sistema de captação de ferro, e os genes de proteínas de aderência intercelular *icaA*, *icaB*, *icaC*, *icaD* e *icaR* responsáveis pela síntese do polissacárido PNSG (“poly-n-succinyl- β -1,6 glucosamine”) necessário à formação de biofilme em todas as estirpes. Destes, uma estirpe tinha uma deleção de 199pb no gene *icaB* (873bp), razão pela qual era negativo na VFDB. Entre os genes com presença variável na população em estudo, salientam-se os genes *lukS* e *lukF* da PVL, detetados em apenas 4.9% (n=10) das estirpes. Apesar do pequeno número de estirpes PVL positivas, estas pertenciam a cinco CCs diferentes e apenas duas eram MRSA (CC22 e CC152). O gene da TSST-1 estava presente em 15.6% (n=32) das estirpes e foi maioritariamente encontrado em estirpes CC30, estando presente em 75.8% (n=25) das estirpes deste CC (**Tabela 6**). A presença dos genes das outras enterotoxinas variou entre 1.5% e 20.5%, encontrando-se presentes em vários CCs (**Tabela 6**). Dos CCs com mais de 10 estirpes apenas as estirpes pertencentes ao CC398 não possuíam qualquer gene de enterotoxina. Os genes das toxinas esfoliativas *etA*, *etB* e *etD*, também estavam presentes num número diminuto de estirpes (<3%) e maioritariamente associadas ao CC121 no caso das duas primeiras.

Na **Tabela 6** está representada a distribuição dos genes de virulência pelos respetivos complexos clonais.

Tabela 6 - Distribuição de fatores de virulência pelos CCs

GENE	CC																		Total
	398	30	5	45	72	22	121	8	7	152	9	15	6	291	97	25	59	s2867	
<i>lukF;</i> <i>lukS</i>		1				1	2	1		5									10
<i>sea</i>		19	9					3	6				3	2					42
<i>sec</i>				17	4	7													28
<i>seh</i>		7																	7
<i>selk</i>								2										1	3
<i>sell</i>				17	4	7													28
<i>selq</i>								2										1	3
<i>tsst-1</i>		25		3		4													32
<i>etA</i>							5		1										6
<i>etB</i>							5												5
<i>etD</i>														3		2			5
<i>sak</i>	1	27	27	22	18	15	11	9	6	5	5		3	3	3	1	1	1	158
<i>chp</i>	33	22	26	22	18	15	1	4			5	4		3		1	1		155
<i>scn</i>	34	27	27	22	18	15	11	9	6	5	5	4	3	3	3	1	1	1	195
Total	34	33	28	22	18	15	12	10	6	5	5	4	3	3	3	2	1	1	205

5. DISCUSSÃO

Neste trabalho foram caracterizadas estirpes de *S. aureus* causadoras de infeções invasivas em doentes com idades compreendidas entre os 0 e os 18 anos em Portugal. Durante o período de 2015 a 2020 foram isoladas 205 estirpes provenientes maioritariamente de amostras de sangue. Inicialmente estas estirpes foram caracterizadas por métodos fenotípicos, nomeadamente a avaliação do aspeto morfológico das colónias, o teste da coagulase e testes de suscetibilidade aos antibióticos. Posteriormente procedeu-se à caracterização genotípica das mesmas. Através da sequenciação do genoma das estirpes obtiveram-se os dados de MLST das estirpes que permitiram a identificação das linhagens clonais. A distribuição dos fatores de virulência e de determinantes de resistência aos antimicrobianos nos *S. aureus* causadores de infeções invasivas pediátricas no país também foram descritos ao longo do trabalho.

O presente estudo mostrou que uma proporção elevada das infeções invasivas por *S. aureus* em idade pediátrica ocorre em crianças com menos de um ano. Tal foi descrito anteriormente noutros estudos, que demonstraram que a faixa etária mais afetada pelas infeções invasivas por *S. aureus* em crianças são, geralmente, os lactentes e crianças com menos de um ano de idade²⁹. Nesta faixa etária as crianças são mais suscetíveis à colonização por *S. aureus* e a infeções da pele e tecidos moles, principalmente nas regiões perianais, associados ao calor e a humidade causado pelo uso de fraldas¹⁷⁶. Também estão mais suscetíveis a infeções graves como bacteriemia, meningite, osteomielite e pneumonia, devido ao sistema imunológico não totalmente desenvolvido^{29,177}.

5.1 Diversidade clonal

A caracterização genotípica das 205 estirpes revelou uma população diversa, com 36 STs agrupados em 18 CCs e um *singleton*, indicando que as infecções invasivas pediátricas em Portugal são causadas por várias linhagens clonais. Vários estudos prévios em Portugal caracterizaram as linhagens clonais de *S. aureus* predominantes no país, quer em casos de colonização quer de infecção em diferentes populações de doentes, embora muitos tenham estudado de forma independente estirpes MSSA e MRSA^{178,179}. Adicionalmente, uma combinação de diferentes métodos de tipagem foram utilizados para a definição dos clones, incluindo PFGE, *spa typing* e MLST. Estes estudos demonstraram uma grande diversidade genética das estirpes MSSA e a presença de um número mais limitado de linhagens MRSA internacionalmente disseminadas^{178,179}. A caracterização genotípica realizada nestes estudos demonstrou também a presença das mesmas linhagens MRSA em infecções adquiridas no hospital e na comunidade^{178,179}.

No presente estudo os CCs mais frequentes foram CC398, CC30, CC5 e CC45, todos representados em mais de 10% das estirpes e totalizando em conjunto mais de metade dos casos (57.1%). Os CCs identificados neste trabalho foram na sua generalidade congruentes com resultados obtidos em estudos anteriormente realizados em Portugal e noutros países europeus^{92,180}. Um estudo que caracterizou a estrutura populacional das estirpes MSSA isoladas em Portugal, incluindo estirpes isoladas de caso colonização e infecção em crianças e adultos, identificou CC30 (22.4%), CC5 (10.6%) e CC45 (8.6 %) entre os CCs mais frequentemente isolados entre 1992 e 2011 em contexto hospitalar e na comunidade¹⁸¹. Neste mesmo estudo, menos de 5% das estirpes pertenciam a CC398, contrastando com as observações do presente trabalho em que se detetou uma predominância deste CC. Um outro estudo, mais recente que o acima referido, caracterizou estirpes de *S. aureus* de colonização nasal da população sem-abrigo na região de Lisboa entre novembro de 2016 e janeiro de 2018, tendo detetado CC398 e CC30 como os mais frequentes e, tal como no presente trabalho, contendo apenas estirpes MSSA¹⁸². Estas observações sugerem que, apesar de haver linhagens clonais que se têm mantido em circulação no país durante vários anos, houve uma possível alteração com o aumento da prevalência das estirpes CC398.

As estirpes pertencentes ao CC398 têm sido objeto de vários estudos em diferentes países europeus, que descreveram estirpes MRSA pertencentes a este CC em animais de produção, como suínos e aves^{183,184}. Nos últimos anos, surgiram relatos de infecções humanas causadas por essa linhagem, sugerindo uma possível transmissão entre animais e humanos^{183,185}. Nos países europeus como Países Baixos, Dinamarca, Alemanha ou Bélgica, o CC398 tem sido identificado com frequência e representa uma proporção notória das infecções por causadas por estirpes MRSA em humanos, principalmente entre pessoas com contato direto ou ocupacional com animais de produção¹⁸⁶⁻¹⁸⁸. Nos Estados Unidos tem sido igualmente detetado, embora em menor escala, em animais e no Homem. Nos países asiáticos como China e Tailândia também existem estudos que relatam a presença desse CC em animais e humanos¹⁸⁶⁻¹⁸⁸. É de notar, no entanto, que as estirpes CC398 isoladas no âmbito deste trabalho não estavam associadas a resistência à meticilina, pelo que a linhagem CC398 detetada no presente estudo deverá ser distinta. Entre as estirpes CC398 suscetíveis à meticilina inclui-se uma linhagem ST398-t1451, que foi a mais comum no estudo realizado com a população sem abrigo em Lisboa¹⁸². Uma análise mais extensiva dos dados de genoma obtidos no presente trabalho permitirão confirmar a identidade das linhagens CC398 causadoras de infeção invasiva pediátrica. As estirpes MRSA detetadas no presente estudo pertenciam maioritariamente aos CC5, CC22 e CC8, o que vai de encontro com estudos anteriores que identificam estes CCs entre os principais responsáveis pela disseminação global de estirpes MRSA¹⁸⁹⁻¹⁹¹. Relativamente a Portugal, as estirpes CC22 detetadas no presente estudo podem corresponder ao clone EMRSA-15 (ST22-IV), clone MRSA mais predominante nos hospitais do país no passado. Logo após o surgimento deste clone, foi caracterizado o clone NY/Japão (NY/JP) (ST5-II) e, mais recentemente, uma variante deste clone (ST105-II) nos hospitais portugueses. Nestes estudos, constatou-se que a maioria das estirpes MRSA associados à comunidade em Portugal estavam relacionadas com o clone EMRSA-15 ou com o clone NY/Japão (NY/JP)^{181,192}.

Diferentes tipos de elementos *SCCmec* foram detetados, como *SCCmec* IV, *SCCmec* VI e *SCCmec* II, corroborando estudos anteriores que relataram a diversidade desses elementos genéticos em estirpes de MRSA¹⁹³. Muitos estudos anteriores indicam que as estirpes HA-MRSA possuem frequentemente cassetes *SCCmec* I, II, e III e são

multiresistentes^{194,195}. Por outro lado, as primeiras estirpes CA-MRSA possuíam com frequência os genes que codificam a PVL e as cassetes *SCCmec* menores (tipos IV e V)^{194,195}. O tipo *SCCmec* IV possui complexos *ccr* e *mec* identificados noutros tipos de *SCCmec* sugerindo que este resultou de uma recombinação genética. Além disso, devido ao seu tamanho inferior aos restantes elementos *SCCmec*, este tem uma maior capacidade de transmissão horizontalmente entre as bactérias¹⁹⁶. Estes factos podem contribuir para ter sido o tipo *SCCmec* mais comumente identificado no presente estudo.

5.2 Suscetibilidade antimicrobiana

A resistência à penicilina (87.3%) foi a mais comum no presente estudo, como é expectável neste microrganismo, dado que a grande maioria das estirpes de *S. aureus* isoladas atualmente são produtoras de beta-lactamase codificada pelo gene *blaZ*¹⁹³. Apesar deste cenário invalidar a utilização de penicilinas suscetíveis à ação das beta-lactamases no tratamento das infeções estafilocócicas, de maior importância é a presença de PBP2a (estirpes MRSA), que limita de forma muito mais dramática as opções terapêuticas disponíveis.

No presente estudo, 17.1% das estirpes responsáveis por infeções invasivas pediátricas em Portugal foram classificadas como MRSA. Este valor é menor que a prevalência reportada de estirpes MRSA em infeções invasivas (todas as idades) no país durante o mesmo período, em que a prevalência de estirpes MRSA desceu de 46.8% em 2015 para 29.7% em 2020 (**Figura 10**), um decréscimo observado tanto a nível nacional como europeu¹⁶⁵. Esta diminuição pode dever-se ao desenvolvimento e implementação de novas normas e orientações relativamente à prevenção da disseminação de estirpes MRSA, bem como uma utilização mais racional dos antibióticos para o tratamento de infeções. Neste contexto, a Direção-Geral da Saúde estabeleceu uma norma para a prevenção e controlo de colonização e infeção por MRSA nos hospitais e Unidades de Internamento de Cuidados Integrados em Portugal em 2014, o que também poderá ter contribuído para a diminuição das taxas registadas em anos anteriores¹⁹⁷. Um estudo recente em Espanha reportou uma taxa de MRSA de 11% entre *S. aureus* isolados do sangue em doentes pediátricos entre 2013 e 2021, em linha com a observação que Portugal apresenta valores mais elevados do que outros países europeus¹⁹⁸.

Todas as estirpes analisadas neste estudo apresentaram suscetibilidade à vancomicina, daptomicina, ceftarolina, linezolida, tigeciclina e SXT. Relativamente à vancomicina, esta é uma das alternativas mais usadas no tratamento de infecções por estirpes MRSA, pelo que a possibilidade de suscetibilidade reduzida ou mesmo resistência a este antibiótico em *S. aureus* é preocupante. Há estudos que relatam um aumento da CIM à vancomicina ao longo do tempo^{199,200}, enquanto outros divergem nessa conclusão²⁰¹, variações que podem dever-se ao uso de diferentes metodologias²⁰². No presente estudo tal não foi observado e também não se observou diferenças nos valores da CIM entre estirpes MSSA e MRSA, tal como no caso da daptomicina. Em conjunto, os resultados obtidos confirmam que para além destes dois antibióticos, a ceftarolina, a linezolida ou a tigeciclina, retêm excelente atividade contra estirpes de *S. aureus*. De igual modo, as 205 estirpes apresentaram suscetibilidade ao SXT. Existem estudos que apontam que mais de 90% das estirpes CA-MRSA e HA-MRSA continuam suscetíveis a este antimicrobiano, pelo que continua a ser uma opção terapêutica a considerar no tratamento de algumas infecções por estirpes MRSA²⁰³.

O corrente estudo identificou uma elevada taxa de resistência a macrólidos e lincosamidas na medida em que quase um terço das estirpes apresentou resistência a estes antibióticos (29.8% e 28.8%, respetivamente). Estes valores são particularmente preocupantes no caso da clindamicina, dado que é uma opção terapêutica para o tratamento das infecções invasivas pediátricas, sobretudo no contexto de estirpes MRSA, estirpes nas quais esta resistência atinge 65.7% (**Figura 19**)²⁰⁴. Os dados de tipagem demonstraram que a resistência a macrólidos e lincosamidas estava associada maioritariamente às estirpes do CC398 (MSSA), mas era também importante nas estirpes MRSA dos CC5 e CC22. O gene de resistência a macrólidos e lincosamidas mais frequentemente detetado no estudo foi o gene *erm(T)*, mas este estava exclusivamente associado ao CC398. Estes resultados são concordantes com um estudo conduzido em França, em que a presença do gene *erm(T)* contribuiu para 92.5% da resistência à eritromicina e clindamicina em estirpes CC398 MSSA²⁰⁵.

A resistência a outros antimicrobianos, como a norfloxacina, ácido fusídico ou a gentamicina também foram detetadas com alguma frequência (>5% estirpes). Entre estes, de salientar a resistência à norfloxacina que apareceu sobretudo associada a estirpes MRSA (74.3% estirpes resistentes, maioritariamente CC5 e CC22). Apesar de as

fluoroquinolonas não serem habitualmente utilizadas no tratamento de infecções na população pediátrica, a resistência a estes antibióticos foi identificada como característica das estirpes MRSA isoladas na Europa¹⁶³. A resistência ao ácido fusídico também foi expressiva nas estirpes MRSA (31.4%). Foram identificadas estirpes resistentes a este antimicrobiano sem gene de resistência associado. Essa resistência poderá advir da modificação da subunidade beta do RNA polimerase bacteriano, ou ainda de mutações espontâneas nas proteínas *fusB*, *fusC* ou *fusD*^{135,206}.

A resistência à rifampicina, ao cloranfenicol ou à tetraciclina foram raras, encontrando-se dispersas por estirpes não relacionadas genotipicamente. Deste modo, não foram encontrados indícios de expansão clonal de estirpes resistentes a estes antibióticos. Essas resistências foram associadas a diferentes CCs com resistência a diferentes antibióticos, sendo observada em um quinto das estirpes, salientando a importância da monitorização contínua e do estabelecimento de estratégias de controle eficazes para lidar com as resistências.

5.3 Distribuição dos fatores de virulência

A análise dos dados relativos aos fatores de virulência confirmou a presença em todas as 205 estirpes de alguns genes habitualmente conhecidos por contribuírem para a virulência de *S. aureus*. Entre estes, contam-se os genes das hemolisinas α , β , δ e γ , bem como os genes da coagulase, proteína A, aureolisina ou da hialuronidase (**Tabela 5**). Os genes *isdA* a *isdG*, responsáveis pelo sistema de captação de ferro, e os genes de adesão intercelular *icaA*, *icaB*, *icaC*, *icaD* e *icaR*, envolvidos na síntese do polissacárido PNSG necessário à formação de biofilme, também foram identificados em todas as estirpes. No entanto, uma estirpe apresentou uma deleção de 199pb no gene *icaB*, resultando em sua ausência na base de dados VFDB, o que é consistente com a ocorrência de variações genéticas mencionadas na literatura científica.

A PVL é um dos fatores de virulência de *S. aureus* que tem recebido mais atenção por parte da comunidade científica. Vários estudos anteriores descreveram infecções por estirpes PVL em crianças. Na população pediátrica, estas infecções incluem frequentemente furúnculos e abscessos de repetição, mas também podem ocorrer formas mais graves de doença, tais como osteomielite, miosite ou pneumonias necrotizantes, casos que salientam a relevância de pesquisar a presença desta toxina no caso de doentes com infecções graves por *S. aureus*²⁰⁷. Os resultados do presente estudo revelaram que os

genes *lukS* e *lukF* desta leucocidina estavam presentes num pequeno número de estirpes analisadas, 4.9% (n=10), não estando particularmente associadas a estirpes MRSA.

Estes resultados são semelhantes a estudos anteriores na Europa, nomeadamente um conduzido no Reino Unido que mostrou uma prevalência de PVL inferior a 10% em estirpes de *S. aureus*⁷⁶. Esse estudo detetou a PVL em vários contextos genéticos, tal como no nosso estudo, em que as estirpes pertenciam a cinco CCs diferentes. As duas estirpes MRSA PVL positivas identificadas no presente estudo pertenciam aos CCs 22 e 152. A presença de PVL nestes CCs foi anteriormente descrita em estudos científicos conduzidos por Bingjie et al¹⁹⁷ e Abiola et al¹⁹⁸. No entanto, é necessário acrescentar que variações geográficas na distribuição dos genes desta toxina podem ocorrer, dado que num estudo que ocorreu na Gâmbia detetou a presença dos genes da PVL em 72.9% das estirpes invasivas⁷⁵. Essas diferenças ressaltam a importância de investigar a distribuição regional uma vez que podem ocorrer variações significativas em diferentes populações bacterianas.

A pesquisa de genes de outras toxinas mostrou que, tal como observado para a PVL, a presença de toxinas esfoliativas se limitou a um número diminuto de estirpes (<5%). Os genes de enterotoxinas apresentaram taxas de variação de 1.5% a 20.5%, tendo sido detetados em diferentes CCs (**Tabela 5**). Embora pontualmente associados a CCs específicos, como foi o caso das toxinas esfoliativas maioritariamente encontradas em estirpes CC121, ou do gene TSST-1 (15.6%) principalmente associado ao CC30, estes genes encontraram-se espalhados por diversas linhagens clonais. Assim sendo, é importante ressaltar que, mesmo com diferenças na prevalência desses genes, a presença de múltiplos fatores de virulência em várias estirpes salienta o seu potencial patogénico e a necessidade contínua de monitorização das infeções associadas a *S. aureus*.

6. CONCLUSÃO

O presente estudo permitiu elaborar um retrato da diversidade clonal, suscetibilidade antimicrobiana e distribuição dos fatores de virulência das estirpes de *S. aureus* causadoras de infecções invasivas em crianças e adolescentes em Portugal, entre 2015 e 2020. Observou-se que uma proporção significativa destas infecções ocorre em crianças com menos de um ano de idade, observação congruente com a literatura.

A análise genotípica revelou uma diversidade considerável indicando que as infecções invasivas pediátricas no país são causadas por várias linhagens clonais, sendo as mais prevalentes congruentes com estudos anteriores em Portugal e noutros países europeus. Uma observação idêntica foi feita relativamente a estirpes MRSA (17.1%), com diferentes CCs e tipos *SCCmec* a serem detetados.

Apesar de as estirpes de *S. aureus* isoladas neste estudo manterem suscetibilidade a algumas das opções terapêuticas como a vancomicina ou a daptomicina, entre outros, persistem preocupações especialmente com a resistência a macrólidos e lincosamidas e com a presença de genes de resistência a outras classes de antibiótico, particularmente em estirpes MRSA.

A análise de fatores associados à virulência destacou a presença de vários destes genes nas estirpes de *S. aureus*, ressaltando o potencial patogênico dessas estirpes e a necessidade contínua de monitorização. No entanto, genes de fatores de virulência como a PVL ou as esfoliativas ETA ou ETB, estavam presentes num pequeno número de estirpes, apesar da gravidade das infecções a que estavam associadas estas estirpes.

Em resumo, este estudo é um contributo para conhecer a epidemiologia e características das estirpes de *S. aureus* causadoras de infecções invasivas em crianças e adolescentes em Portugal. Estudos de vigilância epidemiológica como o atual são fundamentais para enfrentar os desafios crescentes da resistência antimicrobiana e virulência bacteriana, permitindo orientar políticas de saúde pública e estratégias de controlo das infecções por *S. aureus*, visando reduzir a sua incidência e o impacto na população pediátrica.

6.1 Perspetivas futuras

O presente trabalho contribui para o conhecimento científico de infeção invasiva por *S. aureus* em doentes com menos de 18 anos de idade em Portugal. No entanto é importante realçar que alguns aspetos não foram abordados integralmente e poderão ser estudados e elucidados em trabalhos futuros, nomeadamente:

- Correlacionar os dados obtidos pela caracterização molecular realizada com os dados clínicos dos doentes. Os dados clínicos foram recolhidos de forma independente no âmbito da colaboração que permitiu o desenvolvimento deste estudo. A disponibilização destes dados permitirá:
 - ◆ Determinar a distribuição de infeções adquiridas na comunidade ou em ambiente hospitalar;
 - ◆ Avaliar diferenças nas manifestações clínicas da doença invasiva entre as linhagens clonais identificadas;
 - ◆ Comparar as manifestações clínicas da doença por estirpes MSSA e MRSA;
 - ◆ Identificar fatores de risco para a infeção por estirpes MRSA (por exemplo, utilização recente de antibióticos, hospitalizações recentes, procedimentos cirúrgicos ou doenças crónicas subjacentes).
- Aprofundar a análise genómica realizada, nomeadamente através de uma melhor delimitação das linhagens genéticas. No corrente trabalho as principais linhagens foram identificadas através da extração dos perfis de MLST (baseada em sete genes) a partir das sequências genómicas. O genoma completo pode ser utilizado para definir um esquema de cgMLST que permita definir melhor as linhagens associadas a infeção invasiva pediátrica em Portugal e comparar com genomas de estirpes isoladas noutras regiões geográficas.
- Identificar elementos genéticos móveis, nomeadamente plasmídeos, nos genomas das estirpes, com o intuito de estudar a sua associação com fatores de virulência e avaliar a importância na disseminação de genes de resistência.
- Continuar a caracterização de estirpes isoladas após 2020, com o intuito de garantir a vigilância epidemiológica das infeções invasivas pediátricas por *S. aureus*. Isto permitirá acompanhar a evolução da prevalência em infeção das

diferentes linhagens identificadas no presente trabalho, identificar a potencial emergência de novas linhagens e monitorizar as resistências a antibióticos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kong, C., Neoh, H. M. & Nathan, S. Targeting *Staphylococcus aureus* toxins: A potential form of anti-virulence therapy. *Toxins* vol. 8 Preprint at <https://doi.org/10.3390/toxins8030072> (2016).
2. Lee, A. S. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Dis Primers* 4, (2018).
3. Kadariya, J., Smith, T. C. & Thapaliya, D. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal food-borne disease: an ongoing challenge in public health. *Biomed Res Int* 2014, (2014).
4. McGuinness, W. A., Malachowa, N. & DeLeo, F. R. Focus: Infectious Diseases: Vancomycin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Yale J Biol Med* 90, 269 (2017).
5. Algammal, A. M. et al. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): One Health Perspective Approach to the Bacterium Epidemiology, Virulence Factors, Antibiotic-Resistance, and Zoonotic Impact. (2020) doi:10.2147/IDR.S272733.
6. Patrick R. Murray, Ken Rosenthal & Michael A. Pfaller. *Medical Microbiology*. (Saunders, 2012).
7. Couto, I., Pereira, S., Miragaia, M., Santos Sanches, I. & De Lencastre, H. Identification of clinical staphylococcal isolates from humans by internal transcribed spacer PCR. *J Clin Microbiol* 39, 3099–3103 (2001).
8. Gnanamani, A., Hariharan, P. & Paul-Satyaseela, M. *Staphylococcus aureus*: Overview of Bacteriology, Clinical Diseases, Epidemiology, Antibiotic Resistance and Therapeutic Approach in *Frontiers in Staphylococcus aureus* (InTech, 2017). doi:10.5772/67338.
9. *Staphylococcus aureus* Diagnosis. Disponível em: <https://www.news-medical.net/health/Staphylococcus-Aureus-Diagnosis.aspx> .
10. Timothy Foster. Chapter 12 *Staphylococcus*. *Medical Microbiology* 4th edition. Samuel Baron.
11. Instruções de utilização-meios em placas prontos a usar BD Mannitol Salt Agar utilização prevista. Disponível em: <http://www.bd.com> (2013).

12. Jeannete Zurit, Carlos Mejía & Manuel GuzmánBlanco. Diagnóstico e teste de sensibilidade para *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina na América Latina.
13. Singhal, N., Kumar, M., Kanaujia, P. K. & Viridi, J. S. MALDI-TOF mass spectrometry: An emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front Microbiol* 6, 144398 (2015).
14. Heaton, C. J., Gerbig, G. R., Sensius, L. D., Patel, V. & Smith, T. C. *Staphylococcus aureus* epidemiology in wildlife: A systematic review. *Antibiotics* vol. 9 Preprint at <https://doi.org/10.3390/antibiotics9020089> (2020).
15. Smith, T. C., Moritz, E. D., Leedom Larson, K. R. & Ferguson, D. D. The environment as a factor in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* transmission. *Rev Environ Health* 25, 121–134 (2010).
16. de Carvalho, M. J. et al. Prevalence of Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible *S. Aureus* in the Saliva of Health Professionals. *Clinics (Sao Paulo)* 64, 295 (2009).
17. Gorwitz, R. J. et al. Changes in the prevalence of nasal colonization with *Staphylococcus aureus* in the United States, 2001-2004. *J Infect Dis* 197, 1226–1234 (2008).
18. Dos Santos, A. L. et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. *J Bras Patol Med Lab* 43, 413–423 (2007).
19. Wertheim, H. F. L. et al. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis* 5, 751–762 (2005).
20. Rodríguez, E. A., Correa, M. M., Ospina, S., Atehortúa, S. L. & Jiménez, J. N. Differences in Epidemiological and Molecular Characteristics of Nasal Colonization with *Staphylococcus aureus* (MSSA-MRSA) in Children from a University Hospital and Day Care Centers. *PLoS One* 9, e101417 (2014).
21. Salazar-Ospina, L. & Jiménez, J. N. High frequency of methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children under 1 year old with skin and soft tissue infections. *J Pediatr (Rio J)* 94, 380–389 (2018).
22. Lopes, C. et al. Clinical protocol of evaluation of adult patients with atopic dermatitis treated with Dupilumab. *Rev Por t Imunoalergologia* 27, 135–145 (2019).

23. Thompson, R. L., Cabezudo, I. & Wenzel, R. P. Epidemiology of nosocomial infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Ann Intern Med* 97, 309–317 (1982).
24. Jimenez-Truque, N. et al. Relationship Between Maternal and Neonatal *Staphylococcus aureus* Colonization. *Pediatrics* 129, e1252 (2012).
25. Peacock, S. J. et al. Determinants of Acquisition and Carriage of *Staphylococcus aureus* in Infancy. *J Clin Microbiol* 41, 5718–5725 (2003).
26. Tavares, D. A., Sá-Leão, R., Miragaia, M. & de Lencastre, H. Large screening of CA-MRSA among *Staphylococcus aureus* colonizing healthy young children living in two areas (urban and rural) of Portugal. *BMC Infect Dis* 10, 1–8 (2010).
27. Crandall, H. et al. Clinical and molecular epidemiology of invasive *Staphylococcus aureus* infection in Utah children; continued dominance of MSSA over MRSA. *PLoS One* 15, e0238991 (2020).
28. Chen, C. J. et al. Factors associated with nasal colonization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among healthy children in Taiwan. *J Clin Microbiol* 49, 131–137 (2011).
29. Tong, S. Y. C., Davis, J. S., Eichenberger, E., Holland, T. L. & Fowler, V. G. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin Microbiol Rev* 28, 603–661 (2015).
30. Wang, X. et al. Molecular characteristics of community-associated *Staphylococcus aureus* isolates from pediatric patients with bloodstream infections between 2012 and 2017 in Shanghai, China. *Front Microbiol* 9, (2018).
31. Tracey A. Taylor & Chandrashekar G. Unakal. *Staphylococcus aureus* Infection. (2018).
32. Lowy, F. D. *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med* 339, 520–532 (1998).
33. Handler, M. Z. & Schwartz, R. A. Staphylococcal scalded skin syndrome: diagnosis and management in children and adults. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 28, 1418–1423 (2014).
34. Leung, A. K. C., Barankin, B. & Leong, K. F. Staphylococcal-scalded skin syndrome: evaluation, diagnosis, and management. *World J Pediatr* 14, 116–120 (2018).
35. Adam Ross; Hugh W. Shoff. Staphylococcal Scalded Skin Syndrome - StatPearls (2022).

36. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection among healthy newborns--Chicago and Los Angeles County, 2004. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 55, 329–32 (2006).
37. Wu, D. *et al.* Epidemiology and molecular characteristics of community-associated methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* from skin/soft tissue infections in a children's hospital in Beijing, China. *Diagn Microbiol Infect Dis* 67, 1–8 (2010).
38. Clinical practice parameters for hemodynamic support of pediatric and neonatal septic shock: 2007 update from the American College of Critical Care Medicine. (2009) doi:10.1097/CCM.0b013e31819323c6.
39. Bizzarro, M. J., Raskind, C., Baltimore, R. S. & Gallagher, P. G. Seventy-Five Years of Neonatal Sepsis at Yale: 1928–2003. *Pediatrics* 116, 595–602 (2005).
40. Hamdy, R. F., Dona, D., Jacobs, M. B. & Gerber, J. S. Risk Factors for Complications in Children with *Staphylococcus aureus* Bacteremia. *Journal of Pediatrics* 208, 214-220.e2 (2019).
41. Qiao, Y. *et al.* Clinical and molecular characteristics of invasive community-acquired *Staphylococcus aureus* infections in Chinese children. *BMC Infect Dis* 14, 1–10 (2014).
42. Le, J. *et al.* Epidemiology and hospital readmission associated with complications of *Staphylococcus aureus* bacteremia in pediatrics over a 25-year period. *Epidemiol Infect* 145, 2631 (2017).
43. *Staphylococcus aureus* - NCBI - NLM. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/taxonomy/1280/>.
44. Malachowa, N. & Deleo, F. R. Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. *Cellular and Molecular Life Sciences* 67, 3057 (2010).
45. Otto, M. *Staphylococcus aureus* toxin gene hitchhikes on a transferable antibiotic resistance element. *Virulence* 1, 49 (2010).
46. Larry M. Bush & Maria T. Vazquez-Pertejo. Infecções estafilocócicas. MANUAL MSD Versão para Profissionais de Saúde (2021).
47. Shiroma, A. *et al.* First Complete Genome Sequences of *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach 1884 (DSM 20231T), Determined by PacBio Single-Molecule Real-Time Technology. *Genome Announc* 3, 800–815 (2015).

48. Fluit, A. C. Livestock-associated *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology and Infection* 18, 735–744 (2012).
49. Foster, T. J. Surface Proteins of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Spectr* 7, (2019).
50. Ahmad-Mansour, N. et al. *Staphylococcus aureus* Toxins: An Update on Their Pathogenic Properties and Potential Treatments. *Toxins (Basel)* 13 (2021).
51. Watkins, R. R., David, M. Z. & Salata, R. A. Current concepts on the virulence mechanisms of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol* 61, 1179 (2012).
52. Foster, T. J. Immune evasion by staphylococci. *Nat Rev Microbiol* 3, 948–958 (2005).
53. Boucher, H., Miller, L. G. & Razonable, R. R. Serious infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis* 51 Suppl 2, (2010).
54. Becker, S., Frankel, M. B., Schneewind, O. & Missiakas, D. Release of protein A from the cell wall of *Staphylococcus aureus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 111, 1574–1579 (2014).
55. Foster, T. J. Surface Proteins of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Spectr* 7, (2019).
56. Protein A from *Staphylococcus aureus*. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/PT/en/product/sigma/p6031> .
57. Kobayashi, S. D. & DeLeo, F. R. *Staphylococcus aureus* Protein A Promotes Immune Suppression. *mBio* 4, (2013).
58. Boero, E. et al. Natural Human Immunity Against Staphylococcal Protein A Relies on Effector Functions Triggered by IgG3. *Front Immunol* 13, (2022).
59. Sedaghat, H., Narimani, T., Nasr Esfahani, B., Mobasherizadeh, S. & Havaei, S. A. Comparison of the Prevalence of Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules (MSCRAMMs) among *Staphylococcus aureus* Isolates in a Burn Unit with Non-Burning Units. *Iran J Public Health* 50, 146 (2021).
60. Higgins, J., Loughman, A., van Kessel, K. P., van Strijp, J. A. & Foster, T. J. Clumping factor A of *Staphylococcus aureus* inhibits phagocytosis by human polymorphonuclear leucocytes. doi:10.1111/j.1574-6968.2006.00229.x.
61. Eldhin, D. N. et al. Clumping factor B (ClfB), a new surface-located fibrinogen-binding adhesin of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 30, 245–257 (1998).

62. Herman-Bausier, P. et al. *Staphylococcus aureus* clumping factor A is a force-sensitive molecular switch that activates bacterial adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 115, 5564–5569 (2018).
63. Thakker, M., Park, J. S., Carey, V. & Lee, J. C. *Staphylococcus aureus* Serotype 5 Capsular Polysaccharide Is Antiphagocytic and Enhances Bacterial Virulence in a Murine Bacteremia Model. *Infect Immun* 66, 5183 (1998).
64. Sompolinsky, D. et al. Encapsulation and Capsular Types in Isolates of *Staphylococcus aureus* from Different Sources and Relationship to Phage Types. *J Clin Microbiol* 22, 828–834 (1985).
65. O’Riordan, K. & Lee, J. C. *Staphylococcus aureus* Capsular Polysaccharides. *Clin Microbiol Rev* 17, 218 (2004).
66. Bacteria: Cell Walls – General Microbiology. Disponível em: <https://open.oregonstate.edu/generalmicrobiology/chapter/bacteria-cell-walls/>.
67. Rohde, M. The Gram-Positive Bacterial Cell Wall. *Microbiol Spectr* 7, (2019).
68. Rismondo, J., Gillis, A. & Gründling, A. Modifications of cell wall polymers in Gram-positive bacteria by multi-component transmembrane glycosylation systems. *Curr Opin Microbiol* 60, 24 (2021).
69. Plata, K., Rosato, A. E. & Węgrzyn, G. *Staphylococcus aureus* as an infectious agent: overview of biochemistry and molecular genetics of its pathogenicity. (2009).
70. Pasquina-Lemonche, L. et al. The architecture of the Gram-positive bacterial cell wall. *Nature* 582, 294–297 (2020).
71. Chapot-Chartier, M. P. & Kulakauskas, S. Cell wall structure and function in lactic acid bacteria. *Microb Cell Fact* 13, 1–23 (2014).
72. Berube, B. J. & Wardenburg, J. B. *Staphylococcus aureus* α -Toxin: Nearly a Century of Intrigue. *Toxins (Basel)* 5, 1140 (2013).
73. Bernheimer, A. W., Avigad, L. S. & Kim, K. S. Staphylococcal sphingomyelinase (beta-hemolysin). *Ann NY Acad Sci* 236, 292–306 (1974).
74. Dinges, M. M., Orwin, P. M. & Schlievert, P. M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev* 13, 16 (2000).
75. Darboe, S. et al. Prevalence of Pantón-Valentine Leukocidin (PVL) and Antimicrobial Resistance in Community-Acquired Clinical *Staphylococcus aureus*

- in an Urban Gambian Hospital: A 11-Year Period Retrospective Pilot Study. *Front Cell Infect Microbiol* 9, (2019).
76. Holmes, A. et al. *Staphylococcus aureus* Isolates Carrying Panton-Valentine Leucocidin Genes in England and Wales: Frequency, Characterization, and Association with Clinical Disease. *J Clin Microbiol* 43, 2384 (2005).
 77. Kreiswirth, B. N., Projan, S. J., Schlievert, P. M. & Novick, R. P. Toxic shock syndrome toxin 1 is encoded by a variable genetic element. *Rev Infect Dis* 11 Suppl 1, S83–S89 (1989).
 78. Síndrome do choque tóxico (SCT) - Doenças infecciosas - Manuais MSD edição para profissionais. <https://www.msmanuals.com/pt-pt/profissional/doen%C3%A7as-infecciosas/cocos-gram-positivos/s%C3%ADndrome-do-choque-t%C3%B3xico-sct>.
 79. Síndrome estafilocócica da pele escaldada - Distúrbios dermatológicos - Manuais MSD edição para profissionais. <https://www.msmanuals.com/pt-pt/profissional/dist%C3%BArbios-dermatol%C3%B3gicos/infec%C3%A7%C3%B5es-bacterianas-da-pele/s%C3%ADndrome-estafiloc%C3%B3cica-da-pele-escaldada>.
 80. Kot, B., Sytykiewicz, H. & Sprawka, I. Expression of the Biofilm-Associated Genes in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Biofilm and Planktonic Conditions. *Int J Mol Sci* 19, (2018).
 81. Kolar, S. L. et al. Extracellular proteases are key mediators of *Staphylococcus aureus* virulence via the global modulation of virulence-determinant stability. *Microbiologyopen* 2, 18 (2013).
 82. Karlsson, A. & Arvidson, S. Variation in Extracellular Protease Production among Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus* Due to Different Levels of Expression of the Protease Repressor sarA. *Infect Immun* 70, 4239 (2002).
 83. Singh, A., Goering, R. V., Simjee, S., Foley, S. L. & Zervos, M. J. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. *Clin Microbiol Rev* 19, 512–530 (2006).
 84. Hallin, M., Friedrich, A. W. & Struelens, M. J. spa typing for epidemiological surveillance of *Staphylococcus aureus*. *Methods Mol Biol* 551, 189–202 (2009).
 85. Olive, D. M. & Bean, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J Clin Microbiol* 37, 1661–1669 (1999).

86. Tenover, F. C. *et al.* Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 33, 2233 (1995).
87. Sharma-Kuinkel, B. K., Rude, T. H. & Fowler, V. G. Pulse Field Gel Electrophoresis. *Methods Mol Biol* 1373, 117 (2016).
88. Larsen, A. R. *et al.* Two Distinct Clones of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) with the Same USA300 Pulsed-Field Gel Electrophoresis Profile: a Potential Pitfall for Identification of USA300 Community-Associated MRSA. *J Clin Microbiol* 47, 3765 (2009).
89. Cha, H. Y. *et al.* Prevalence of the ST239 Clone of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Differences in Antimicrobial Susceptibilities of ST239 and ST5 Clones Identified in a Korean Hospital. *J Clin Microbiol* 43, 3610 (2005).
90. Koreen, L. *et al.* spa Typing Method for Discriminating among *Staphylococcus aureus* Isolates: Implications for Use of a Single Marker To Detect Genetic Micro- and Macrovariation. *J Clin Microbiol* 42, 792 (2004).
91. Shopsin, B. *et al.* Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol* 37, 3556–3563 (1999).
92. Stefani, S. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): global epidemiology and harmonisation of typing methods. *Int J Antimicrob Agents* 39, 273–282 (2012).
93. Struelens, M. J., Hawkey, P. M., French, G. L., Witte, W. & Tacconelli, E. Laboratory tools and strategies for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* screening, surveillance and typing state of the art and unmet needs. *Clin Microbiol Infect* 15, 112–119 (2009).
94. Cookson, B. D. *et al.* Evaluation of molecular typing methods in characterizing a European collection of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains: the HARMONY collection. *J Clin Microbiol* 45, 1830–1837 (2007).
95. Francisco, A. P., Bugalho, M., Ramirez, M. & Carriço, J. A. Global optimal eBURST analysis of multilocus typing data using a graphic matroid approach. *BMC Bioinformatics* 10, 1–15 (2009).
96. Enright, M. C., Day, N. P. J., Davies, C. E., Peacock, S. J. & Spratt, B. G. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and

- methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 38, 1008–1015 (2000).
97. Feil, E. J., Li, B. C., Aanensen, D. M., Hanage, W. P. & Spratt, B. G. eBURST: Inferring Patterns of Evolutionary Descent among Clusters of Related Bacterial Genotypes from Multilocus Sequence Typing Data. *J Bacteriol* 186, 1518–1530 (2004).
 98. goeBURST homepage. Disponível em: <https://www.phyloviz.net/goeburst/>.
 99. Diancourt, L., Passet, V., Verhoef, J., Grimont, P. A. D. & Brisse, S. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *J Clin Microbiol* 43, 4178–4182 (2005).
 100. Johnson, W. L. et al. Genomics of *Staphylococcus aureus* ocular isolates. *PLoS One* 16, e0250975 (2021).
 101. Price, J., Gordon, N. C., Crook, D., Llewelyn, M. & Paul, J. The usefulness of whole genome sequencing in the management of *Staphylococcus aureus* infections. *Clin Microbiol Infect* 19, 784–789 (2013).
 102. Köser, C. U. et al. Routine use of microbial whole genome sequencing in diagnostic and public health microbiology. *PLoS Pathog* 8, (2012).
 103. Goldberg, B., Sichtig, H., Geyer, C., Ledebøer, N. & Weinstock, G. M. Making the Leap from Research Laboratory to Clinic: Challenges and Opportunities for Next-Generation Sequencing in Infectious Disease Diagnostics. *mBio* 6, (2015).
 104. Gordon, N. C. et al. Prediction of *Staphylococcus aureus* antimicrobial resistance by whole-genome sequencing. *J Clin Microbiol* 52, 1182–1191 (2014).
 105. Skinner, D. & Keefer, C. S. Significance of bacteremia caused by *staphylococcus aureus*: a study of one hundred and twenty-two cases and a review of the literature concerned with experimental infection in animals. *Arch Intern Med* 68, 851–875 (1941).
 106. Lowy, F. D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest* 111, 1265–1273 (2003).
 107. Linares Rodríguez, J. F. & Martínez Menéndez, J. L. Resistencia a los antimicrobianos y virulencia bacteriana. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, ISSN 0213-005X, Vol. 23, N^o. 2, 2005, págs. 86-93 23, 86–93 (2005).

108. Alós, J. I. Antibiotic resistance: A global crisis. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* vol. 33 692–699 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2014.10.004> (2015).
109. Cefalosporinas - Doenças infecciosas - Manuais MSD edição para profissionais. <https://www.msmanuals.com/pt-br/profissional/doen%C3%A7as-infecciosas/bact%C3%A9rias-e-f%C3%A1rmacos-antibacterianos/cefalosporinas>.
110. Antibiótico Amoxicilina + Clavulanato [bula simplificada]. Disponível em: <https://www.mdsau.de.com/bulas/amoxicilina-clavulanato/>.
111. Liu, C. et al. Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America for the Treatment of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections in Adults and Children. *Clinical Infectious Diseases* 52, e18–e55 (2011).
112. Fuda, C. C. S., Fisher, J. F. & Mobashery, S. β -Lactam resistance in *Staphylococcus aureus*: The adaptive resistance of a plastic genome. *Cellular and Molecular Life Sciences* vol. 62 2617–2633 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5148-6> (2005).
113. Bush, K. & Bradford, P. A. β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Med* 6, (2016).
114. Lima, L. M., Silva, B. N. M. da, Barbosa, G. & Barreiro, E. J. β -lactam antibiotics: An overview from a medicinal chemistry perspective. *Eur J Med Chem* 208, 112829 (2020).
115. Herzberg, O. & Moulton, J. Bacterial Resistance to β -Lactam Antibiotics: Crystal Structure of β -Lactamase from *Staphylococcus aureus* PC1 at 2.5 Å Resolution. *Science* (1979) 236, 694–701 (1987).
116. Gordon, R. J. & Lowy, F. D. Pathogenesis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. *Clin Infect Dis* 46, S350 (2008).
117. Dumitrescu, O. et al. *Staphylococcus aureus* resistance to antibiotics: key points in 2010. *Med Sci (Paris)* 26, 943–949 (2010).
118. Kaya, H. et al. SCC mec Finder, a Web-Based Tool for Typing of Staphylococcal Cassette Chromosome mec in *Staphylococcus aureus* Using Whole-Genome Sequence Data. *mSphere* 3, (2018).
119. Patel, P. H. & Hashmi, M. F. Macrolides. *StatPearls* (2023).
120. Vázquez-Laslop, N. & Mankin, A. S. How macrolide antibiotics work. *Trends Biochem Sci* 43, 668 (2018).

121. Maisat, W., Bermudez, M. & Yuki, K. Use of clindamycin as an alternative antibiotic prophylaxis. *Perioper Care Oper Room Manag* 28, (2022).
122. Saribas, Z., Tunckanat, F. & Pinar, A. Prevalence of erm genes encoding macrolide-lincosamide-streptogramin (MLS) resistance among clinical isolates of *Staphylococcus aureus* in a Turkish university hospital. *Clinical Microbiology and Infection* 12, 797–799 (2006).
123. Bogö, L., —y, J., Frimodt-Möller, N. & Aarestrup, F. M. Presence of erm gene classes in Gram-positive bacteria of animal and human origin in Denmark. *FEMS Microbiol Lett* 170, 151–158 (1999).
124. Matsuoka, M., Inoue, M., Nakajima, Y. & Endo, Y. New erm Gene in *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 46, 211 (2002).
125. Zmantar, T., Kouidhi, B., Miladi, H. & Bakhrouf, A. Detection of macrolide and disinfectant resistance genes in clinical *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *BMC Res Notes* 4, 453 (2011).
126. Jensen, L. B., Frimodt-Moller, N. & Aarestrup, F. M. Presence of erm gene classes in Gram-positive bacteria of animal and human origin in Denmark. *FEMS Microbiol Lett* 170, 151–158 (1999).
127. Gómez-Sanz, E. et al. Novel erm(T)-Carrying Multiresistance Plasmids from Porcine and Human Isolates of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* ST398 That Also Harbor Cadmium and Copper Resistance Determinants. *Antimicrob Agents Chemother* 57, 3275 (2013).
128. Guo, Y., Song, G., Sun, M., Wang, J. & Wang, Y. Prevalence and Therapies of Antibiotic-Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Front Cell Infect Microbiol* 10, 511382 (2020).
129. Castellano González, M. J. & Perozo-Mena, A. J. Mecanismos de resistência a Glicopéptidos em *Staphylococcus aureus*. *Kasmera* 38, 36–44 (2010).
130. Espedido, B. A., Jensen, S. O. & Van Hal, S. J. Ceftaroline fosamil salvage therapy: an option for reduced-vancomycin-susceptible MRSA bacteraemia. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 70, 797–801 (2015).
131. Melo-Cristino, J., Resina, C., Manuel, V., Lito, L. & Ramirez, M. First case of infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. *The Lancet* 382, 205 (2013).

132. Sieradzki, K., Roberts, R. B., Haber, S. W. & Tomasz, A. The development of vancomycin resistance in a patient with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *N Engl J Med* 340, 517–523 (1999).
133. Hiramatsu, K. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 40, 135–136 (1997).
134. Hiramatsu, K. et al. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet* 350, 1670–1673 (1997).
135. Hajikhani, B. et al. The global prevalence of fusidic acid resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*: a systematic review and meta-analysis. *Antimicrobial Resistance & Infection Control* 2021 10:1 10, 1–14 (2021).
136. Turnidge, J. & Collignon, P. Resistance to fusidic acid. *Int J Antimicrob Agents* 12, S35–S44 (1999).
137. Vicente, D. & Pérez-Trallero, E. Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol. *Enferm. infec. microbiol. clín. (Ed. impr.)* 122–130 (2010).
138. Aminov, R. I., Garrigues-Jeanjean, N. & Mackie, R. I. Molecular Ecology of Tetracycline Resistance: Development and Validation of Primers for Detection of Tetracycline Resistance Genes Encoding Ribosomal Protection Proteins. *Appl Environ Microbiol* 67, 22 (2001).
139. Warner, A. J., Hathaway-Schrader, J. D., Lubker, R., Davies, C. & Novince, C. M. Tetracyclines and bone: unclear actions with potentially lasting effects. *Bone* 159, 116377 (2022).
140. João Carlos de Sousa. Antibióticos anti-bacterianos. in (ed. Publicações Farmácia Portuguesa) (2001).
141. Giurazza, R. et al. Emerging Treatment Options for Multi-Drug-Resistant Bacterial Infections. *Life* 11, (2021).
142. Koulenti, D. et al. Novel Antibiotics for Multidrug-Resistant Gram-Positive Microorganisms. *Microorganisms* 7, 270 (2019).
143. Fishovitz, J. et al. Disruption of Allosteric Response as an Unprecedented Mechanism of Resistance to Antibiotics. *J Am Chem Soc* 136, 9814 (2014).
144. Giedraitienė, A., Giedraitienė, A., Vitkauskienė, A., Naginienė, R. & Pavilionis, A. Antibiotic Resistance Mechanisms of Clinically Important Bacteria. *Review Medicina (Kaunas)* vol. 47 (2011).

145. Rossetti, M. L. R., de Moura Valim, A. R., Silva, M. S. N. & Rodriguez, V. S. [Resistant tuberculosis: a molecular review]. *Rev Saude Publica* 36, 525–532 (2002).
146. Zheng, X. et al. Resistance Profiles and Biological Characteristics of Rifampicin-Resistant *Staphylococcus aureus* Small-Colony Variants. *Infect Drug Resist* 14, 1527 (2021).
147. Krause, K. M., Serio, A. W., Kane, T. R. & Connolly, L. E. Aminoglycosides: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Med* 6, (2016).
148. Duran, N., Ozer, B., Duran, G. G., Onlen, Y. & Demir, C. Antibiotic resistance genes & susceptibility patterns in staphylococci. *Indian J Med Res* 135, 389 (2012).
149. Patel, K. & Goldman, J. L. Safety Concerns Surrounding Quinolone Use in Children. *J Clin Pharmacol* 56, 1060 (2016).
150. Michalak, K. et al. Treatment of the Fluoroquinolone-Associated Disability: The Pathobiochemical Implications. *Oxid Med Cell Longev* 2017, (2017).
151. Redgrave, L. S., Sutton, S. B., Webber, M. A. & Piddock, L. J. V. Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trends Microbiol* 22, 438–445 (2014).
152. Ferreira, M. et al. Fluoroquinolone Metalloantibiotics: A Promising Approach against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Int J Environ Res Public Health* 17, (2020).
153. Jacoby, G. A. Mechanisms of Resistance to Quinolones. *Clinical Infectious Diseases* 41, S120–S126 (2005).
154. Tsiodras, S. et al. Linezolid resistance in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 358, 207–208 (2001).
155. Meka, V. G. & Gold, H. S. Antimicrobial resistance to linezolid. *Clin Infect Dis* 39, 1010–1015 (2004).
156. Huovinen, P. Resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole. *Clinical Infectious Diseases* 32, 1608–1614 (2001).
157. Otto, M. Community-associated MRSA: what makes them special? *Int J Med Microbiol* 303, 324 (2013).
158. Berktold, M. et al. Genetic characterization of Panton-Valentine leukocidin-producing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Western Austria. *Wien Klin Wochenschr* 124, 709–715 (2012).

159. de Lencastre, H., Oliveira, D. & Tomasz, A. Antibiotic resistant *Staphylococcus aureus*: a paradigm of adaptive power. *Curr Opin Microbiol* 10, 428 (2007).
160. Long, C. B., Madan, R. P. & Herold, B. C. Diagnosis and management of community-associated MRSA infections in children. *Expert Rev Anti Infect Ther* 8, 183–195 (2010).
161. Atshan, S. S. et al. Genotypically different clones of *Staphylococcus aureus* are diverse in the antimicrobial susceptibility patterns and biofilm formations. *Biomed Res Int* 2013, (2013).
162. Gouveia, C. et al. Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Lacking PVL, as a Cause of Severe Invasive Infection Treated with Linezolid. *Case Rep Pediatr* 2013, 1–5 (2013).
163. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial Resistance in the EU/EEA (EARS-Net): Annual Epidemiological Report for 2019.
164. Fernandes, P. A., Silva, M. G., Cruz, A. P. & Paiva, J. A. PORTUGAL e Controlo de Infeções e de Resistência Antimicrobianos Em Números – 2015. <http://www.dgs.pt>.
165. Köck, R. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): Burden of disease and control challenges in Europe. *Eurosurveillance* 15, 1–9 (2010).
166. EUCAST Breakpoint Tables. Disponível em: <http://www.eucast.org>.
167. BrCAST-Método de Disco-Difusão para Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos Teste sensibilidade aos antimicrobianos Método de disco-difusão EUCAST Versão 6.0 janeiro 201.
168. Bolger, A. M., Lohse, M. & Usadel, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30, 2114–2120 (2014).
169. Walker, B. J., Abeel, T. et al., Shea, T., Priest, M. & Abouelliel, A. Pilon: An Integrated Tool for Comprehensive Microbial Variant Detection and Genome Assembly Improvement. *PLoS One* 9, 112963 (2014).
170. Bankevich, A. et al. SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of Computational Biology* 19, 455–477 (2012).
171. Seemann, T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 30, 2068–2069 (2014).

172. Petersen, T. N., Brunak, S., Von Heijne, G. & Nielsen, H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods* 2011 8:10 8, 785–786 (2011).
173. Lagesen, K. et al. RNAmmer: consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes. *Nucleic Acids Res* 35, 3100 (2007).
174. Nascimento, M. et al. PHYLOViZ 2.0: providing scalable data integration and visualization for multiple phylogenetic inference methods. *Bioinformatics* 33, 128–129 (2017).
175. Grabchak, M., Marcon, E., Lang, G. & Zhang, Z. The generalized Simpson's entropy is a measure of biodiversity. *PLoS One* 12, e0173305 (2017).
176. Kaplan, S. L. Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections in Children. *Semin Pediatr Infect Dis* 17, 113–119 (2006).
177. Lamaro-Cardoso, J. et al. Molecular Epidemiology and Risk Factors for Nasal Carriage of *Staphylococcus aureus* and Methicillin-Resistant *S. aureus* in Infants Attending Day Care Centers in Brazil. *J Clin Microbiol* 47, 3991 (2009).
178. Espadinha, D. et al. Extensive Dissemination of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) between the Hospital and the Community in a Country with a High Prevalence of Nosocomial MRSA. *PLoS One* 8, (2013).
179. Tavares, A., Miragaia, M., Rolo, J., Coelho, C. & De Lencastre, H. High prevalence of hospital-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the community in Portugal: evidence for the blurring of community-hospital boundaries. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 32, 1269–1283 (2013).
180. Sharma-Kuinkel, B. K. et al. Potential Influence of *Staphylococcus aureus* Clonal Complex 30 Genotype and Transcriptome on Hematogenous Infections. *Open Forum Infect Dis* 2, (2015).
181. Tavares, A., Faria, N. A., De Lencastre, H. & Miragaia, M. Population structure of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) in Portugal over a 19-year period (1992-2011). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 33, 423–432 (2014).
182. Conceição, T., Martins, H., Rodrigues, S., de Lencastre, H. & Aires-de-Sousa, M. *Staphylococcus aureus* nasal carriage among homeless population in Lisbon, Portugal. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 38, 2037–2044 (2019).

183. Santos, V. et al. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* CC398 in Purulent Lesions of Piglets and Fattening Pigs in Portugal. <https://home.liebertpub.com/mdr> 26, 850–856 (2020).
184. Conceição, T., De Lencastre, H. & Aires-De-Sousa, M. Frequent isolation of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST398 among healthy pigs in Portugal. PLoS One 12, (2017).
185. Bouchami, O. et al. Evidence for the Dissemination to Humans of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* ST398 through the Pork Production Chain: A Study in a Portuguese Slaughterhouse. Microorganisms 8, 1–16 (2020).
186. Köck, R. et al. Prevalence and molecular characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) among pigs on German farms and import of livestock-related MRSA into hospitals. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 28, 1375–1382 (2009).
187. Graveland, H., Duim, B., van Duijkeren, E., Heederik, D. & Wagenaar, J. A. Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals and humans. International Journal of Medical Microbiology 301, 630–634 (2011).
188. Molla, B. et al. Epidemiology and genotypic characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains of porcine origin. J Clin Microbiol 50, 3687–3693 (2012).
189. Vandendriessche, S., Kadlec, K., Schwarz, S. & Denis, O. Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* ST398-t571 harbouring the macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance gene *erm*(T) in Belgian hospitals. J Antimicrob Chemother 66, 2455–2459 (2011).
190. Lim, K. T., Hanifah, Y. A., Yusof, M. Y. M. & Thong, K. L. *ermA*, *ermC*, *tetM* and *tetK* are essential for erythromycin and tetracycline resistance among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from a tertiary hospital in Malaysia. Indian J Med Microbiol 30, 203–207 (2012).
191. Mistourath Mama, O. et al. Penicillin susceptibility among invasive MSSA infections: a multicentre study in 16 Spanish hospitals. doi:10.1093/jac/dkab208.
192. Aires De Sousa, M., Conceição, T., Simas, C. & De Lencastre, H. Comparison of Genetic Backgrounds of Methicillin-Resistant and -Susceptible *Staphylococcus aureus* Isolates from Portuguese Hospitals and the Community. J Clin Microbiol 43, 5150 (2005).

193. Takayama, Y. et al. Prevalence of blaZ Gene and Performance of Phenotypic Tests to Detect Penicillinase in *Staphylococcus aureus* Isolates from Japan. *Ann Lab Med* 38, 155 (2018).
194. Deurenberg, R. H. & Stobberingh, E. E. The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infection, Genetics and Evolution* 8, 747–763 (2008).
195. Vandenesch, F. et al. Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Carrying Panton-Valentine Leukocidin Genes: Worldwide Emergence. *Emerg Infect Dis* 9, 978 (2003).
196. Daum, R. S. et al. A Novel Methicillin-Resistance Cassette in Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates of Diverse Genetic Backgrounds. *J Infect Dis* 186, 1344–1347 (2002).
197. Prevenção e Controlo de Colonização e Infeção por *Staphylococcus aureus* resistente à Meticilina (MRSA) nos hospitais e unidades de internamento de cuidados continuados integrados - Portal das Normas Clínicas. Disponível em: <https://normas.dgs.min-saude.pt/2014/12/09/prevencao-e-controlo-de-colonizacao-e-infecao-por-staphylococcus-aureus-resistente-a-meticilina-mrsa-nos-hospitais-e-unidades-de-internamento-de-cuidados-continuados-integrados/>.
198. Aguilera-Alonso, D. et al. Antibiotic resistance in bloodstream isolates from high-complexity paediatric units in Madrid, Spain: 2013-2021. *J Hosp Infect* 139, 33–43 (2023).
199. Dhand, A. & Sakoulas, G. Reduced vancomycin susceptibility among clinical *Staphylococcus aureus* isolates ('the MIC Creep'): implications for therapy. *F1000 Med Rep* 4, 4 (2012).
200. Niveditha, N. & Sujatha, S. Worrisome trends in rising minimum inhibitory concentration values of antibiotics against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* – Insights from a tertiary care center, South India. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* 19, 585 (2015).
201. Lu, C. et al. Decreased Vancomycin MICs among Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates at a Chinese Tertiary Hospital over a 12-year Period. *Front Microbiol* 7, 139 (2016).
202. Husain, A., Rawat, V., Umesh, Kumar, M. & Verma, P. K. Vancomycin, linezolid and daptomycin susceptibility pattern among clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from Sub- Himalyan Center. *J Lab Physicians* 10, 145 (2018).

203. 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* 59, 7265 (2015).
204. Khamash, D. F. et al. Increasing Clindamycin and Trimethoprim-Sulfamethoxazole Resistance in Pediatric *Staphylococcus aureus* Infections. *J Pediatric Infect Dis Soc* 8, 351–353 (2019).
205. Chroboczek, T. et al. Clonal Complex 398 Methicillin Susceptible *Staphylococcus aureus*: A Frequent Unspecialized Human Pathogen with Specific Phenotypic and Genotypic Characteristics. *PLoS One* 8, 68462 (2013).
206. Lannergård, J., Norström, T. & Hughes, D. Genetic Determinants of Resistance to Fusidic Acid among Clinical Bacteremia Isolates of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 53, 2059 (2009).
207. Hoppe, P. A. et al. Severe infections of Panton-Valentine leukocidin positive *Staphylococcus aureus* in children. *Medicine* 98, (2019).

8. ANEXOS

Tabela 7 (A1) - Lista de Centros hospitalares que participaram no estudo

Centro Hospitalar Algarve

Centro Hospitalar Leiria

Centro Hospitalar Lisboa Norte

Centro Hospitalar Setúbal

Centro Hospitalar Tondela Viseu

Centro Hospitalar Universitário Coimbra

Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia/Espinho

Hospital Beatriz Ângelo – Loures

Hospital Dona Estefânia

Hospital Professor Doutor Fernando Fonseca

Hospital Vila Franca de Xira

Tabela 8 (A2)- Informação detalhada sobre a resistências das 205 estirpes aos antimicrobianos

CC	STs (n)	PEN	CEF	ERI	CLI	GEN	CLO	TET	AFU	NOR	RIF	Genótipo	Tipo SCCmec	Fenótipo MLS _B
398 (34)	398 (12), 752 (1)	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	ermT	n.a.	iMLS _B
	398 (12)	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	blaZ, ermT	n.a.	iMLS _B
	398 (7)	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	blaZ, ermT, aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia	n.a.	iMLS _B
	398 (1)	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	blaZ, aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia	n.a.	S
	398 (1)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	Nenhum	n.a.	S
30 (33)	30 (22), 34 (7), 7426 (1)	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	blaZ	n.a.	S
	30 (2)	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	blaZ, ermA	n.a.	iMLS _B
	30 (1)	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	blaZ	n.a.	S
5 (28)	7427 (3), 105 (2)	R	R	R	R	S	S	S	S	R	S	blaZ, mecA, ermA	II	iMLS _B
	5 (4)	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	blaZ, mecA, ermC, aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia, fusC	VI	iMLS _B
	5 (4)	R	R	R	R	S	S	S	R	R	S	mecA, ermC, fusC	IV	iMLS _B
	5 (3)	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	blaZ	n.a.	S
	105 (3)	R	R	R	R	S	S	S	S	R	S	blaZ, mecA, ermA	II	cMLS _B
	5 (2)	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	blaZ	n.a.	S
	5 (2)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	Nenhum	n.a.	S
	7429 (1)	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	blaZ, fusB	n.a.	S
	5269 (1)	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	blaZ, mecA	IV	S
	5 (1)	R	R	R	R	S	S	S	S	R	S	blaZ, mecA, ermC	VI	iMLS _B
	5 (1)	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	ermA	n.a.	iMLS _B
	5 (1)	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	Nenhum	n.a.	S
45 (22)	45 (11), 508 (2), 54 (1), 2285 (1), 2498 (1)	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	blaZ	n.a.	S
	45 (4)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	Nenhum	n.a.	S
	45 (1)	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	blaZ	n.a.	S

CC	STs (n)	PEN	CEF	ERI	CLI	GEN	CLO	TET	AFU	NOR	RIF	Genótipo	Tipo SCCmec	Fenótipo MLS _B
	45 (1)	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	blaZ, ermB	n.a.	cMLS _B
72 (18)	72 (16)	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	blaZ	n.a.	S
	72 (1)	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	blaZ, catA7	n.a.	S
	72 (1)	R	R	S	S	S	S	S	S	R	S	blaZ, mecA	IV	S
22 (15)	22 (5)	R	R	R	R	S	S	S	S	R	S	blaZ, mecA, ermC	IV	iMLS _B
	22 (4)	R	R	S	S	S	S	S	S	R	S	blaZ, mecA	IV	S
	22 (3)	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	blaZ	n.a.	S
	22 (1)	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	blaZ	n.a.	S
	22 (1)	R	R	S	S	R	S	S	S	R	S	blaZ, mecA, aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia	nd	S
	22 (1)	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	blaZ, mecA, ermC	IV	iMLS _B
121 (12)	121 (6), 3213 (1), 7432 (1)	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	blaZ	n.a.	S
	121 (2)	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	blaZ	n.a.	S
	121 (1)	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	blaZ	n.a.	S
	121 (1)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	none	n.a.	S
8 (10)	8 (3), 7428 (1), 7430 (1)	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	blaZ	n.a.	S
	8 (3)	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S	blaZ, mecA, fusC	VI	S
	8 (1)	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	blaZ, fusC	n.a.	S
	8 (1)	R	R	S	S	R	S	R	S	R	S	blaZ, mecA, aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia, tetK	n.a.	S
7 (6)	7 (3), 789 (1), 7431 (1)	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	blaZ	n.a.	S
	7 (1)	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	blaZ, catA7	n.a.	S
9 (5)	27 (3), 9 (2)	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	blaZ	n.a.	S
152 (5)	152 (2)	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	blaZ	n.a.	S
	152 (1)	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	blaZ, catA8	n.a.	S
	152 (1)	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	blaZ, mecA	IV	S
	152 (1)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	Nenhum	n.a.	S
15 (4)	15 (4)	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	blaZ	n.a.	S

CC	STs (n)	PEN	CEF	ERI	CLI	GEN	CLO	TET	AFU	NOR	RIF	Genótipo	Tipo <i>SCCmec</i>	Fenótipo <i>MLS_B</i>
6 (3)	6 (3)	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	blaZ	n.a.	S
97 (3)	97 (1)	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	blaZ	n.a.	S
	97 (1)	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	blaZ, msrA	n.a.	M
	97 (1)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	none	n.a.	S
291 (3)	291 (3)	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	blaZ	n.a.	S
25 (2)	25 (1)	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	blaZ	n.a.	S
	25 (1)	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	blaZ, msrA	n.a.	M
59 (1)	59 (1)	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	blaZ	n.a.	S
singleton	2867 (1)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	Nenhum	n.a.	S

PEN - penicilina; CEF - cefoxitina; ERI - eritromicina; CLI - clindamicina; GEN - gentamicina; CLO - cloronfenicol; TET - tetraciclina; AFU - ácido fusídico; NOR - norfloxacina; RIF - rifampicina; n.a. – não aplicável.