

A ascensão de genes de resistência a antibióticos em *Staphylococcus aureus*: revisão sistemática

Patrícia Reguinga^{1†}, Joana Afonso^{1†}, Matilde Carmo^{1†}, Edna Ribeiro^{2,3}

1. Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, Instituto Politécnico de Lisboa. Lisboa, Portugal.
2. Departamento das Ciências do Diagnóstico, Terapêutica e Saúde Pública, Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, Instituto Politécnico de Lisboa. Lisboa, Portugal. edna.ribeiro@estesl.ipl.pt
3. H&TRC - Health & Technology Research Center, ESTeSL – Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, Instituto Politécnico de Lisboa. Lisboa, Portugal.

† Autores contribuíram de igual forma para o artigo

RESUMO

Introdução – O *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) tem-se disseminado globalmente, tornando-se endêmico em muitos hospitais e comunidades. Além da meticilina, diversas estirpes de *S. aureus* têm mostrado resistência a uma variedade de outros antibióticos. Esta resistência é conferida por genes cuja presença e expressão são facilitadas por uma alta taxa de recombinação genética e pela capacidade de transferência horizontal de genes. A recente sequenciação dos diferentes genomas das estirpes de *S. aureus* e o desenvolvimento de ferramentas de bioinformática são muito promissores na identificação e caracterização de genes-alvo associados a esta resistência. **Objetivo** – Determinar as tendências emergentes, estirpes mais prevalentes, mecanismos moleculares subjacentes e fatores de virulência e como esses elementos estão relacionados com a resistência antimicrobiana e o sucesso das infeções causadas por diferentes estirpes de *S. aureus*. **Métodos** – Utilizaram-se as bases de dados PubMed e ScienceDirect para pesquisar artigos de janeiro de 2016 a agosto de 2024, com texto completo disponível em língua inglesa, que estudassem infeções nosocomiais por *S. aureus* efetuando testes de sensibilidade a antibióticos (TSA) e análise do genoma, de modo a identificar genes de resistência a antibióticos e fatores de virulência. Adicionalmente foram também pesquisados artigos no *website* Elicit. A seleção dos artigos e da informação foi realizada através da ferramenta *Rayyan* e a extração da informação pelo *Microsoft Excel*. **Resultados** – Foram incluídos quatro estudos, realizados no continente asiático, mas em diferentes regiões. Os estudos realizados na China concentraram-se principalmente nos dois clones MRSA ST239 e ST59, reconhecidos mundialmente. No estudo no Irão, realizado em cinco hospitais, os isolados MRSA demonstraram uma distribuição clonal notável que reflete a epidemiologia local. O estudo realizado nas Filipinas revelou que a maioria dos isolados de MRSA pertencia ao complexo CC30,

distribuídos principalmente entre o subtipo ST30 e a sua variante de *locus* único ST1456. **Conclusão** – Os dois clones ST239 e ST59 são dos mais prevalentes mundialmente em infecções nosocomiais causadas por MRSA. A maioria dos estudos demonstrou que todos os isolados de MRSA foram identificados como resistentes à penicilina e oxacilina. Os estudos que determinaram os fatores de virulência permitiram concluir que os MRSA possuem genes de virulência, sendo os mais comuns o gene *chp* e os genes codificadores de PVL.

Palavras-chave: Staphylococcus aureus resistente à meticilina (MRSA); Infecções nosocomiais; Genes de resistência a antibióticos; Fatores de virulência.

The rise of antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus*: a systematic review

ABSTRACT

Introduction – Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) has disseminated globally, becoming endemic in many hospitals and communities. In addition to methicillin, *S. aureus* strains have shown resistance to other antibiotics. This resistance is conferred by genes whose presence and expression are promoted by a high rate of genetic recombination and horizontal gene transfer. The recent sequencing of the different *S. aureus* strains genomes and the development of bioinformatics tools hold great promise for identifying and characterizing target genes associated with this resistance. **Objective** – To determine emerging trends, most prevalent strains, underlying molecular mechanisms and virulence factors, and how these elements are related to antimicrobial resistance and the success of infections caused by different *S. aureus* clones. **Methods** – PubMed and ScienceDirect databases were used to search for articles published between January 2016 and August 2024 with full text available in English that investigated nosocomial infections by *S. aureus*, testing (AST), and genome analysis to identify antibiotic resistance genes and virulence factors. Additionally, articles from the Elicit website were also searched. The articles and information were screened using the Rayyan tool and extracted using Microsoft Excel. **Results** – Four studies were included, all of which were conducted in Asia, but in different regions. The studies conducted in China primarily focused on the two globally recognized ST239 and ST59 clones. The more localized study from Iran, carried out across five hospitals, showed a remarkable clonal distribution that reflected the local epidemiology. Meanwhile, the study from the Philippines revealed that the majority of MRSA isolates belonged to the CC30 complex, distributed mainly between the ST30 subtype and its

single-locus variant ST1456. **Conclusion** – MRSA clonal lineage sequence types ST239 and ST59 are the most prevalent worldwide in nosocomial infections. Most studies have shown that all MRSA isolates were identified as resistant to penicillin and oxacillin. Virulence factors have concluded that the isolates carry virulence genes, with the most common being the *chp* and PVL coding genes.

Keywords: Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA); Nosocomial infections; Antibiotic resistance genes; Virulence factors.

Introdução

A resistência bacteriana aos antibióticos representa uma crise crescente de saúde pública, especialmente no contexto das infecções nosocomiais, onde o controlo rigoroso de infecções e o uso adequado de antibióticos são cruciais¹. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), as infecções nosocomiais afetam milhões de pessoas todos os anos, estando associadas a prolongamento de internamentos, aumento de custos médicos, resistência a medicamentos e a mortes evitáveis. A resistência bacteriana ameaça reverter muitas das conquistas da medicina moderna, tornando as infecções mais difíceis de tratar e elevando o risco associado a procedimentos médicos².

Entre os agentes patogénicos mais preocupantes destaca-se a bactéria *Staphylococcus aureus* devido à sua capacidade de desenvolver resistência a múltiplos antibióticos e causar graves infecções³. É a espécie mais patogénica do género *Staphylococcus*, sendo responsável tanto por infecções nosocomiais como comunitárias⁴. Estima-se que cerca de 20-30% da população esteja permanentemente colonizada por este microrganismo e 30% são portadores temporários. Esta colonização fornece um reservatório a partir do qual existe potencial de dispersão bacteriana, particularmente relevante em situações de comprometimento das defesas do hospedeiro. As infecções causadas pelo *S. aureus* variam desde infecções superficiais até pneumonia, bacteremia e outras infecções sistémicas⁵.

O *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA), identificado pela primeira vez na década de 60, disseminou-se globalmente e tornou-se endémico em muitos hospitais e comunidades. Além da meticilina, diversas estirpes de MRSA demonstram resistência a vários antibióticos, incluindo penicilinas, macrolídeos, tetraciclina e, mais recentemente, à vancomicina, considerada a última opção terapêutica/linha de tratamento. Assim, o MRSA representa uma grave ameaça devido à sua resistência a múltiplas classes de antibióticos e à sua capacidade de evolução⁵⁻⁶.

Clinicamente, o principal desafio no tratamento de infecções por *S. aureus* é a sua resistência aos antibióticos, o que aumenta a probabilidade de falha terapêutica e,

consequentemente, um mau prognóstico. A resistência aos antibióticos prolonga a doença, aumenta o risco de morte — indivíduos com MRSA têm 64% de maior probabilidade de morrer em comparação com infecções não resistentes — e eleva os custos de saúde devido a internamentos hospitalares mais longos e à necessidade de cuidados intensivos⁵.

Esta resistência é conferida por genes cuja presença e a expressão são facilitadas por uma alta taxa de recombinação genética e pela capacidade de transferência horizontal de genes, permitindo que o *S. aureus* se adapte rapidamente às pressões seletivas impostas pelo uso clínico de antibióticos. A recente sequenciação dos genomas das estirpes de *S. aureus* e o desenvolvimento de ferramentas de bioinformática são muito promissores na identificação e caracterização de genes-alvo associados a esta resistência⁷.

Sabe-se que a resistência à metilina é codificada pelo gene *mecA*, localizado no elemento genético móvel *SCCmec*. O MRSA evoluiu de estirpes de *S. aureus* sensível à metilina (MSSA) através da aquisição do *SCCmec*. Este gene leva à codificação da proteína PBP2a de ligação à penicilina, que apresenta baixa afinidade para os antibióticos β -lactâmicos⁷. O gene *ermC* confere resistência aos macrolídeos, enquanto os genes *tetK* e *tetM* estão associados à resistência às tetraciclina. Recentemente, o gene *VanA* foi identificado como responsável pela resistência à vancomicina por meio da modificação dos precursores do peptidoglicano bacteriano⁸⁻⁹. Estes mecanismos complexos de resistência evidenciam a adaptabilidade do *S. aureus*, ressaltando-se a necessidade de vigilância contínua e o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para combater este agente patogénico.

Além da sua resistência antimicrobiana, o *S. aureus* é altamente virulento, o que se deve à sua capacidade de expressar fatores que facilitam a adesão, invasão, inflamação e evasão do sistema imunológico. Entre os fatores de virulência estão a leucocidina de *Panton-Valentine* (PVL), que destrói células imunológicas, e a proteína A (*spa*) que inibe a fagocitose¹⁰. A formação de biofilmes em superfícies biológicas e artificiais também contribui para a proteção da bactéria contra a ação de antibióticos e do sistema imunológico, dificultando o tratamento das infecções e consolidando o *S. aureus* como um patógeno extremamente adaptável e difícil de erradicar¹¹⁻¹³.

É ainda importante referir o gene *chp*, pois este está envolvido na regulação de fatores de virulência por via do sistema *agr* (*accessory gene regulator*), que controla a expressão de toxinas e enzimas essenciais à patogénese e influencia a resposta da bactéria a condições adversas, como a presença de antibióticos, afetando indiretamente a resistência antimicrobiana. Este gene é um alvo importante em estudos que procurem novas estratégias para combater infecções causadas por *S. aureus*¹⁴.

Este cenário desafiador impulsiona a necessidade de uma compreensão abrangente dos mecanismos de resistência do *S. aureus* e das estratégias para combatê-los. Assim, quais são os mecanismos de resistência do *S. aureus* aos antibióticos em infecções nosocomiais? Esta revisão tem como objetivo identificar estirpes e clones de MRSA associadas a infecções nosocomiais, principais resistências a antibióticos e fatores de virulência associados.

Métodos

Esta revisão sistemática foi efetuada tendo em conta as *guidelines* de 2020 definidas através do protocolo PRISMA (*Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta Analyses*)¹⁵.

Durante o processo de elaboração da revisão sistemática, a pesquisa e a análise dos artigos selecionados, bem como a sua extração de dados, foram realizadas de forma independente por três investigadores, contribuindo para uma diminuição do enviesamento.

Estratégia de pesquisa e critérios de inclusão e exclusão

As bases de dados consultadas para a pesquisa de artigos científicos foram a PubMed e a ScienceDirect. Em ambas foi utilizada a chave de pesquisa [(*Resistant Genes*) AND (AMR) AND (*nosocomial bacteria*) AND (*hospital bacteria*) AND (*human bacteria infection*) AND (*aureus*)]. Foi ainda utilizado o *website* Elicit, uma ferramenta de inteligência artificial que tem como objetivo agilizar o processo de pesquisa, permitindo identificar os artigos mais relevantes que integram a plataforma *Semantic Scholar*, demonstrando informações básicas dos artigos selecionados com a possibilidade de filtrar os resultados¹⁶. Desta forma, foi aplicado o filtro *full text*, tal como executado anteriormente em motores de pesquisa.

Aos artigos científicos recuperados através da estratégia de pesquisa utilizada foram aplicados critérios de inclusão e exclusão, que podem ser consultados na Tabela 1.

Tabela 1. Critérios de inclusão e exclusão aplicados em motores e *websites* de pesquisa para seleção de artigos adequados ao tema em estudo

Critérios de Inclusão	Critérios de Exclusão
Artigos científicos originais	Estudos de revisão sistemática
Artigos disponíveis para consulta com <i>free full text</i>	Artigos indisponíveis e sem <i>free full text</i>
Artigos publicados entre janeiro/2016 e agosto/2024	Artigos publicados antes de janeiro/2016
Artigos publicados na língua inglesa	Artigos publicados em outras línguas que não a língua inglesa
Artigos sobre o tema onde o estudo é realizado com amostras biológicas de pacientes recolhidas em ambiente hospitalar	Artigos fora do tema, direcionados a outros tipos de bactérias e fungos, realizados em animais e fora do meio hospitalar

Seleção dos artigos e informação extraída

Para a triagem e seleção dos artigos recorreu-se à ferramenta *Rayyan*, realizada por três investigadores de forma faseada em três etapas: uma triagem inicial, que consistiu na identificação e exclusão de artigos duplicados; de seguida, uma triagem dos títulos e resumos tendo em conta os critérios de exclusão; e, por fim, uma revisão final que teve em consideração tanto os critérios de exclusão como os parâmetros de avaliação da qualidade dos artigos, conforme definido na secção “Avaliação da Qualidade”. Os dados foram extraídos por três investigadores para uma tabela no *Microsoft Excel*.

Avaliação da qualidade dos artigos

A avaliação da qualidade dos artigos é importante na seleção e avaliação dos estudos a serem incluídos numa análise. Ferramentas e diretrizes desenvolvidas por instituições como o JBI (*Joanna Briggs Institute*) são adequadas para esta finalidade.

A avaliação dos estudos foi assegurada pela ferramenta *Joanna Briggs Checklist*, desenvolvida pelo JBI. Esta lista de carácter valorativo foi desenvolvida para uma avaliação crítica, permitindo uma abordagem sistemática. Adicionalmente, uma vez que esta avaliação com *checklist* é baseada no tipo de estudo, foi necessário considerar o tipo do estudo apresentado¹⁷.

A avaliação consiste numa *checklist* de onze perguntas para os três artigos de estudo coorte e uma lista de oito perguntas para o estudo transversal, sendo estas respondidas com Sim, Não, Incerto ou Não Aplicável e os resultados finais assegurados pela equipa da revisão sistemática¹⁷ (cf. Anexo 1).

Resultados

Os artigos foram selecionados de acordo com o fluxograma apresentado na Figura 1. Como mencionado anteriormente, a chave de pesquisa foi utilizada em duas bases de dados para pesquisa dos estudos – PubMed e ScienceDirect –, obtendo-se um total de 444 estudos. A maioria dos estudos encontram-se na base ScienceDirect e os restantes na PubMed, respetivamente, 435 e nove estudos.

Posteriormente os resultados foram filtrados, de acordo com a data de publicação (entre janeiro/2016 e agosto/2024), artigos publicados na língua inglesa e artigos com *free full text*. Adicionalmente, na base ScienceDirect também foi possível filtrar estudos da categoria *research article*, bem como *open access and article*. Assim, perante estes critérios de exclusão foram removidos 360 estudos da pesquisa inicial. Além disso, foram detetados dois estudos duplicados, um em cada base de dados utilizada; logo, um dos estudos foi removido, perfazendo um total de 361 estudos removidos antes da triagem.

Realizou-se uma triagem de 83 estudos com o auxílio da plataforma *Rayyan*, através da leitura dos títulos e resumos. Neste processo foram excluídos 79 estudos por vários motivos: cinco estudos apresentavam animais como a população em estudo; um estudo consistia numa revisão sistemática; 26 apresentavam como objeto de estudo outras bactérias e fungos; cinco estudos não analisaram amostras biológicas, tendo, por exemplo, amostras de água e superfícies; dois estudos foram realizados fora do contexto hospitalar; dez foram excluídos por dois ou mais motivos já apresentados; e 31 por se encontrarem fora do tema como, por exemplo, estudos terapêuticos, estudos com bacteriófagos e um estudo relacionado com a infeção por SARS-CoV-2.

No final deste processo foi realizada a triagem de textos integrais dos restantes quatro estudos, sendo um deles excluído porque a maioria dos seus métodos focava-se na análise dos genomas utilizando várias plataformas de bioinformática. Assim, selecionou-se um total de três estudos.

Para além da pesquisa através das bases de dados foi também utilizado o *website* Elicit para pesquisar os estudos mais relevantes do tema, tendo sido identificado um estudo que foi igualmente incluído após a triagem de textos integrais, perfazendo um total de quatro estudos incluídos no tema da presente revisão sistemática.

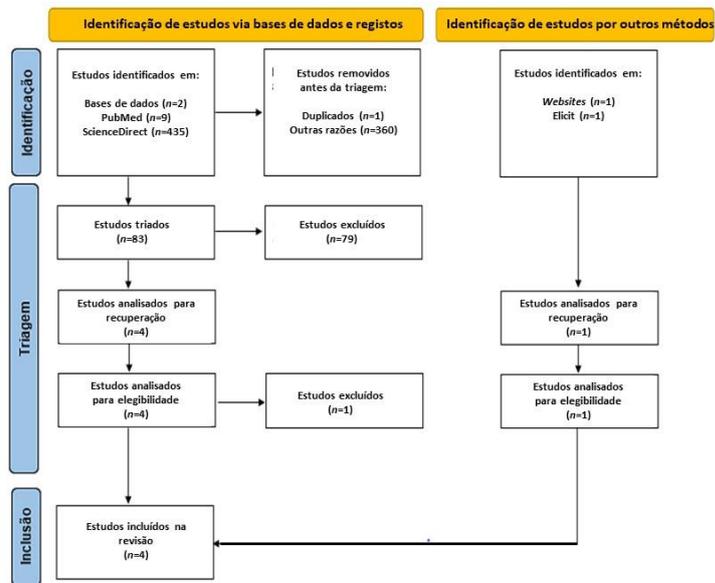


Figura 1. Fluxograma da metodologia para a seleção dos estudos¹⁵.

Informação extraída

Os quatro estudos foram realizados no continente asiático, mas em diferentes regiões: um foi conduzido nas Filipinas, dois na China, sendo o primeiro exclusivo da cidade de Shangai, e um no Irão¹⁸⁻²¹. A informação relevante dos estudos foi extraída e descrita na Tabela 2.

Tabela 2. Resumo da informação extraída dos quatro estudos incluídos na revisão sistemática

Título/Ano/Referência	Tipo de estudo	Participantes	Tipo de amostra	Objetivos	Métodos	Resultados
Genomic surveillance of methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> in the Philippines, 2013-2014 (2021) ¹⁸	Estudo coorte retrospectivo	Pacientes de 17 hospitais e centros médicos, entre janeiro/2013 a dezembro/2014	118 <i>S. aureus</i> obtidos de diferentes tipos de amostras (e.g., sangue, feridas, urina, etc.)	Compreender a epidemiologia genômica do MRSA nas Filipinas para auxiliar no controle de infecções por MRSA	Teste de sensibilidade a antibióticos (TSA); extração de DNA de MRSA para <i>whole-genome sequencing</i> (WGS); genotipagem multilocus (MLST); tipagens da <i>spa</i> e SCCmec; construção de relações filogenéticas	Todos os MRSA demonstraram resistência à penicilina, oxacilina e cefoxitina, consistente com a presença dos genes <i>blaZ</i> e <i>mecA</i> ; o MRSA mais prevalente foi CC30- <i>spa</i> -t019 SCCmec-IV; genes que codificam o PVL foram encontrados em 87,2% dos genomas, indicando que são PVL-positivos
Clinical and molecular characteristics of methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> in bone and joint infection among children (2023) ¹⁹	Estudo coorte retrospectivo	338 crianças admitidas no Children's Hospital of Fudan University em Shanghai, China, entre janeiro/2013 e dezembro/2022, com diagnóstico de infecções ósseas e articulares (BJI)	<i>S. aureus</i> obtidos de amostras de sangue	Investigar as características do MRSA em infecções ósseas e articulares (BJI) em crianças	TSA; MLST com genes <i>housekeeping</i> de <i>S. aureus</i> ; tipagem da <i>spa</i> ; amplificação e sequenciação dos genes de toxinas e resistência antibiótica (AMR)	O rácio de MRSA em BJI aumentou de 12,5% em 2013 para 44,4% em 2022; os MRSA demonstraram alta resistência a penicilina e oxacilina, eritromicina, clindamicina; como linhagens dominantes em BJI, ST59-t437 e ST22-t309 demonstraram alta resistência a eritromicina e clindamicina
Drivers of methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) lineage replacement in China (2021) ²⁰	Estudo coorte retrospectivo	Pacientes com infecções na corrente sanguínea (BSI), pneumonia hospitalar (HAP) e infecções intra-abdominais (IAI), de 31 hospitais em 14 províncias, entre 1994 e 2016	132 ST239 e 72 ST59 <i>S. aureus</i> de diferentes fluidos corporais (e.g., sangue, feridas, fluido abdominal, expectoração, etc.)	Comparar os genomas de ST59 e ST239 para entender a causa da substituição contínua de linhagens clonais de MRSA e suas potenciais consequências	WGS e MLST; histórias evolucionais de ST239 e ST59; determinação da capacidade de produzir biofilmes e da atividade citolítica; identificação dos genes de virulência; teste de competição <i>in vitro</i> em meio Mueller-Hinton	ST59 e ST239 tiveram 3 <i>major</i> sublinhagens; ST239 possuíam mais genes de virulência do que ST59; os clones ST59, apenas uma parte apresenta a citotoxina PVL; ST59 teve mais atividade citolítica <i>in vitro</i> e capacidade de produzir biofilmes ligeiramente aumentada

<p>Distribution of adhesion and toxin genes in <i>Staphylococcus aureus</i> strains recovered from hospitalized patients admitted to the ICU (2016)²¹</p>	<p>Estudo transversal</p>	<p>249 pacientes hospitalizados com 6 meses a 68 anos, admitidos nas ICUs de 7 hospitais, entre março e agosto/2015</p>	<p>70 <i>S. aureus</i> obtidos de diferentes tipos de amostras (e.g., sangue, feridas, orelha, pus, fluido corporal, cateter e urina)</p>	<p>Criar um perfil de genes de virulência de <i>S. aureus</i> em pacientes hospitalizados admitidos nas ICUs</p>	<p>TSA e confirmação do gene <i>mecA</i> por PCR em MRSA; extração de DNA para examinar a presença de genes de adesão e toxinas</p>	<p>Todos os MRSA com gene <i>mecA</i> foram fenotipados como resistentes a meticilina; maior incidência de infecções observada entre os 21 e 45 anos; gene mais encontrado foi o <i>spa</i> (100%)</p>
--	---------------------------	---	---	--	---	--

Online first

Nos quatro estudos analisados na presente revisão sistemática observou-se que a amostra mais analisada é o sangue, seguida por amostras de feridas avaliadas em dois estudos^{18,21}. Apenas um estudo demonstrou que as amostras de expetoração e fluído abdominal são as mais comuns, seguidas do sangue²⁰.

Relativamente aos métodos verificou-se que em todos os estudos foram efetuadas técnicas de cultura celular microbiana e de biologia molecular. Na maioria dos estudos foi realizada a confirmação de MRSA através do teste de sensibilidade a antibióticos (TSA), seguindo o método tradicional de difusão em disco pelo método de *Kirby-Bauer* e de forma automática utilizando o equipamento *VITEK 2 compact system da bioMérieux*^{18-19,21}.

Posteriormente efetuaram a extração e sequenciação de DNA para identificação e análise de vários genes. Um dos estudos examinou a presença de genes de adesão (*spa*, *can*, *bbp*, *ebp*, *fnbB*, *fnbA*, *clfB*, *clfA*) e de toxinas (*etb*, *eta*, *pvl*, *tst*), apresentando os *primers* utilizados²¹. Outro estudo procedeu à genotipagem *Multilocus* (MLST) para os genes *arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi* e *yqiL*. Adicionalmente foi efetuada a tipagem da *Staphylococcal protein A* (*spa*) e deteção dos genes de toxinas hemolíticas (*hla*, *hlb*, *hld*), enterotoxinas (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej*), toxinas esfoliativas (*eta* and *etb*), toxina do síndrome de choque tóxico (TSST-1), toxinas *tst* e *pvl*, bem como genes de resistência a antibióticos, como a meticilina (*mecA*), aminoglicosídeo (*aph(3'')/III* e *aac(6'')/aph(2'')*), eritromicina (*ermA*, *ermB* and *ermC*) e tetraciclina *tetM*¹⁹.

O estudo de *Masim et al.* (2021), realizado nas Filipinas, realizou a sequenciação de todo o genoma (WGS), efetuando a análise bioinformática apenas com os DNA de alta qualidade de *S. aureus*. Assim, foram identificados vários genes para além dos anteriormente mencionados, o que permitiu a construção de árvores filogenéticas baseadas na semelhança genética e previsões do genótipo de resistência pertencentes ao complexo clonal 30¹⁸. À semelhança deste estudo, o estudo de *Chen et al.* (2021) também realizou a sequenciação de todo o genoma e estabeleceu relações filogenéticas para as linhagens ST239 e ST59²⁰. Apresentou igualmente a análise da aquisição de resistência à meticilina através da localização do *SCCmec*, teste de formação de biofilme e lise de eritrócitos em microplaca a 570 nm e 540 nm, respetivamente, sendo que através dos resultados da lise identificaram genes associados ao potencial de virulência em ST59. Além disso, analisaram a inativação do gene *chp* em mutantes de *S. aureus* ST59, seguidas do teste de crescimento e, por último, o teste de competição *in vitro* entre as linhagens com meio MH e rifampicina²⁰.

Discussão

A crescente prevalência e complexidade da resistência antimicrobiana no *S. aureus*, particularmente no *S. aureus* resistente à metilina (MRSA), continua a ser um significativo desafio de saúde pública em todo o mundo. Estudos recentes possibilitaram a aquisição de informação sobre a diversidade genética, mecanismos de resistência e a dinâmica evolutiva do *S. aureus*, refletindo tanto a persistência quanto a adaptabilidade deste patógeno.

Estirpes mais prevalentes

Ao longo do tempo surgiram vários clones de MRSA em todo o mundo, sendo os mais prevalentes agrupados em *clonal complexes* (CC), conforme definido pelo *multilocus sequence typing* (MLST). As técnicas tradicionais de tipagem molecular para MRSA, como o *staphylococcal cassette chromosome mec typing* e o *spa typing*, também fornecem uma nomenclatura para descrever linhagens relevantes²².

Os resultados obtidos em três dos quatro estudos analisados revelaram um grau considerável de diversidade genética, caracterizada pela presença de múltiplos CCs e *sequence types* (ST) em diferentes locais do mundo, com particular ênfase nas Filipinas e na China. O estudo realizado nas Filipinas revelou que a maioria dos isolados de MRSA (74,1%) pertencia ao complexo CC30, distribuídos principalmente entre o subtipo ST30 e a sua variante de *locus* único ST1456. Existem mais de 100 CCs do *S. aureus*, sendo a estirpe CC30 uma das linhagens mais prevalentes na Europa, associada tanto a infecções comunitárias quanto nosocomiais, com destaque para sua presença significativa em países como o Reino Unido e a Alemanha²². Estudos realizados anteriormente demonstram também a prevalência desta estirpe no continente sul americano, com dados que indicam que é uma das três linhagens mais frequentemente isoladas em adultos hospitalizados²³. Desta forma, a ocorrência deste clone nas Filipinas vem reforçar ainda mais a evidência da disseminação global do MRSA. Esta disseminação global destaca a interconexão epidemiológica do MRSA e a necessidade de esforços internacionais coordenados para monitorizar e controlar a disseminação de linhagens resistentes. Ainda, no estudo realizado nas Filipinas 68% das infecções foram identificadas como associadas à comunidade. De facto, o subtipo ST30, pertencente ao CC30, representa uma das linhagens mais frequentemente isoladas entre as estirpes de MRSA adquirido na comunidade, tendo sido isolado repetidamente em todos os continentes²⁴.

Por outro lado, os estudos realizados na China concentraram-se principalmente nos dois clones ST239 e ST59, reconhecidos mundialmente. Um dos estudos efetuou uma caracterização molecular das estirpes de MRSA, com foco nas infecções do osso e articulação em crianças, tendo o clone ST59 sido o mais prevalente entre as amostras sequenciadas (43,9%).

O outro estudo realizado na China procurou investigar a causa da substituição da linhagem clonal ST239 pela linhagem clonal ST59. A análise filogenética destas linhagens revelou uma diversidade significativa dentro de cada ST e a presença de múltiplas sublinhagens em cada tipo. Para o ST59 foram identificadas três sublinhagens filogenéticas distintas (ST59-A, ST59-B e ST59-C), com uma correspondência aproximada a diferentes tipos específicos de *Aureus-specific staphylococcal protein (spa)*. De forma semelhante, o ST239 foi dividido em três sublinhagens (ST239-A, ST239-B e ST239-C), com alguma variação na atribuição dos diferentes tipos de *spa*. O contexto global fornecido por este estudo indicou que a diversidade observada nos isolados chineses reflete a população global de MRSA. Entre os clones primários mais prevalentes no mundo encontram-se o CC5 e o CC8, dentro dos quais o ST239 e o ST59, respetivamente, são os clones mais prevalentes em infeções nosocomiais causadas por MRSA. Além disso, estudos realizados anteriormente demonstram que ST59 e ST239 são os principais perfis genotípicos de MRSA que causam infeções em humanos na região sudoeste da China, indo ao encontro do refletido no estudo²⁵.

Resistência a antibióticos

Os estudos analisados na presente revisão sistemática da literatura enfatizam também a natureza complexa da resistência aos antibióticos no *S. aureus*, impulsionada pela aquisição e disseminação de múltiplos genes de resistência.

No estudo que decorreu nas Filipinas, todos os isolados de MRSA testados foram identificados como resistentes à penicilina, oxacilina e cefoxitina, consistentes com a presença dos genes *blaZ* e *mecA*. Além disso, um subconjunto de isolados exibiu multirresistência, carregando genes que conferem resistência a uma variedade de antibióticos, incluindo gentamicina, eritromicina, clindamicina, tetraciclina, entre outros. O alto nível de concordância entre a resistência fenotípica e a presença de genes de resistência (>98% para a maioria dos antibióticos) salienta a confiabilidade das predições genómicas na compreensão do perfil de resistência a antimicrobianos do MRSA.

No estudo realizado na China, a análise genómica comparativa entre os isolados ST239 e ST59 revelou que os isolados ST239 transportam, em média, significativamente mais genes de resistência a antibióticos do que os isolados ST59 (10,3 vs 6,3 genes). Esta maior carga de genética de resistência a antibióticos no ST239 pode ter contribuído para a sua prevalência histórica em ambientes hospitalares. No entanto, observou-se uma tendência de declínio no transporte destes genes durante o período de vigilância de 22 anos, particularmente na sublinhagem ST239-A. Em contraste, a presença de genes de resistência a antibióticos na linhagem clonal ST59 permaneceu estável ao longo do tempo. Esta tendência destaca a natureza

dinâmica da resistência a antibióticos, sugerindo que existem diferentes pressões evolutivas a atuar nestas linhagens. Assim, certas linhagens podem perder genes de resistência ao longo do tempo, potencialmente devido à redução da pressão seletiva ou dos custos de adaptação associados à manutenção destes genes. Este facto é corroborado por estudos realizados anteriormente e que demonstram a relação entre a pressão seletiva e a perda de genes de resistência a antibióticos no *S. aureus*. Um estudo de 2011, conduzido por Gullberg *et al.*, mostrou que a redução da pressão dos antibióticos levou à perda de genes de resistência, pois mantê-los impõe um custo metabólico e de adaptação às bactérias²⁶. Adicionalmente, Lee *et al.* (2018) demonstraram que a exposição a níveis de antibióticos ao longo do tempo resultou na perda de genes de resistência à meticilina, permitindo que estirpes mais suscetíveis dominassem²⁷. Ambos os estudos destacam que a redução do uso indiscriminado de antibióticos pode promover o surgimento de linhagens bacterianas suscetíveis.

No estudo realizado na China, focado nas infeções do osso e articulação em crianças, à semelhança do estudo conduzido nas Filipinas, todas as estirpes de MRSA apresentavam o gene *mecA* sendo resistentes à penicilina e à oxacilina. De uma forma geral, as linhagens de MRSA apresentavam uma prevalência maior de determinados genes de resistência, particularmente aqueles que conferem resistência a aminoglicosídeos e a eritromicina. A resistência à eritromicina e clindamicina foi identificada frequentemente, com variabilidade nos padrões de resistência dependendo do genótipo. As linhagens predominantes em infeções do osso e articulação, ST59-t437 e ST22-t309, apresentaram resistência muito alta a eritromicina e clindamicina, indicando que os macrolídeos já não são adequados para o tratamento de infeções por MRSA em pacientes com este tipo de infeção. Por outro lado, todos os isolados foram suscetíveis à vancomicina e linezolida, indicando que estes antibióticos continuam a ser opções de tratamento eficazes.

Por fim, e indo ao encontro dos resultados referidos anteriormente, o estudo no Irão detalhou os padrões de resistência do *S. aureus*, com todos os isolados a demonstrar suscetibilidade à linezolida, teicoplanina e vancomicina. As maiores taxas de resistência foram observadas contra ampicilina e penicilina (97,1%), seguidas por ciprofloxacina (71,4%), amicacina (64,3%), gentamicina (60,0%) e clindamicina (60,0%). Notavelmente, 71,4% dos isolados foram classificados como multirresistentes, com uma proporção significativa derivada de amostras de sangue e feridas, reforçando a correlação entre resistência e origem clínica.

De facto, os padrões de resistência a antibióticos obtidos nos estudos selecionados são corroborados por estudos realizados anteriormente. O MRSA é um grande desafio de saúde global, com uma proporção significativa de estirpes de *S. aureus* exibindo resistência à meticilina. Estudos de várias regiões relatam que entre 25% e mais de 70% dos isolados de *S. aureus*,

particularmente aqueles de ambientes hospitalares, são resistentes à meticilina. No entanto, apesar da resistência generalizada à meticilina, a maioria das estirpes de *S. aureus* permanecem suscetíveis à vancomicina. Dados de vigilância da OMS, dos Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) e vários estudos na Europa, Ásia e África mostram consistentemente que as taxas de suscetibilidade à vancomicina excedem geralmente 95%, sendo os casos de resistência à vancomicina extremamente raros²⁸⁻³⁰. A vancomicina continua a ser um tratamento essencial para infecções por MRSA, particularmente em ambientes de saúde onde o risco de encontrar estirpes resistentes é maior. Esta eficácia sustentada destaca o papel crítico da vancomicina na gestão do MRSA, enquanto enfatiza a necessidade de vigilância contínua, uso responsável de antibióticos e pesquisa de tratamentos alternativos para manter a sua eficácia diante da resistência emergente.

Fatores de virulência

Além da resistência a antimicrobianos, o potencial de virulência do *S. aureus* é um fator crítico que influencia o seu impacto clínico. Estudos mostraram que certos clones, como o CC30, estão associados a maior virulência, muitas vezes ligados à presença dos genes da leucocidina de *Panton-Valentine* (PVL)³¹⁻³². O estudo nas Filipinas conclui que a maioria dos genomas CC30 eram positivos para PVL, com 87,2% deles carregando os genes *lukS-PV* e *lukF-PV*, um fator chave de virulência que tem sido associado a infecções graves, particularmente em ambientes comunitários.

Apesar de carregarem, em média, menos genes de virulência, os isolados ST59 demonstraram maior atividade citolítica *in vitro* em comparação com as linhagens ST239, sugerindo que o número de genes de virulência pode não ser o único determinante do potencial patogênico. Este resultado enfatiza a complexidade de prever a virulência com base apenas em dados genômicos e destaca a necessidade de avaliações fenotípicas abrangentes para entender completamente as implicações clínicas de diferentes estirpes de MRSA.

O estudo chinês concluiu que a linhagem clonal ST59, em expansão, era muito mais virulenta do que a ST239 anteriormente difundida. Assim, os autores colocam a hipótese de que a substituição contínua de linhagens observada em hospitais chineses é impulsionada principalmente por diferenças na virulência de diferentes linhagens de MRSA, o que pode ser explicado em parte pelo transporte do gene *chp* pela linhagem clonal ST59.

O estudo realizado no Irão forneceu uma caracterização detalhada dos perfis de genes de virulência. Todos os isolados continham, pelo menos, dois genes de virulência, estando o gene *spa* presente em todos os isolados e sendo o gene *etb* o menos comum (2,9%). A presença de genes codificadores de PVL foi observada em 21,4% dos isolados, predominantemente de

amostras de sangue (66,7%), o que sugere uma associação entre a presença de *pvl* e infecções invasivas.

A presente revisão sistemática utiliza uma abordagem robusta, aumentando a confiabilidade dos resultados ao incluir estudos com métodos fenotípicos e genotípicos, validando os mecanismos de resistência e minimizando erros. O foco em isolados invasivos reforça a relevância clínica e de saúde pública.

O uso da técnica *Whole Genome Sequencing* (WGS) destaca-se como um ponto forte, oferecendo alta resolução na identificação de genes e mutações de resistência. A integração dos dados da WGS com análises epidemiológicas e filogenéticas aprimora a compreensão da evolução e disseminação da resistência antimicrobiana no *S. aureus*, identificando clones emergentes e as suas dinâmicas.

Conclusão

Os estudos analisados na presente revisão sistemática sugerem que as duas linhagens clonais ST239 e ST59 são das mais prevalentes mundialmente em infecções nosocomiais causadas por MRSA. A maioria dos estudos demonstrou que os isolados de MRSA foram identificados como resistentes à penicilina e oxacilina. Aminoglicosídeos, eritromicina e clindamicina foram alguns dos antibióticos que também apresentaram maiores taxas de resistência. Adicionalmente, os estudos mencionaram ainda alguns isolados classificados como multirresistentes, possuindo genes que conferem resistência a uma variedade de antibióticos. Os estudos que determinaram os fatores de virulência permitiram aferir que os isolados possuem genes de virulência, sendo os mais comuns o gene *spa*, *chp* e os genes codificadores de PVL, *lukS-PV* e *lukF-PV*, que têm sido associados a infecções graves e invasivas.

Além disso, verificou-se que a substituição da linhagem clonal prevalente ST239 pela ST59 na China deverá estar associada ao transporte dos genes de resistência a antibióticos em ST239, com a manutenção dos mesmos em ST59, bem como pelo transporte do gene *chp* em ST59 que aumenta a sua virulência e atividade citolítica. Concluindo, a forte prevalência, disseminação global e complexidade do MRSA provoca uma necessidade constante de esforços para monitorizar e controlar a disseminação destes clones.

Limitações e estudos futuros

A revisão sistemática apresenta limitações, como a variabilidade nos desenhos e metodologias dos estudos incluídos, o que pode introduzir heterogeneidade nos dados e dificultar a síntese dos resultados. Diferenças nos critérios de seleção de amostras, métodos de teste de suscetibilidade e antibióticos testados dificultam a comparabilidade dos resultados.

Além disso, variações geográficas e temporais entre os estudos podem causar inconsistências, especialmente em regiões ou períodos com menos dados, o que pode afetar a generalização das conclusões da revisão.

Estudos futuros devem priorizar a padronização de metodologias entre os estudos, o que aumentaria significativamente a comparabilidade dos resultados. A adoção de critérios consistentes para seleção de amostras, testes de sensibilidade a antibióticos e relatórios de dados permitiriam uma síntese mais confiável dos resultados.

Agradecimentos. As autoras agradecem o apoio institucional da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa (ESTeSL).

Contributo dos autores. Conceptualização, ER; metodologia, PR, JA e MC; software, PR, JA e MC; validação, ER; curadoria de dados, PR, JA e MC; redação do draft original, PR, JA e MC; redação, validação e edição do texto final, ER.

Referências bibliográficas

1. European Centre for Disease Prevention and Control. Healthcare-associated infections [homepage]. Stockholm: ECDC; 2023. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/healthcare-associated-infections>
2. Lemiech-Mirowska E, Kiersnowska ZM, Michałkiewicz M, Depta A, Marczak M. Nosocomial infections as one of the most important problems of healthcare system. *Ann Agric Environ Med.* 2021;28(3):361-6.
3. Tong SY, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG Jr. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin Microbiol Rev.* 2015;28(3):603-61.
4. Young BC, Wu CH, Charlesworth J, Earle S, Price JR, Gordon NC, et al. Antimicrobial resistance determinants are associated with *Staphylococcus aureus* bacteraemia and adaptation to the healthcare environment: a bacterial genome-wide association study. *Microb Genom.* 2021;7(11):000700.
5. Centers for Disease Control and Prevention. *Staphylococcus aureus* basics [homepage]. Atlanta: CDC; 2024 Apr 15. Available from: <https://www.cdc.gov/staphylococcus-aureus/about/index.html>
6. Jarraud S, Mougel C, Thioulouse J, Lina G, Meugnier H, Forey F, et al. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease. *Infect Immun.* 2002;70(2):631-41.

7. Ubukata K, Nonoguchi R, Matsuhashi M, Konno M. Expression and inducibility in *Staphylococcus aureus* of the *mecA* gene, which encodes a methicillin-resistant *S. aureus*-specific penicillin-binding protein. *J Bacteriol.* 1989;171(5):2882-5.
8. Lyon BR, Skurray R. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*: genetic basis. *Microbiol Rev.* 1987;51(1):88-134.
9. Otarigho B, Falade MO. Analysis of antibiotics resistant genes in different strains of *Staphylococcus aureus*. *Bioinformatics.* 2018;14(3):113-22.
10. Fu P, Nijati Y, Li T, Wu X, Wang Z, Zhou J, et al. Clinical and molecular characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in bone and joint infection among children. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2023;22(1):104.
11. Javidnia S, Talebi M, Saifi M, Katouli M, Rastegar Lari A, Pourshafie MR. Clonal dissemination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in patients and the hospital environment. *Int J Infect Dis.* 2013;17(9):e691-5.
12. Falugi F, Kim HK, Missiakas DM, Schneewind O. Role of protein A in the evasion of host adaptive immune responses by *Staphylococcus aureus*. *mBio.* 2013;4(5):e00575-13.
13. Otto M. Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. *Annu Rev Med.* 2013;64:175-88.
14. Bronner S, Monteil H, Prévost G. Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*: complexity and applications. *FEMS Microbiol Rev.* 2004;28(2):183-200.
15. Page MJ, McKenzie JE, Bossuyt PM, Boutron I, Hoffmann TC, Mulrow CD, et al. The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. *BMJ.* 2021;372:n71.
16. Elicit. Analyze research papers at superhuman speed [homepage]. elicit.com. Available from: <https://elicit.com/welcome>
17. Barker TH, Stone JC, Sears K, Klugar M, Leonardi-Bee J, Tufanaru C, et al. Revising the JBI quantitative critical appraisal tools to improve their applicability: an overview of methods and the development process. *JBI Evid Synth.* 2023;21(3):478-93.
18. Masim ML, Argimón S, Espiritu HO, Magbanua MA, Lagrada ML, Olorosa AM, et al. Genomic surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the Philippines, 2013-2014. *Western Pac Surveill Response J.* 2021;12(1):6-16.
19. Fu P, Nijati Y, Li T, Wu X, Wang Z, Zhou J, et al. Clinical and molecular characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in bone and joint infection among children. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2023;22(1):104.

20. Chen H, Yin Y, van Dorp L, Shaw LP, Gao H, Acman M, et al. Drivers of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) lineage replacement in China. *Genome Med.* 2021;13(1):171.
21. Eftekhari F, Rezaee R, Azad M, Azimi H, Goudarzi H, Goudarzi M. Distribution of adhesion and toxin genes in *Staphylococcus aureus* strains recovered from hospitalized patients admitted to the ICU. *Arch Pediatr Infect Dis.* 2016;5(1):e39349.
22. Monecke S, Coombs G, Shore AC, Coleman DC, Akpaka P, Borg M, et al. A field guide to pandemic, epidemic and sporadic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS One.* 2011;6(4):e17936.
23. Di Gregorio S, Haim MS, Vallenilla JV, Cohen V, Rago L, Gulone L, et al. Genomic Epidemiology of CC30 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from Argentina reveals four major clades with distinctive genetic features. *mSphere.* 2021;6(2):e01297-20.
24. Fernandez S, Murzicato S, Sandoval O, Fernández-Canigia L, Mollerach M. Community-acquired necrotizing pneumonia caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST30-SCCmecIVc-spat019-PVL positive in San Antonio de Areco, Argentina. *Rev Argent Microbiol.* 2015;47(1):50-3.
25. Liao F, Gu W, Fu X, Yuan B, Zhang Y. Comparison of virulence-related determinants between the ST59-t437 and ST239-t030 genotypes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiol.* 2021;21(1):264.
26. Sandegren L. Selection of antibiotic resistance at very low antibiotic concentrations. *Ups J Med Sci.* 2014;119(2):103-7.
27. Lakhundi S, Zhang K. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: molecular characterization, evolution, and epidemiology. *Clin Microbiol Rev.* 2018;31(4):e00020-18.
28. World Health Organization. Global antimicrobial resistance surveillance system (GLASS) [homepage]. Geneva: WHO; 2018. Available from: <https://www.who.int/initiatives/glass>
29. Centers for Disease Control and Prevention. Antibiotic resistance threats in the United States [homepage]. Atlanta: CDC; 2019. Available from: <https://www.cdc.gov/antimicrobial-resistance/data-research/threats/index.html>
30. European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance atlas of infectious diseases [homepage]. Stockholm: ECDC; 2023 Apr 28. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/surveillance-atlas-infectious-diseases>

31. Olya ZN, Najar-Peerayeh S, Yadegar A, Bakhshi B. Clonal diversity and genomic characterization of Panton-valentine Leukocidin (PVL)-positive *Staphylococcus aureus* in Tehran, Iran. *BMC Infect Dis.* 2021;21(1):372.
32. Rahmani Z, Hosseini SS, Bagheri P, Dadashi M, Haghghi M, Goudarzi M. Phenotypic and genotypic characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from otitis externa: emergence of CC30-spa t019-SCCmec IV carrying PVL as major genotype. *Heliyon.* 2024;10(11):e32002.

Artigo recebido em 23.09.2024 e aprovado em 24.03.2025

Conflito de interesses

Os autores declaram não possuir quaisquer conflitos de interesse.

Online first

Anexo I – Joanna Briggs Checklists

Tabela 3. Tabela de avaliação da qualidade relativa aos 3 artigos de estudos coorte

JBIC Critical Appraisal Checklist for Cohort Studies	[18]	[19]	[20]
1. Were the two groups similar and recruited from the same population?	NA	Sim	NA
2. Were the exposures measured similarly to assign people to both exposed and unexposed groups?	NA	Sim	NA
3. Was the exposure measured in a valid and reliable way?	Sim	Sim	Sim
4. Were confounding factors identified?	Não	Não	Não
5. Were strategies to deal with confounding factors stated?	Não	Não	Não
6. Were the groups/participants free of the outcome at the start of the study (or at the moment of exposure)?	NA	NA	NA
7. Were the outcomes measured in a valid and reliable way?	Sim	Sim	Sim
8. Was the follow up time reported and sufficient to be long enough for outcomes to occur?	NA	NA	NA
9. Was follow up complete, and if not, were the reasons to loss to follow up described and explored?	NA	NA	NA
10. Were strategies to address incomplete follow up utilized?	NA	NA	NA
11. Was appropriate statistical analysis used?	Sim	Sim	Sim

Fonte: Joanna Briggs Institute (JBI). JBI critical appraisal checklist for cohort studies. JBI; 2020. Available from:

<https://jbi.global/critical-appraisal-tools>

Legenda: NA = Não se aplica.

Tabela 4. Tabela de avaliação da qualidade relativa ao artigo de estudo transversal

JBIC Critical Appraisal Checklist for Analytical Cross-Sectional Studies	[21]
1. Were the criteria for inclusion in the sample clearly defined?	Sim
2. Were the study subjects and the setting described in detail?	Sim
3. Was the exposure measured in a valid and reliable way?	Sim
4. Were objective, standard criteria used for measurement of the condition?	Sim
5. Were confounding factors identified?	Não
6. Were strategies to deal with confounding factors stated?	Não
7. Were the outcomes measured in a valid and reliable way?	Sim
8. Was appropriate statistical analysis used?	Sim

Fonte: Joanna Briggs Institute (JBI). JBI critical appraisal checklist for analytical cross-sectional studies. JBI; 2020. Available from:

<https://jbi.global/critical-appraisal-tools>