

Letícia Zenatti¹, Geovanna Vieira da Silva², Andrei Nicoli Gebieluca Dabul¹, Ilana Lopes Baratella da Cunha Camargo¹

¹Instituto de Física de São Carlos, USP; ²Universidade Paulista, UNIP

Introdução

A resistência bacteriana é considerada uma ameaça à saúde global, além de envolver altos custos financeiros. *Staphylococcus aureus* são bactérias comumente encontradas na microbiota humana, no entanto são patógenos oportunistas responsáveis por infecções recorrentes na comunidade e no ambiente hospitalar⁽¹⁾. O tratamento de tais infecções, muitas vezes, torna-se um obstáculo devido a interações medicamentosas, problemas de toxicidade dos fármacos disponíveis no mercado e devido aos mecanismos de resistência. Linezolida e tedizolida são antimicrobianos da classe das oxazolidinonas, fármacos de última escolha aprovados no Brasil pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em junho de 2000 e dezembro de 2017, respectivamente, cujo mecanismo de ação ocorre através da inibição da síntese proteica⁽²⁾.

Objetivos

O objetivo do presente projeto é verificar se após realizado processos de evolução dirigida com cada um destes fármacos em uma linhagem de *S. aureus* há:

- 1) alteração da sensibilidade às oxazolidinonas e a outros antimicrobianos escolhidos e;
- 2) alteração da capacidade de formação de biofilme.

Materiais e Métodos

Evolução dirigida com linezolida e tedizolida⁽³⁾, em paralelo:

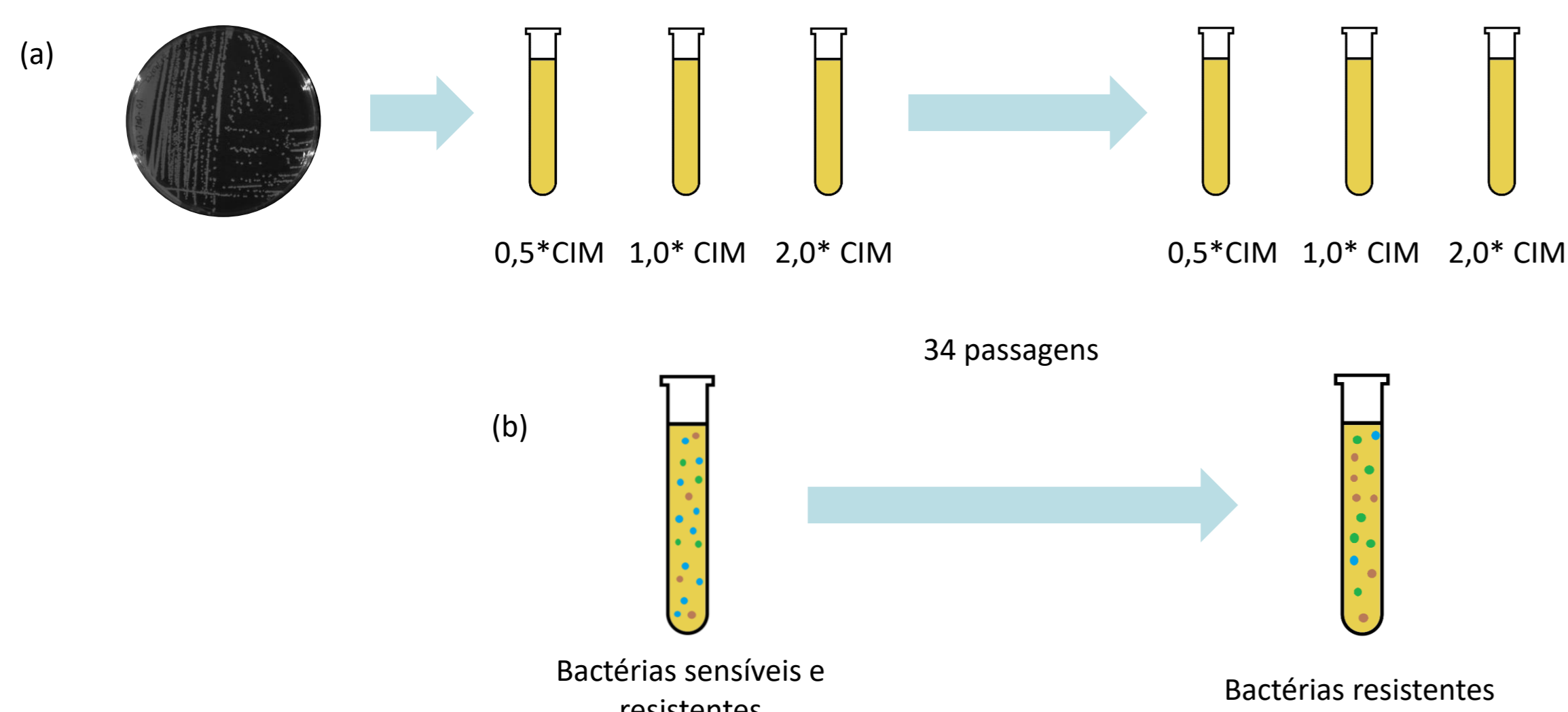


Figura 1: (a) Esquema da evolução dirigida experimental e (b) representação do resultado esperado

1) Antibiograma com disco difusão e MIC^(4,5)

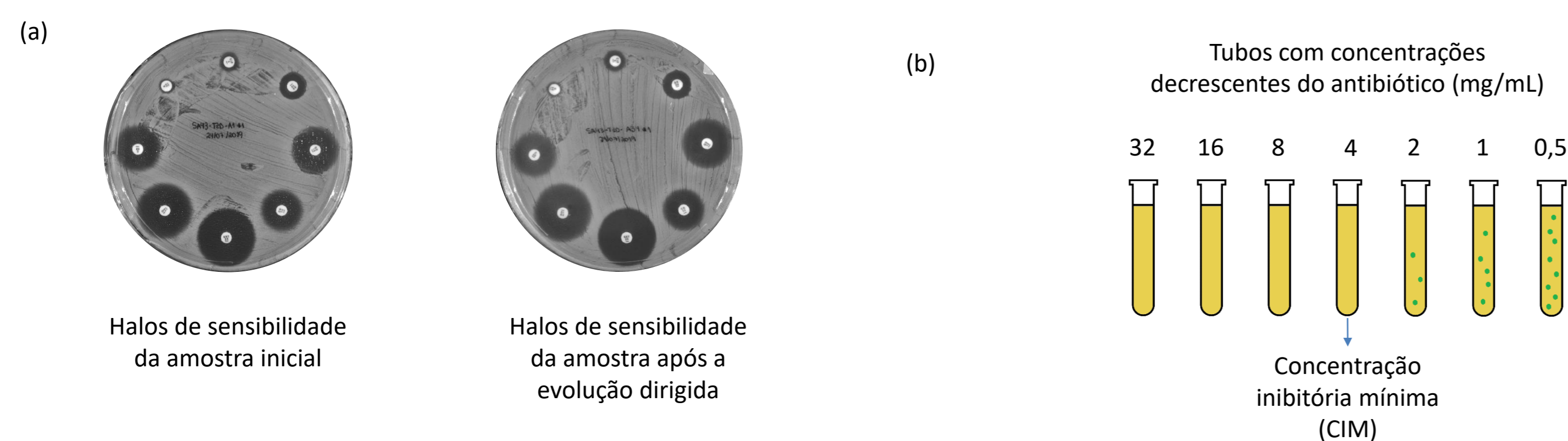


Figura 2: (a) Comparativo entre os halos de inibição das amostras na primeira e últimas passagens, para cada experimento e (b) experimento para determinação da concentração inibitória mínima por microdiluição em caldo.

Caso haja alteração de sensibilidade aos antimicrobianos testados, buscaremos por determinantes de resistência através de sequenciamento de genes codificantes das proteínas ribossomais L3, L4, L22 e do domínio V do 23S rRNA, descritos na literatura, para verificação de mutações. O material genético será extraído, os genes de interesse serão amplificados por PCR, purificados e sequenciados pelo método de Sanger.

2) A capacidade de formação de biofilme será acessada pelo teste qualitativo com cristal violeta⁽⁶⁾.

Resultados preliminares

As referências para sensíveis e resistentes, de acordo com o EUCAST versão 9.0, estão na tabela 1.

Antibiótico	Sensível	Intermediário	Resistente
Linezolida	≤ 4	-	≥ 8
Tedizolida	≤ 0,5	1	≥ 2

As CIMs obtidas ao longo da evolução, tanto para linezolida quanto para tedizolida, estão representadas abaixo.

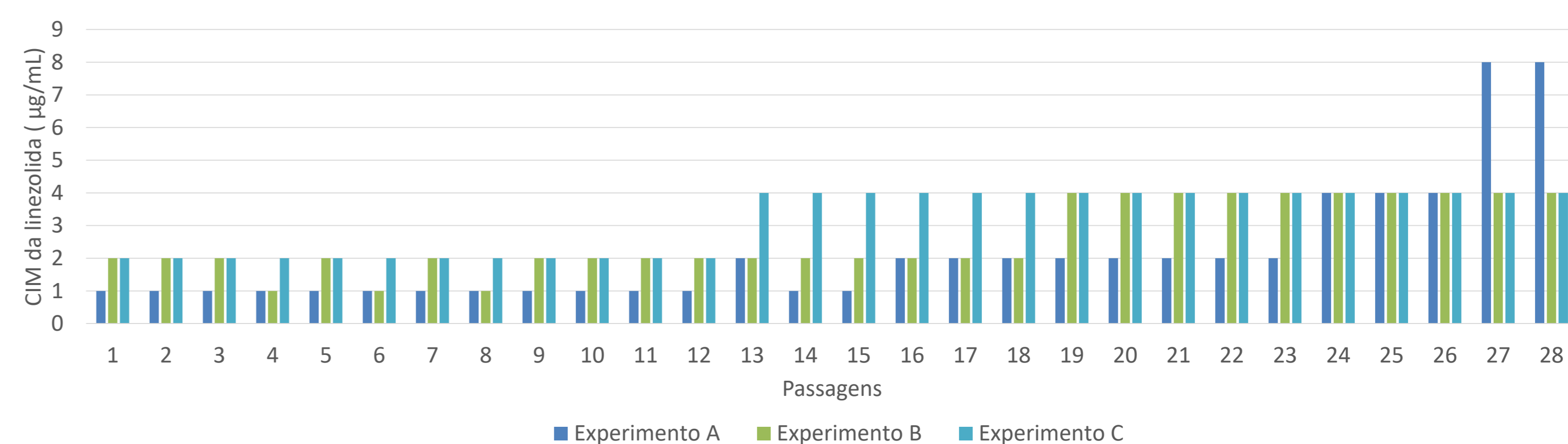


Figura 3: Concentrações inibitórias mínimas para linezolida após a evolução dirigida parcial com linezolida para os experimentos A, B e C.

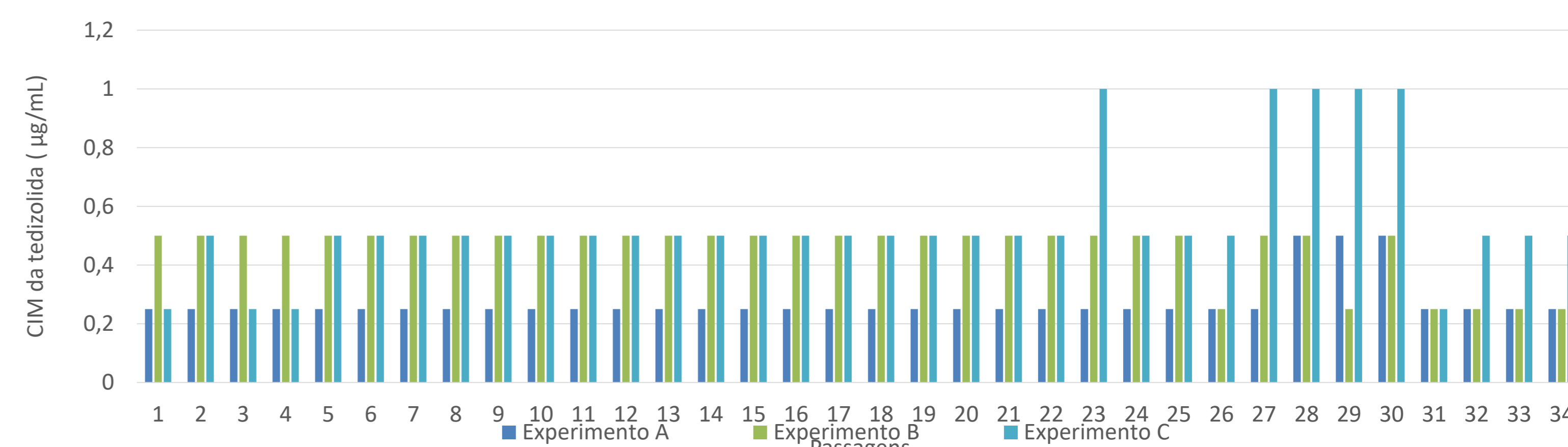


Figura 4: Concentrações inibitórias mínimas para tedizolida após a evolução dirigida com tedizolida para os experimentos A, B e C.

Foram realizados testes de sensibilidade por disco difusão com as linhagens da evolução dirigida com tedizolida:

Amostra	Largura média do diâmetro (mm)							
	Ácido fusídico	Amicacina	Ciprofloxacino	Cloranfenicol	Gentamicina	Kanamicina	Quinupristina/Dalfopristina	Sulfametoxazol/Trimetropim
SA43-TZD-A1	30,00 ± 1,04	15,17 ± 0,33	11,00 ± 0,87	24,00 ± 0,29	22,00 ± 0,50	8,17 ± 0,17	25,33 ± 0,60	31,75 ± 0,60
SA43-TZD-A34	32,67 ± 1,20	18,00 ± 2,26	11,83 ± 0,60	25,17 ± 2,05	22,30 ± 0,73	8,33 ± 0,33	26,50 ± 1,16	32,25 ± 1,59
SA43-TZD-B1	30,17 ± 0,17	15,33 ± 0,44	11,83 ± 0,17	24,67 ± 0,73	22,17 ± 0,73	8,50 ± 0,50	25,67 ± 0,67	31,50 ± 0,87
SA43-TZD-B34	33,00 ± 0,76	15,00 ± 0,29	11,67 ± 0,67	26,17 ± 0,60	24,50 ± 0,76	7,83 ± 0,44	27,33 ± 1,09	33,25 ± 0,60
SA43-TZD-C1	33,00 ± 0,29	15,50 ± 0,29	12,00 ± 0,50	24,67 ± 1,43	21,17 ± 0,73	8,17 ± 0,44	25,33 ± 0,60	31,25 ± 0,50
SA43-TZD-C34	35,83 ± 0,83	16,00 ± 0,29	10,50 ± 0,00	25,33 ± 0,88	24,67 ± 0,44	8,17 ± 0,17	24,33 ± 0,60	33,00 ± 0,88

Figura 5: Largura média do diâmetro dos halos de sensibilidade para alguns antibióticos não apresentam alterações entre as amostras no primeiro e último dia da evolução dirigida com tedizolida.

Perspectivas e conclusões

A evolução dirigida com linezolida, apesar de ainda não finalizada já apresenta duas amostras com fenótipo de resistência à linezolida. Com relação à tedizolida, não foram observados isolados resistentes. No entanto, houve um aumento significativo da CIM para tedizolida. Testes com disco difusão com parte dos antibióticos propostos indicam que a exposição à tedizolida não alterou a sua sensibilidade nem mesmo a de outros fármacos.

Bibliografia

⁽¹⁾ HOWARD, S. J.; HOPWOOD, S.; DAVIES, S.C. Antimicrobial resistance: a global challenge. *Science Translational Medicine*, v.6, n. 236,p.1-2, 2014. doi:10.1126/scitranslmed.3009315. ⁽²⁾ LOCKE, J.B.; ZURENKO, G.E.; SHAW, K.J.; BARTIZAL, J. K Tedizolid for the management of human infections: in vitro characteristics. *Clinical Infections Diseases*.v.58, supl.1, p.35-42., 2014. doi:10.1093/cid/cit616. ⁽³⁾ DABUL, A. N. G. et al. Resistance in In vitro selected Tigecycline-resistant Methicillin-resistant staphylococcus aureus sequence type 5 is driven by mutations in mepR and mepA genes. *Microbial Drug Resistance*, v. 24,n. 5,p.519-527, 2018. doi:10.1089/mdr.2017.0279. ⁽⁴⁾ The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 9.0, 2019. <http://www.eucast.org>. ⁽⁵⁾ Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 27th ed. CLSI supplement M100, 2017. ⁽⁶⁾ TENDOLKAR, P. M.; BAGHDAYAN, A. S.; GILMORE, M. S.; SHANKAR, N.; Enterococcal Surface Protein, *Esp*, Enhances Biofilm Formation by *Enterococcus faecalis*. *American Society for Microbiology Infection and Immunity*, Vol. 72, No. 10 0019-9567/04/\$08.000, p. 6032–6039, 2004, doi: 10.1128/IAI.72.10.6032–6039.2004.