

**ALEXANDRE WALTER ROSA**

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E TIPAGEM MOLECULAR DE MRSA  
ISOLADOS NA UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA DO HOSPITAL DE  
CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Setores de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.  
Orientador: Dra. Libera Maria DallaCosta.

**CURITIBA**

**2009**

Aos meus pais, irmãos e namorada,  
que com carinho compreenderam  
minha ausência sempre  
com entusiasmo e otimismo.

## AGRADECIMENTOS

Ao colegiado do programa de Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, na pessoa da Dra. Vanete e Dr. Ederaldo, por permitirem a ampliação do prazo para defesa desta dissertação;

À minha orientadora Dra. Libera pelo empenho, paciência e confiança depositados ao longo de todo o período de trabalho;

A participação fundamental do Roberto, contribuindo na realização de todos os experimentos deste projeto e a equipe do Serviço de Bacteriologia do HC-UFPR que, direta ou indiretamente, contribuíram para a conclusão deste trabalho;

Ao grupo da Central de Soluções: Jô, Olívia, Pedro, Acir e Paulo por não medirem esforços em ajudar e por permitir o uso da unidade, muitas vezes nos fins de semana;

Ao Beno por viabilizar minhas ausências com enorme compreensão. Ao Mário, à Andréa, ao Acir e à Cíntia por tornarem tais ausências possíveis;

Aos colegas de mestrado, Janaína, Larissa, Simone, Keite, Helena, Karina, Mara e demais amigos, pela disposição em debater e sugerir assuntos sempre pertinentes;

Aos meus irmãos André e Patrícia, meu cunhado Samuel, por favorecerem o crescimento com otimismo;

À minha esposa Laís por caminhar ao meu lado, sempre com carinho, entusiasmo e otimismo e à sua família por ser a extensão da minha casa;

Aos meus pais, pelo amor e orgulho incondicionais, transmitindo harmonia para a seqüência da minha caminhada.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
1.1. OBJETIVO GERAL	16
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>17</b>
2.1. HISTÓRICO	17
2.2. TAXONOMIA	18
2.3. PATOGÊNESE	18
2.4. RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS	18
2.4.1. Resistência aos Macrolídeos, Lincosamidas e Estreptograminas	19
2.4.2. Resistência aos Aminoglicosídeos	19
2.4.3. Resistência às Quinolonas	20
2.4.4. Resistência aos $\beta$ -lactâmicos	20
2.4.4.1. Testes Fenotípicos para Detecção de Resistência à oxacilina	24
2.4.5. Resistência aos Glicopeptídeos	28
2.4.5.1. <i>Staphylococcus aureus</i> Vancomicina-Intermediário – VISA	29
2.4.5.2. <i>Staphylococcus aureus</i> Vancomicina Resistente – VRSA	30
2.5. GENÉTICA DO MRSA	31
2.6. CASSETE CROMOSSÔMICO ESTAFILOCÓCICO <i>mec</i> – SCC <i>mec</i>	32
2.6.1. MRSA Hospitalar – HA-MRSA	34
2.6.2. MRSA Associado à Comunidade – CA-MRSA	34
2.7. TIPAGEM MOLECULAR DE MICRORGANISMOS	35
<b>3. CASUÍSTICA E MÉTODOS</b>	<b>41</b>
3.1. CASUÍSTICA E AMOSTRAS	41
3.2. IDENTIFICAÇÃO DOS <i>Staphylococcus aureus</i>	42
3.3. CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA EM MRSA	44
3.3.1. Teste de Triagem por Disco Difusão	44
3.3.2. Teste de Triagem por Diluição em Ágar	45
3.4. TESTE DE TRIAGEM PARA VISA ( <i>S. aureus</i> Vancomicina-Intermediário)	45
3.5. TESTE DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS	45

3.5.1. Determinação da Concentração Inibitória Mínima – CIM _____	46
3.6. ANÁLISE DO CROMOSSOMO DE <i>Staphylococcus aureus</i> por <i>PULSED FIELD GEL ELECTROPHORESIS</i> –PFGE _____	48
3.6.1. Preparação dos Blocos de Agarose _____	49
3.6.2. Digestão dos Blocos de Agarose _____	49
3.6.3. Eletroforese em Gel de Agarose _____	50
3.6.4. Análise dos Perfis Eletroforéticos _____	50
<b>4. RESULTADOS _____</b>	<b>52</b>
<b>5. DISCUSSÃO _____</b>	<b>57</b>
<b>6. CONCLUSÕES _____</b>	<b>64</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____</b>	<b>65</b>
<b>ANEXO 1 – SOLUÇÕES E REAGENTES</b>	
<b>ANEXO 2 – PLANILHA DE DADOS</b>	

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ESTRUTURA DO PEPTIDEOGLICANO EM BACTÉRIAS	
GRAM-POSITIVAS _____	21
FIGURA 2 – ORGANIZAÇÃO MOLECULAR DO COMPLEXO <i>mec</i> E SUA	
LOCALIZAÇÃO CROMOSSOMAL RELATIVA A <i>fem</i> , <i>pur-nor-his</i> _____	22
FIGURA 3 – ORGANIZAÇÃO GENÉTICA DO COMPLEXO GENE <i>mecA</i>	
EM ESTAFILOCOCOS E SUAS DIFERENTES CLASSES _____	23
FIGURA 4 – ESPESSEAMENTO DE PAREDE CELULAR EM <i>Staphylococcus aureus</i>	
VANCOMICINA-INTERMEDIÁRIOS (VISA) _____	29
FIGURA 5 – MECANISMO DE RESISTÊNCIA EM <i>S. aureus</i> VANCOMICINA	
INTERMEDIÁRIOS (VISA) _____	30
FIGURA 6 – ALTERAÇÃO DA TERMINAÇÃO D-ala-D-ala para D-ala-D-lac	
em VRSA _____	31
FIGURA 7 – ARRANJO ESQUEMÁTICO DOS SCC <i>mec</i> I a VI _____	33
FIGURA 8 – ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PFGE _____	38
FIGURA 9 – PERFIL ELETROFORÉTICO DOS 6 CLONES IDENTIFICADOS	
NO ESTUDO _____	54
FIGURA 10 – DENDROGRAMA DOS CLONES OBTIDOS NO ESTUDO _____	56

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – AMOSTRAS BIOLÓGICAS INCLUÍDAS NO ESTUDO _____	52
GRÁFICO 2 – PREVALÊNCIA DOS PERFÍS OBTIDOS NO ESTUDO EM RELAÇÃO AO NÚMERO TOTAL DE AMOSTRAS _____	55
GRÁFICO 3 – DISTRIBUIÇÃO DO CLONE EPIDÊMICO POR SÍTIO INFECCIOSO _____	58

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – SUSCETIBILIDADE DAS AMOSTRAS DE <i>S. aureus</i> E VALORES DE CIM <sub>50</sub> E CIM <sub>90</sub> DOS ANTIBIÓTICOS TESTADOS _____	46
QUADRO 2 – INTERPRETAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE POR CIM SEGUNDO O CLSI E DILUIÇÕES TESTADAS PARA CADA ANTIMICROBIANO _____	53



## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS INCLUÍDAS NO ESTUDO \_\_\_\_\_ 51

TABELA 2 – PACIENTES COM MAIS DE UMA AMOSTRA INCLUÍDA NO  
ESTUDO \_\_\_\_\_ 57

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	-	<i>American Type Culture Collection</i>
BEC	-	<i>Brazilian Epidemic Clone</i> (Clone Epidêmico Brasileiro)
CIM	-	Concentração Inibitória Mínima
CIM <sub>50</sub>	-	menor concentração que inibe 50% da população bacteriana
CIM <sub>90</sub>	-	menor concentração que inibe 90% da população bacteriana
CLSI	-	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DNA	-	ácido desoxirribonucléico
DNase	-	desoxirribonuclease
Dttp	-	dinucleotídeo tirosina trifosfato
ECN	-	estafilococos coagulase-negativa
EDTA	-	ácido etilenodiaminotetracético
HC-UFPR	-	Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná
HCl	-	ácido clorídrico
H <sub>2</sub> S	-	ácido sulfídrico
kb	-	kilobases
LBA	-	Lavado Broncoalveolar
mg	-	miligrama
MgCl <sub>2</sub>	-	cloreto de magnésio
MHA	-	Mueller Hinton Ágar
MLS	-	Macrolídeos, Lincosamidas e Streptograminas
MLST	-	<i>Multi Locus Sequence Typing</i>
MRSA	-	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
MSSA	-	<i>Staphylococcus aureus</i> suscetível à meticilina
MS	-	atravessador de membrana
NaCl	-	cloreto de sódio
p. ex.	-	por exemplo
pb	-	pares de bases
PBP	-	proteína ligadora de penicilina
PBS	-	tampão salina-fosfato
PCR	-	reação em cadeia da polimerase
PFGE	-	<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i> (eletroforese em campo pulsado)
pH	-	potencial hidrogênio-iônico
PM	-	peso molecular
PVL	-	<i>Panton Valentine Leukocidine</i>
SCC <sub>mec</sub>	-	Cassete Cromossômico Estafilocócico <i>mec</i>
SXT	-	sulfametoxazol-trimetoprim
TGase	-	transglicosilase
TPase	-	transpeptidase
UFC/mL	-	Unidades Formadoras de Colônias por mililitro
µg/mL	-	microgramas por mililitro
µL	-	microlitro
UTI	-	Unidade de Terapia Intensiva
VISA	-	<i>Staphylococcus aureus</i> vancomicina-intermediários
VRSA	-	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à vancomicina

## RESUMO

Os microrganismos do gênero *Staphylococcus* estão entre os maiores agentes causadores de infecção comunitária e hospitalar em todo o mundo. O crescente aumento de infecções nosocomiais por *Staphylococcus aureus* meticilina-resistente (MRSA), representam um desafio ao controle epidemiológico destes microrganismos, devido à disseminação horizontal, característica de sua expansão clonal. O presente estudo objetiva a caracterização fenotípica de resistência em MRSA, além da tipagem molecular de 107 isolados de MRSA provenientes de pacientes internados na UTI adulto do HC-UFPR em um período de 4 anos. As amostras foram submetidas à determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) por diluição em ágar e à análise do cromossomo bacteriano por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), sendo identificados 6 (seis) perfis eletroforéticos distintos, com a prevalência de 80,4% de um só clone (Clone A). Quando comparado ao clone epidêmico brasileiro (BEC), o perfil do clone A apresentou-se intimamente relacionado, com uma similaridade superior à 85%. Assim, o presente trabalho conclui que a UTI adulto do HC-UFPR possui um clone de MRSA amplamente disseminado e o PFGE foi uma metodologia eficiente para a investigação e detecção deste clone bacteriano epidêmico.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*, MRSA, caracterização clonal.

## ABSTRACT

*Staphylococcus* strains are the most agents causing community and nosocomial related infections worldwide. The increase of nosocomial infections by *Staphylococcus aureus* Methicilin- Resistant (MRSA) represents a challenge to epidemiology control, due the spread characterizing the clonal expansion. The present study objective the phenotype characterization of resistance in MRSA, beyond the molecular typing of 107 isolates of MRSA from patients of HC-UFPR adult ICU, in a period of 4 years. The samples were submitted to the determination of minimum inhibitory concentration (MIC) by the dilution technique in agar and to the analysis of the bacterial chromosome for Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE), being identified 6 (six) distinct electrophoretics profiles, with the prevalence of 80,4% of one clone (Clone A). When compared with the Brazilian Epidemic Clone (BEC), the profile of clone A presented closely related, with a similarity up to 85%. Thus, the present work concludes that the HC-UFPR adult ICU possess one clone of MRSA widely spread and the PFGE was an efficient methodology for the inquiry and detection of this bacterial epidemic clone.

Key-words: *Staphylococcus aureus*, MRSA, clonal characterization.

## 1. INTRODUÇÃO

Os microrganismos do gênero *Staphylococcus* estão entre os maiores agentes causadores de infecção comunitária e hospitalar em todo o mundo, sendo a maioria das infecções por este microrganismo, que representam risco de vida ao indivíduo, são hospitalares. No organismo humano o *Staphylococcus aureus* pode causar infecção em regiões superficiais e profundas da pele, tecidos moles e ósseos, cavidades e mucosas, bacteremia com formação de abscessos metastáticos, além de uma variedade de infecções mediadas por toxinas, incluindo gastroenterites, síndrome da pele escaldada estafilocócica e do choque tóxico (CDC, 1997; WALDWOGEL, 2000).

Infecções nosocomiais por *Staphylococcus aureus* meticilina-resistente (MRSA), representam um desafio aos microbiologistas na atualidade, devido à disseminação de clones bacterianos, com diminuição da suscetibilidade frente a várias classes de antimicrobianos (ROBINSON, 2004).

Isolados de MRSA foram primeiramente reportados em 1961, dois anos após a introdução da meticilina no mercado. Após uma disseminação inicial durante os anos sessenta, a prevalência de MRSA diminuiu no final dos anos setenta e início dos anos oitenta, aparentemente devido à combinação de um melhor controle de infecção e o aumento do uso de gentamicina (AYLIFFE, 1997).

Durante os anos oitenta, uma mudança na população de patógenos hospitalares ficou evidente, quando isolados de MRSA re-emergiram predominantemente (KARCHMER, 2000).

Dados recentes revelam que, na Europa aproximadamente 20% dos *S. aureus* isolados são MRSA, podendo chegar próximo de 50% em países como Portugal e Reino Unido (APPELBAUM, 2006). Nos Estados Unidos, a prevalência de MRSA é superior a 60% (SHORR, 2007). No Brasil, *S. aureus* é o microrganismo mais frequentemente

identificado em infecções nosocomiais e a prevalência de MRSA nestes isolados varia entre 40% e 80% na maioria dos hospitais brasileiros (OLIVEIRA, 2001).

A resistência dos *Staphylococcus aureus* permanece um importante problema na América latina. Entretanto, esta resistência pode variar muito entre os hospitais, até de um mesmo país. Devido a isto, sistemas ativos de vigilância epidemiológica, como o SENTRY, têm incorporado técnicas de tipagem molecular e genotipagem de resistência, provendo informações adicionais úteis ao entendimento da patogênese dos microrganismos mundialmente (SADER, 2004).

O antimicrobiano de escolha para o tratamento de infecções por MRSA é a vancomicina, pertencente à classe dos glicopeptídeos. Porém, seguindo o crescimento da resistência a vancomicina em enterococos e estafilococos coagulase-negativo (ECN), a partir de 1996, isolados de *S. aureus* vancomicina-intermediários (VISA), com uma concentração inibitória mínima (CIM) para a vancomicina de 8 a 16 µg/ml, começaram a ser identificados na Europa, Ásia e Estados Unidos (LIU, 2003). Desde 2002 sete isolados de *S. aureus* vancomicina-resistente (VRSA) (CIM para vancomicina  $\geq$  32 µg/ml), foram reportados, todos eles isolados nos Estados Unidos (ZHU, 2008).

O aumento na frequência de MRSA como agente causador de infecções nosocomiais e o aumento da CIM a vancomicina, demanda uma rápida e efetiva caracterização do mecanismo de resistência e uma investigação do padrão de disseminação clonal nos hospitais, fornecendo informações suficientes que permitam a implementação de medidas apropriadas para o controle dessas infecções (TRINDADE, 2003).

O MRSA tem sido considerado um patógeno associado a serviços de saúde, acometendo indivíduos com fatores de risco estabelecidos. Mais recentemente, entretanto, infecções por MRSA têm sido descritas em indivíduos não-hospitalizados e sem fatores de risco estabelecidos. Devido ao relato de MRSA adquirido na comunidade (CA-MRSA), torna-se necessário reconsiderar os atuais tratamentos empíricos com  $\beta$ -lactâmicos além de novas estratégias de controle hospitalares (KLUYTMANS, 2006).

Para melhor compreensão da epidemiologia deste microrganismo, algumas ferramentas de detecção e identificação têm sido aplicadas na tipagem de *S. aureus*. Isto inclui antibiogramas, tipagem de bacteriófago, tipagem plasmidial, ribotipagem, técnicas baseadas em Reação de Cadeia da Polimerase (PCR) e Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE) (OLIVEIRA, 2001).

PFGE é visto por muitos investigadores como o método padrão ouro para análises epidemiológicas, pois é mais discriminatório que outros métodos, todos os isolados podem ser tipados e, é obtida boa reprodutibilidade, mesmo em isolados de longo período (MORRISON, 1999).

O presente estudo pretende estabelecer um perfil epidemiológico dos isolados de MRSA obtidos de indivíduos internados em unidade de terapia intensiva adulto do HC-UFPR, e se existe similaridade com algum clone epidêmico distribuído nacional ou mundialmente, visto que até os dias atuais não há um estudo que apresente estas informações. Além disso, por existirem diferentes técnicas de biologia molecular indicadas para este fim, foi utilizada metodologia de PFGE para determinar o perfil molecular dos isolados com resultados satisfatórios como pode ser observado no trabalho.

## **1.1. OBJETIVO GERAL**

Caracterizar por métodos convencionais e de tipagem molecular, isolados de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA), visando determinar o perfil clonal dos isolados em amostras obtidas de indivíduos internados em UTI adulto.

## **1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Analisar os isolados de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) através de métodos fenotípicos preconizados pelo CLSI;

2. Determinar o fenótipo de resistência dos isolados através da obtenção da concentração inibitória mínima por ágar diluição (CIM) dos antimicrobianos utilizados no tratamento clínico;

3. Obter informações epidemiológicas com relação à população microbiana de *S. aureus*, através da tipagem molecular por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE);

4. Verificar a presença de clonalidade entre as amostras da UTI adulto do HC-UFPR e destas em relação ao clone brasileiro, aplicando critérios de análise comparativa de bandas.



## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. HISTÓRICO

No início dos anos 40, quando a penicilina foi inicialmente introduzida no mercado, mais de 85% dos isolados de *S. aureus* eram suscetíveis a concentrações reduzidas deste medicamento. Porém, estafilococos resistentes a penicilina foram descritos três anos depois. Em 1948, mais de 50% dos isolados hospitalares de *S. aureus* eram resistentes a penicilina, chegando a 80% em 1957 (GOOTZ, 2006). A resistência é devido a produção de uma penicilinase ( $\beta$ -lactamase), que inativa o antibiótico por hidrólise do anel  $\beta$ -lactâmico (LOWY, 2006).

A meticilina, primeira penicilina semi-sintética penicilinase-resistente, foi introduzida em 1961. Porém, *S. aureus* meticilina resistentes (MRSA) foram isolados, rapidamente após sua introdução (JEVONS, 2006). A resistência ocorre devido a uma aquisição genética no cromossomal bacteriano, resultando na produção de uma proteína ligadora de penicilina alterada (PBP 2a), com baixa afinidade pelo anel  $\beta$ -lactâmico. PBP 2a é codificada pelo Gene *mecA* que é parte de um elemento genético móvel, o “Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*” (SCC*mec*). A fonte do Gene *mecA* em *S. aureus* é desconhecida, entretanto, sugere-se ter sido adquirido de *S. sciuri*, uma das espécie de estafilococo coagulase-negativo (SCHITO, 2006).

Os principais agentes antimicrobianos utilizados no tratamento de infecções por MRSA são os glicopeptídeos (teicoplanina e vancomicina). A vancomicina foi introduzida em 1958, mas o primeiro isolado de *S. aureus* resistente a vancomicina (VRSA) foi relatado em 2002 nos Estados Unidos (TENOVER, 2004). Anteriormente, *S. aureus* com susceptibilidade intermediária a vancomicina (VISA), foram isolados no Japão em 1996 e outros países, incluindo os EUA. Dados recentes mostram importantes mudanças no perfil de resistência do MRSA frente aos antimicrobianos (TIEMERSMA, 2006).

## 2.2. TAXONOMIA

Os estafilococos são membros da família *Micrococcaceae* e classificados como cocos Gram-positivos em forma de cacho, catalase-positiva, mas podem ser divididos em dois grupos com base na produção de coagulase; as espécies coagulase-negativa são distinguidas dos coagulase-positivos (dentre eles o *Staphylococcus aureus*) pela sua incapacidade de coagular plasma de coelho (WHITENER, 1993).

O gênero *Staphylococcus* atualmente compreende 38 espécies. Entre seus representantes, *Staphylococcus aureus* é a espécie mais virulenta e o patógeno mais importante, mas a incidência de infecções causadas por estafilococos coagulase-negativos vem aumentando em todo o mundo (SAKAI, 2004).

## 2.3. PATOGÊNESE

No homem, *S. aureus* é causador de infecções cutâneas como furunculoses, impetigo e abscessos (MURRAY, 1992), infecções incluindo osteomielite, endocardite e artrites (SPICER, 2002), intoxicações alimentares, síndrome da pele escaldada e síndrome do choque tóxico (DINGES, 2000).

Os estafilococos também secretam um grupo de enzimas e citotoxinas que incluem quatro hemolisinas (alfa, beta, gama e delta), nucleases, proteases, lipases, hialuronidase e colagenase, além de outras enzimas como catalase, fibrinolisinase, coagulase e  $\beta$ -lactamase. A produção destas enzimas e citotoxinas consideradas importantes fatores de virulência em infecções, é regulada por elementos genéticos como plasmídios, transposons e profagos (NOVICK, 2001).

## 2.4. RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

Os relatos históricos, incluindo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), têm demonstrado que a introdução de um novo antibiótico é frequentemente seguida pelo

desenvolvimento de resistência à droga, onde seu uso promove uma potencial seleção de bactérias resistentes. O uso indiscriminado de antimicrobianos é elementar no processo de resistência, sendo que a descontinuidade e falta de adesão ao tratamento também contribuem para este fenômeno.

MRSA além de sua ampla disseminação mundial, representam um grande desafio no tratamento de infecções hospitalares, apesar de carregar um único mecanismo de resistência que lhe conferem proteção contra todos os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, (CRISOSTOMO, 2001).

Concomitante a ampla resistência a todos os  $\beta$ -lactâmicos, os isolados de MRSA frequentemente apresentam-se multirresistentes frente a grupos de antimicrobianos, como aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e macrolídeos (BARRETT, 2006). Além disso, infecções por MRSA estão associadas à considerável morbidade e mortalidade, bem como altos custos de tratamento (ABRAMSON, 2006).

#### 2.4.1. Resistência aos Macrolídeos, Lincosamidas e Streptograminas.

Estes antibióticos constituem um grupo conhecido como Macrolídeos, Lincosamidas e Streptograminas (MLS). Em *S. aureus*, a resistência ao MLS tem dois fenótipos. O primeiro é devido à modificação ribossomal do 23S rRNA, mediados primariamente pelos genes *ermA*, *ermB* ou *ermC* (encontrados em plasmídios ou cromossomos), impedindo a ligação do antimicrobiano ao seu sítio alvo ribossomal. O segundo tipo é mediado pelo *msrA* e envolve o efluxo ativo do antimicrobiano por uma bomba ATP-dependente, mantendo concentrações intracelulares abaixo do nível requerido para a ligação aos ribossomos (NICOLA, 1998).

#### 2.4.2. Resistência aos Aminoglicosídeos.

A resistência em *S. aureus* a esta classe de antimicrobianos resulta de um dos três eventos: uma mutação cromossômica levando a uma ligação alterada do aminoglicosídeo aos ribossomos; transporte deficiente da droga ao interior da célula bacteriana; ou a modificação enzimática dos aminoglicosídeos. Neste último caso, as bactérias resistentes

apresentam uma modificação nos genes *acc*, *aph* e *ant*, os quais codificam para acetiltransferases, fosfotransferases e adeniltransferases, respectivamente. As formas de aminoglicosídeos acetilados, fosforilados ou adenilados, não se ligam aos ribossomos, não inibindo a síntese protéica (SCHITO, 2006).

#### 2.4.3. Resistência às Quinolonas

O alvo primário das quinolonas é a DNA girase bacteriana, sem a qual a replicação do DNA é inibida. Assim, bactérias resistentes apresentam mutação cromossomal, reduzindo a afinidade da quinolona aos seus alvos (DNA girase e Topoisomerase IV) (LOWY, 2003).

#### 2.4.4. Resistência aos $\beta$ -lactâmicos.

Quando a penicilina G foi introduzida, na década de quarenta, aproximadamente 85% dos *S. aureus* isolados eram suscetíveis a concentrações inferiores a 0,1 mg/l, mas o primeiro isolado penicilina-resistente foi descrito por Kirby em 1944 (CHAMBERS, 2001). A resistência é decorrente da produção de uma penicilinase. Atualmente, mais de 90% dos isolados produzem  $\beta$ -lactamase que inativa a ação do antibiótico pela hidrólise do anel  $\beta$ -lactâmico. *BlazA* codifica  $\beta$ -lactamase e é parte de um elemento genético móvel ou plasmídeo, o qual freqüentemente contém genes resistentes a outros antimicrobianos, como gentamicina e eritromicina (LOWY 2003).

Em 1961 foi introduzida a Meticilina, primeira penicilina semi-sintética destinada aos *S. aureus* produtores de penicilinase. Entretanto, a resistência à metilina foi reportada muito precocemente após sua introdução. Tal processo ocorre devido a uma aquisição cromossômica do gene *mecA*, resultando na produção de uma proteína ligadora de penicilina alterada (PBP 2a), a qual possui uma baixa afinidade de ligação com a molécula do antibiótico, conferindo resistência a todos os agentes  $\beta$ -lactâmicos, incluindo as cefalosporinas. PBP 2a é codificada pelo gene *mecA*, parte de um elemento genético móvel, o “Staphylococcal Chromosomal Cassette *mec*” (*SCCmec*) (SCHITO, 2006).

O mecanismo pelo qual a oxacilina inibe o crescimento bacteriano dos *Staphylococcus* está baseado na inibição da síntese de parede celular pela ligação deste antimicrobiano à proteína ligadora de penicilina (PBP) presente na parede celular destes microrganismos. Estas proteínas possuem atividade bioquímica mecanicamente similar à das serina-proteases, pois catalizam a reação de transpeptidase que faz a ligação cruzada dos peptideoglicanos da parede celular (FIGURA 1). As principais PBPs, 1, 2, 3 e 4, são produzidas tanto por isolados suscetíveis como resistentes (CHAMBERS, 1997).

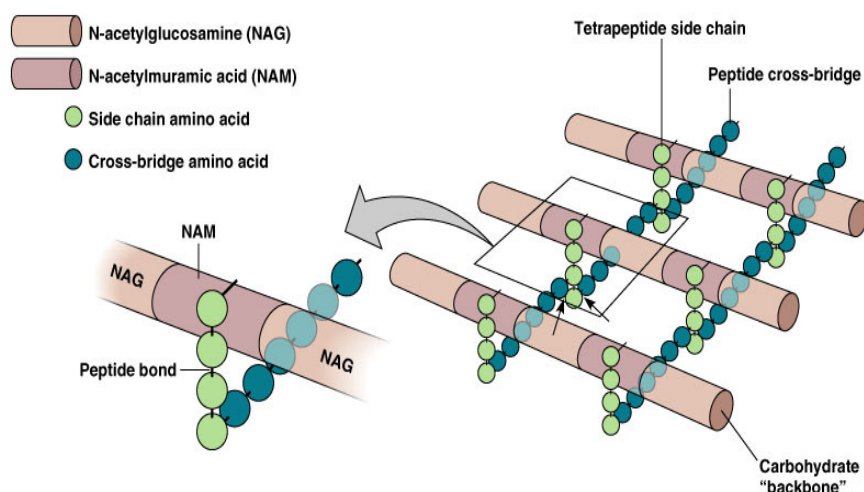


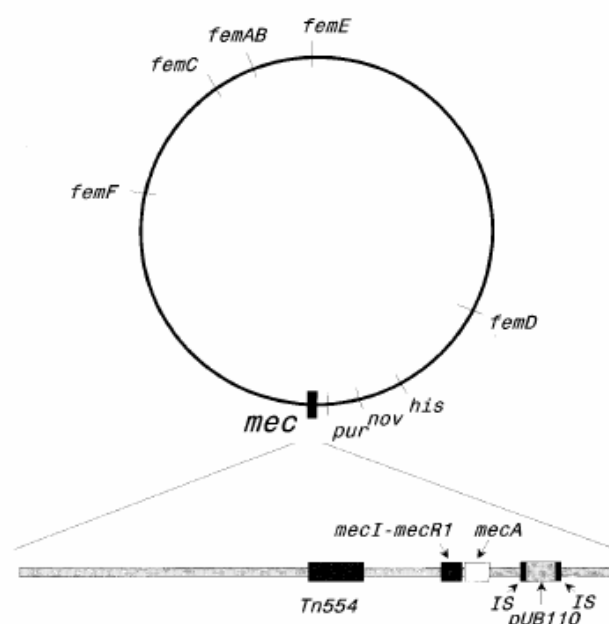
FIGURA 1 – ESTRUTURA DO PEPTIDEOGLICANO EM BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS

FONTE: DECKER, J. **Biofilms: Microbial Communities and Infectious Disease**. Disponível em: <http://microvet.arizona.edu/Courses/MIC438/decker/biofilms/biofilms.html>

A produção de PBP 2a, uma proteína ligadora de penicilina com característica de extrema baixa afinidade aos antimicrobianos beta-lactâmicos é, sem dúvida, o principal mecanismo responsável pela resistência à oxacilina, embora outros mecanismos tenham sido descritos, como alteração de outras PBPs e a hiperprodução de beta-lactamases (JARLOV, 1997).

O determinante estrutural que codifica a proteína alterada denominada PBP 2a é chamado de *mecA* e está presente em um DNA cromossômico adicional de aproximadamente 30 a 50 kb denominado complexo *mec*, não encontrado em isolados sensíveis de estafilococos, mas presente nos isolados meticilina resistentes; é sempre

encontrado próximo a região reguladora *pur-nov-his* no cromossomo dos *S. aureus*. Elementos reguladores que controlam a transcrição do *mecA* também presentes são *mecI* e *mecR1* e mais 20 a 45 kb de DNA que estão associados ao complexo *mec* (CHAMBERS, 1997). Um número de genes denominados *fem* (fator essencial para a expressão da resistência à meticilina) foi identificado no cromossomo dos *S. aureus*, dos quais *femAB* aparece como sendo o mais importante. A inativação deste gene restaura totalmente a sensibilidade à meticilina nos isolados de MRSA. Genes como *femAB* também têm sido identificados nos *S. epidermidis* (FIGURA 2) (CARBON, 2000).



NOTA: IS indica os elementos IS431 (o mesmo que IS257) ladeando o plasmídeo de resistência à tobramicina pUB110. Tn554 é um transposon contendo o gene *ermA*, codificando resistência induzida à eritromicina.

FIGURA 2 – ORGANIZAÇÃO MOLECULAR DO COMPLEXO *mec* E SUA LOCALIZAÇÃO CROMOSSOMAL RELATIVA AOS FATORES *fem*, *pur-nor-his*.

FONTE: CHAMBERS, H.F. **Methicillin Resistance in Staphylococci: Molecular and Biochemical Basis and Clinical Implications**. Clinical Microbiology Reviews, v. 10, n. 4, p. 781-791, 1997.

O gene *mecR1* codifica um indutor transmembrana do *mecA* constituído de um domínio transmembrana (MS). O gene *mecI* codifica um forte repressor do *mecA*. Os genes *mecR1* e *mecI* possuem alto grau de homologia com os genes *blaR1* e *blaI*, que regulam a

produção de beta-lactamases. Estudos têm demonstrado a capacidade do complexo *blaR1-blaI* em regular a expressão do gene *mecA*. Isolados que possuem uma disfunção na região regulatória podem expressar *mecA* constitutivamente ou podem usar os genes reguladores da beta-lactamase para melhor expressar *mecA*, já que *blaR1* é um forte indutor do *mecA* e *blaI* é um fraco repressor (HIRAMATSU, 1996).

Estudos na região *mecR1* e *mecI* mostram que há uma considerável diversidade genômica no complexo *mec* (FIGURA 3).

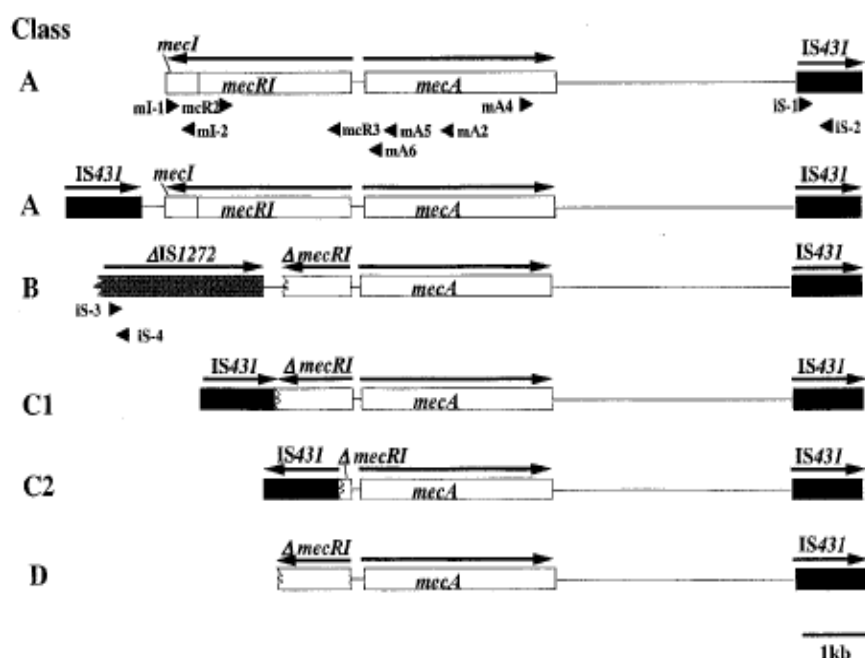


FIGURA 3 – ORGANIZAÇÃO GENÉTICA DO COMPLEXO GENE *mecA* EM ESTAFILOCOCOS E SUAS DIFERENTES CLASSES

FONTE: KATAYAMA, Y., et al, Genetic Organization of the Chromosome Region Surrounding *mecA* in Clinical Staphylococcal Strains: Role of *IS431*-mediated *mecI* Deletion in Expression of Resistance in *mecA*-carrying, Low Level Methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 45, n. 7, p. 1955-1963, 2001.

Este polimorfismo não implica em mudança na expressão de resistência, porém apresenta-se como um marcador evolucionário dos diferentes isolados de MRSA (SHUKLA, 2004). O gene *mecA* apresenta altos níveis de homologia no MRSA (*Staphylococcus aureus* meticilina resistente) e nos ECN meticilina resistentes. Um gene

*mecA* com homologia de aminoácidos de 88% com o gene *mecA* dos estafilococos meticilina resistentes foi identificado no *Staphylococcus sciuri*. Um fato interessante é que este gene homólogo é ubíquo nesta espécie, mas seu fenótipo é sensível à oxacilina. Este e outros dados sustentam a hipótese de que o gene *mecA* é originário de espécies de ECN, possivelmente uma espécie evolucionariamente próxima do *S. sciuri*. (CHAMBERS, 1997).

A detecção da resistência à oxacilina em cepas de *S. aureus* tem sido dificultada devido a variabilidade nas técnicas padronizadas usadas para tal. As cepas resistentes são frequentemente heterorresistentes aos antibióticos beta-lactâmicos, de modo que duas subpopulações (uma suscetível e outra resistente) coexistem numa mesma cultura. Cada célula na população pode carregar a informação genética para resistência, mas somente uma pequena fração ( $10^{-8}$  a  $10^{-4}$ ) pode realmente expressar o fenótipo resistente sob condições de teste *in vitro*. A população resistente geralmente cresce mais lentamente que a população suscetível e portanto pode não ser detectada quando realizado o teste *in vitro*. O sucesso da detecção das cepas heterorresistentes depende muito da promoção do crescimento das subpopulações resistentes, o que é favorecido por pH neutro, temperaturas mais baixas (30 a 35°C), presença de NaCl (2 a 4%), e possivelmente por incubação prolongada (até 48 horas) (SWENSON, 2003).

#### 2.4.4.1. Testes Fenotípicos para Detecção de Resistência à Oxacilina

##### Disco Difusão

Este teste permite a classificação da maioria das cepas bacterianas como suscetíveis, intermediárias ou resistentes a uma variedade de agentes antimicrobianos. O método tem diversas vantagens: (i) é tecnicamente simples de fazer e muito reprodutível; (ii) os reagentes são relativamente baratos; (iii) não requer equipamentos especiais; (iv) fornece resultados de suscetibilidade facilmente compreensíveis para os clínicos e (v) é flexível quanto à seleção de agentes antimicrobianos para teste.

O teste consiste na aplicação de um inóculo padronizado de bactérias (aproximadamente  $1-2 \times 10^8$  UFC/mL) à superfície de uma placa de ágar Mueller-Hinton.



Discos de papel-filtro impregnados com uma concentração fixa de antibiótico são colocados na superfície inoculada do ágar. As placas são incubadas por 16-18 horas em atmosfera ambiente a 35°C. Os diâmetros das zonas de inibição de crescimento ao redor de cada disco de antibiótico são medidos em milímetros examinando-se a placa com luz refletida (JORGENSEN, 2003).

Para o *S. aureus*, o teste com disco de cefoxitina é comparável ao disco de oxacilina para a detecção de resistência à oxacilina mediada por *mecA*; o teste com disco de cefoxitina é mais fácil de ser lido, sendo o método preferido. De acordo com o resultado da cefoxitina, é reportado o resultado da oxacilina como suscetível ou resistente. Se o resultado obtido for intermediário para oxacilina, deve-se realizar o teste para detecção do gene *mecA* ou PBP2a e a Concentração Inibitória Mínima (CIM), ou o teste de triagem em ágar com oxacilina (CLSI, 2007).

#### Detecção da Concentração Inibitória Mínima

Estes métodos são usados para determinar a concentração mínima de um agente antimicrobiano, em microgramas por mililitro ( $\mu\text{g/mL}$ ), necessária para inibir o crescimento de um microrganismo. Os agentes antimicrobianos são incorporados ao meio ágar, sendo que cada placa contém uma concentração diferente do agente antimicrobiano, usualmente testados em diluições seriadas múltiplas de dois, e a menor concentração que inibe o crescimento visível de um microrganismo é considerada a CIM (CLSI, 2005).

O método da diluição em ágar é uma técnica padronizada e confiável que pode ser usada como referência para avaliar a acurácia de outros sistemas de teste. Além disso, o teste simultâneo de um grande número de cepas com poucas drogas é eficiente, e a contaminação ou heterogeneidade microbiana é mais facilmente detectada nos métodos com ágar do que com caldo. As principais desvantagens do método em ágar estão relacionadas ao longo tempo de execução e intensa carga de trabalho, necessários para preparar as placas, especialmente quando o número de agentes antimicrobianos a serem testados é grande, ou se poucas cepas forem testadas (JORGENSEN, 2003).

Outra forma de determinar a CIM de um microrganismo é pela utilização do Etest® (AB Biodisk, Solna, Suécia), o qual consiste de uma fita plástica não porosa que contém valores de CIM e um gradiente predefinido de antibiótico imobilizado na face oposta à escala. Quando depositado sobre o ágar Mueller-Hinton e após período de incubação, a inibição do crescimento bacteriano produz uma elipse e a CIM é determinada no ponto de intersecção do crescimento bacteriano com a escala que a fita de Etest® apresenta na face superior. O CLSI não padronizou a técnica por se tratar de um método comercial, porém a empresa fabricante da fita recomenda que a realização e interpretação do teste sejam baseadas nos documentos do CLSI.

#### Teste de Triagem em Ágar com Oxacilina

O teste de triagem em ágar para detecção de resistência à oxacilina em *Staphylococcus aureus* foi incluído pela primeira vez no documento do CLSI em 1990, embora a edição não revelasse detalhes de como as amostras deveriam ser inoculadas. Recomendações para o controle de qualidade do teste também não haviam sido incluídas até 1997, quando a cepa *S. aureus* ATCC 43300, *mecA* positiva com expressão altamente heterogênea da resistência à oxacilina foi sugerida como controle de qualidade (MACKENZIE, 1995). Em 2001, Swenson e colaboradores avaliaram a cepa *S. aureus* ATCC 43300 quanto a sua adequação para o uso como um controle positivo do teste. Concluíram que sua utilização pode ajudar a detectar lotes de ágar de triagem que falham na detecção de isolados heterorresistentes. Segundo o CLSI, para penicilinas estáveis à penicilinase (cloxacilina, dicloxacilina e flucloxacilina), o teste com oxacilina é preferido, por ser mais estável à degradação no armazenamento e, devido a ser mais sensível à detecção de heterorresistência (CLSI, 2008).

#### Teste de Aglutinação com Partículas de Látex

Testes para detecção do gene *mecA* ou a proteína gerada por sua expressão, a proteína ligadora de penicilina 2a (PBP 2a), são os métodos mais acurados para determinar

a resistência à oxacilina e podem ser usados para confirmação dos resultados de disco-difusão dos isolados de *S. aureus* (CLSI, 2008).

A técnica de aglutinação com partículas de látex é rápida e de fácil execução. Consiste na detecção de PBP2a extraída de colônias teste. O método baseia-se na aplicação de partículas de látex impregnadas com anticorpos monoclonais reativos à PBP2a, que quando presente na amostra, reage promovendo aglutinação visível macroscopicamente. Em amostras de MRSA cultivadas em ágar sangue, estudos reportam uma sensibilidade de 98,5 – 100% e uma especificidade de 100%. Entretanto, colônias cultivadas em meios seletivos, ou a presença de substâncias como NaCl, oxacilina ou meticilina, na placa, pode afetar a reatividade do teste, particularmente àqueles com isolados heterogêneos e que não cresceram bem em meios seletivos (BROWN, 2001).

Isolados de *S. aureus* que carregam o gene *mecA*, ou que produzem PBP2a, devem ser reportados como resistentes à oxacilina e, na ausência do gene ou da proteína, reportados como suscetíveis. Devido à ocorrência de outros mecanismos de resistência que não a presença do gene *mecA*, se o teste para detecção da CIM for realizado além do método de disco-difusão, isolados no qual a CIM para oxacilina for  $\geq 4 \mu\text{g/mL}$  e gene *mecA* ou PBP2a negativos, o isolado deve ser reportado como oxacilina-resistente. Esses isolados devem apresentar-se suscetíveis à cefoxitina (CLSI, 2008).

#### Teste em Equipamentos Automatizados.

Os sistemas comerciais automatizados ou semi-automatizados são comumente utilizados como testes rápidos de sensibilidade aos antimicrobianos. O sistema Vitek 2 (bioMérieux, França) é um dos mais utilizados entre os aparelhos automatizados, pois possui monitoramento contínuo do crescimento dos microrganismos e um algoritmo que calcula a CIM cinética (Bémer, 2005). Outro aparelho utilizado é o MicroScan (Dade Behring, Califórnia), avaliado por Swenson e colaboradores (2001), que compararam oito métodos para detecção de resistência à oxacilina em *S. aureus*, entre eles o MicroScan com painel convencional e o MicroScan painel rápido. A sensibilidade e especificidade

encontradas para o MicroScan painel rápido foi superior a 90% e inferior a 90%, respectivamente. Já o painel convencional identificou corretamente apenas 5 dos 19 isolados *mecA* positivos.

Yamazumi, et al. (2001) compararam o cartão GPS 106 do Vitek com o teste de aglutinação em látex, o método de diluição em caldo e a PCR para detecção de resistência à oxacilina. O teste de aglutinação em látex, o cartão GPS 106 e a diluição em caldo apresentaram sensibilidade de 95,7%, 95,7% e 100%, respectivamente e, especificidade de 92,8%, 85,7% e 78,5%, respectivamente. Concluíram, com isso, que o Cartão GPS 106 do Vitek também apresenta resultados fenotípicos acurados em um período de tempo relativamente curto (dentro de oito horas), sendo um método de fácil execução.

#### PCR para Detecção do Gene *mecA*

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é um método genotípico rápido, sensível e específico utilizado na pesquisa de genes previamente conhecidos (VANNUFFEL, 1995); porém é um método pouco utilizado pelos laboratórios clínicos de rotina por apresentar custo elevado e necessitar estrutura laboratorial adequada (HORSTKOTTE, 2001; JARLOV, 1997).

PCR para a detecção do gene *mecA* é considerada o método padrão ouro para confirmação de isolados oxacilina resistentes, incluindo aqueles com resistência heterogênea e por isso é utilizada em vários estudos que analisam a sensibilidade e especificidade de diversos métodos fenotípicos (DERESINSKI, 2005).

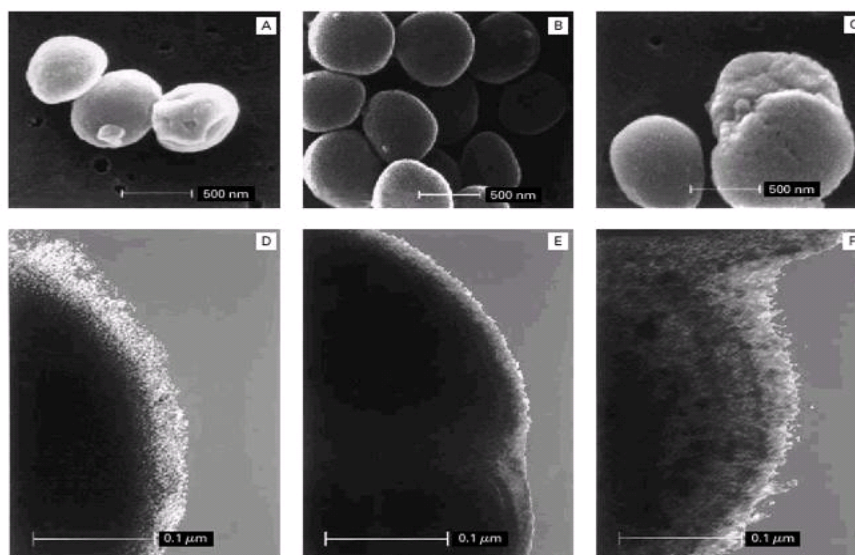
#### 2.4.5. Resistência aos Glicopeptídeos

Os glicopeptídeos, vancomicina e mais recentemente a teicoplanina, são drogas de escolha no tratamento de infecções por MRSA. O primeiro isolado de *S. aureus* vancomicina-resistente (VRSA) foi encontrada em 2002, embora, cepas com resistência intermediária à vancomicina (VISA), tenham isoladas primeiramente no Japão em 1996 e posteriormente em muitos outros países, incluindo os Estados Unidos. Recentemente,

novos agentes antimicrobianos como a linezolida, daptomicina e tigeciclina estão sendo testados, podendo auxiliar no combate ao *S. aureus* multiresistente (SCHITO, 2006)

#### 2.4.5.1. *Staphylococcus aureus* Vancomicina-Intermediário – VISA

A detecção destes isolados pelo método de disco-difusão não é recomendada. As metodologias aceitáveis para a detecção de VISA incluem microdiluição em caldo, ágar diluição e E-test<sup>®</sup>. O CLSI recomenda uma CIM de 4 – 8 µg/mL de vancomicina usando microdiluição em caldo e ágar diluição, com o crescimento de mais de uma colônia após 24h completas de incubação a 35°C e uma CIM  $\geq 6$  µg/mL usando o método E-test<sup>®</sup>. O mecanismo de resistência em VISA inclui a síntese de quantidades adicionais de peptidoglicano resultando em um espessamento da parede celular (FIGURA 4).



NOTA: A e C= Microscopia eletrônica de VISA; B= Células de *S. aureus* normais; D e F= detalhe do espessamento de parede em VISA; E= detalhe de parede bacteriana normal em *S. aureus*.

FIGURA 4 – ESPESSAMENTO DE PAREDE CELULAR EM *S. aureus* VANCOMICINA-INTERMEDIÁRIOS (VISA)

FONTE: BIERBAUM, G., **Mechanisms of the Development of Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus***. Disponível em: [http://www.genomik.uni-wuerzburg.de/pics/160\\_a.jpg](http://www.genomik.uni-wuerzburg.de/pics/160_a.jpg)

Este espessamento leva ao aumento no número de resíduos D-alanil-D-alanina, capazes de ligar-se à vancomicina na parte externa da parede celular, gerando menor disponibilidade do antimicrobiano na molécula alvo intracelular (FIGURA 5) (LOWY, 2003).

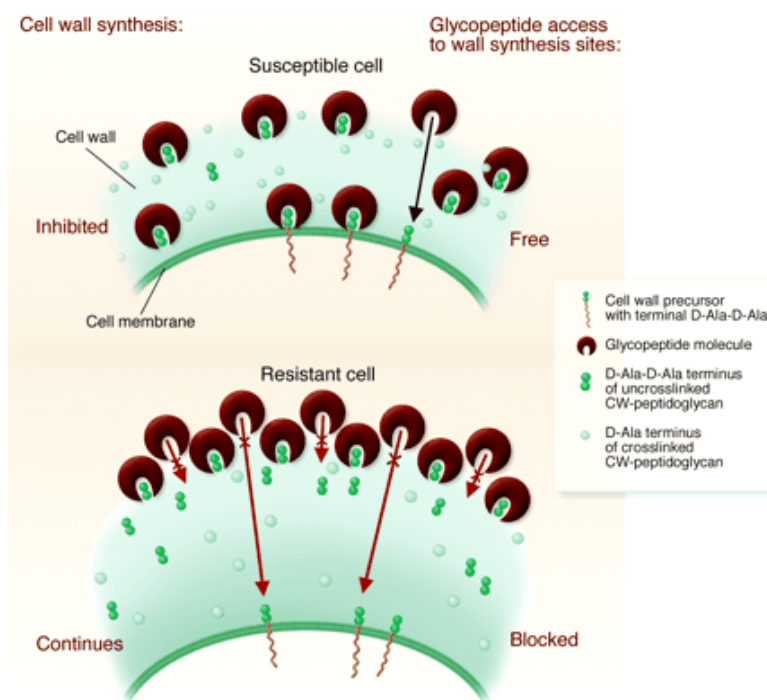


FIGURA 5 – MECANISMO DE RESISTÊNCIA EM *S. aureus* VANCOMICINA INTERMEDIÁRIOS (VISA)

FONTE: LOWY, F. D., **Antimicrobial Resistance: The Example of *Staphylococcus aureus***. J Clin Invest, 2003, 111: 1265 – 1273.

#### 2.4.5.2. *Staphylococcus aureus* Vancomicina-Resistente – VRSA

Em 2002, o primeiro VRSA (Concentração Inibitória Mínima  $\geq 16 \mu\text{g/mL}$ ), contendo o gene *vanA* foi isolado nos Estados Unidos. Seis eventos subsequentes de isolados clínicos de VRSA foram reportados, todos nos EUA. Estes isolados possuem um mecanismo de disseminação muito mais eficiente do que os VISA (ZHU, 2008).

Acredita-se que o doador do gene *vanA* ao *S. aureus* tenha sido o *Enterococcus faecalis*, através de transferência conjugativa de plasmídeo contendo o operon *vanA*. Este integra o Transposon *Tn1546* composto de *vanR*, *vanS*, *vanX*, *vanY* e *vanH*, presentes em um plasmídeo de 120 Kb (TENOVER, 2004).

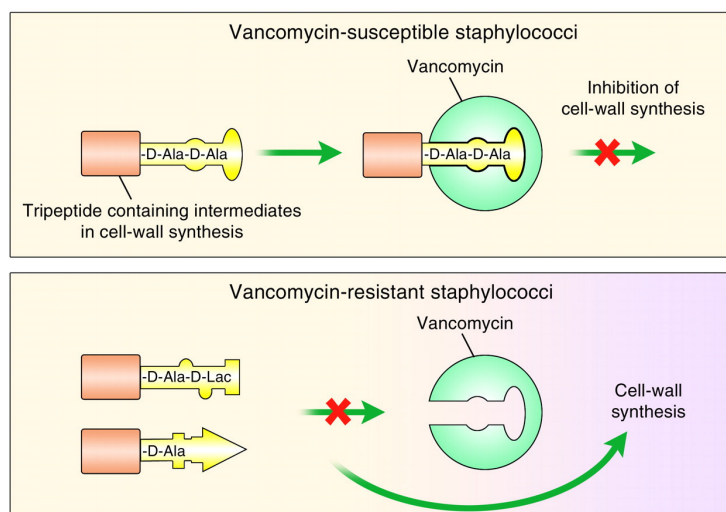


FIGURA 6 – ALTERAÇÃO DA TERMINAÇÃO D-ala-D-ala para D-ala-D-lac em VRSA

FONTE: LOWY, F. D., *Antimicrobial Resistance: The Example of Staphylococcus aureus*. J Clin Invest, 2003, 111: 1265 – 1273.

A resistência em VRSA é causada pela alteração na parede celular do peptídeo terminal D-alanil-D-alanina da parede celular bacteriana para D-alanil-D-lactato (FIGURA 6), impedindo a inibição da síntese de parede celular pela vancomicina (SCHITO, 2006).

## 2.5. GENÉTICA DO MRSA

Variações genéticas entre isolados de *S. Aureus* têm sido relacionadas com seu potencial patogênico. Variações ocorrem nos genes centrais (core genes) e genes acessórios.

Dois modelos evolucionários de MRSA foram propostos no início dos anos noventa, baseados no uso de diferentes técnicas de tipagem molecular. O modelo simplificado, descrito por Kreiswirth e colaboradores, foi baseado na análise do polimorfismo de fragmentos de restrição gerado por digestão do DNA cromossomal pela enzima *ClaI*, seguido de hibridização com Tn554 e sondas de *mecA*. O limitado número de padrões, observados em amostra de MRSA de diferentes locais e períodos apresentou-se como evidência que o *S. aureus* havia adquirido o gene *mecA* em apenas uma ocasião e, os autores então hipotetizaram que todos os clones recentes de MRSA descendiam de um protótipo ancestral (ROBINSON, 2004).

Muitos meses antes da publicação desse estudo, Musser e Kapur descreveram o MRSA como sendo policlonal, através de uma análise eletroforética enzimática multilocus de 254 isolados de MRSA. A associação do *mecA* com padrões genéticos divergentes apresentou-se como uma forte evidência que o gene é transferido horizontalmente entre isolados de *S. aureus*. A única explicação para estes resultados foi que isolados de MRSA tinham divergido tão rapidamente em trinta anos (entre 1961 e 1992), que perderam qualquer similaridade genética.

O determinante genético de resistência à meticilina, gene *mecA*, reside em um elemento genético móvel denominado “Staphylococcus chromossomal cassette *mec* (SCC*mec*)”. A distribuição do SCC*mec* na natureza é limitada a relativamente poucos complexos clonais de MRSA.

## **2.6. CASSETE CROMOSSÔMICO ESTAFILOCÓCICO *mec* – SCC*mec*.**

Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* é um grupo móvel de elementos de DNA de 21 a 67 kb, integrado ao cromossomo do MRSA em um único sítio (*attB<sub>scc</sub>*) locado próximo a origem de replicação do *S. aureus* (HANSSEN, 2003).

Até agora, seis tipos de SCC*mec* (I, II, III, IV, V e VI) têm sido identificados (OLIVEIRA, 2006) (FIGURA 7), os quais diferem em tamanho (aproximadamente 20 a



68 kb) e composição genética (KLUYTMANS, 2006). Os menores (I, IV, V e VI) codificam apenas recombinases e genes regulatórios e estruturais para resistência a meticilina. Estes não carregam elementos transponíveis e genes de resistência a outros antimicrobianos (não-  $\beta$ -lactâmicos).

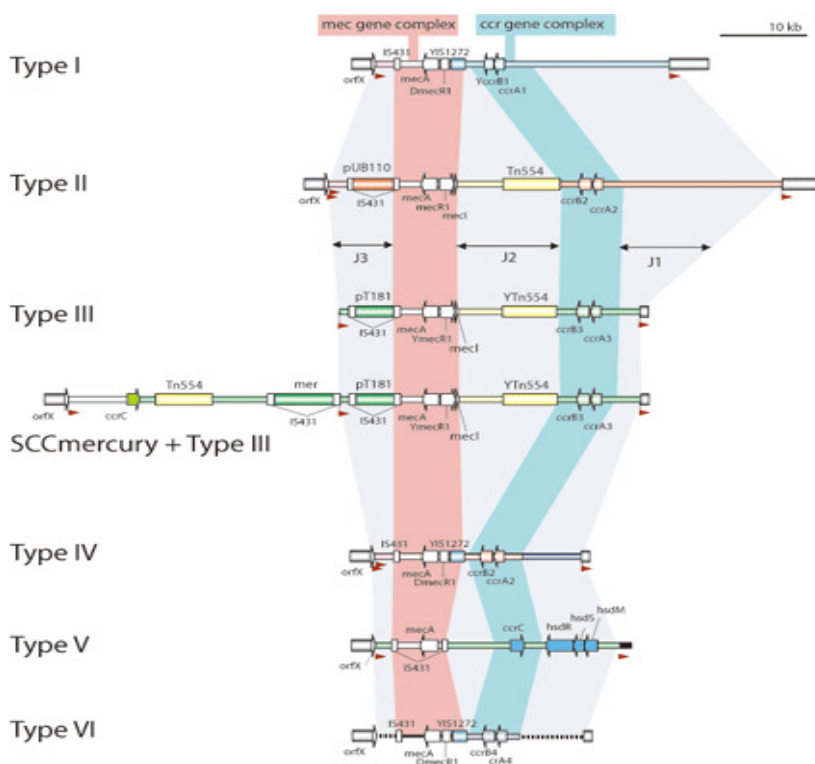


FIGURA 7 – ARRANJO ESQUEMÁTICO DOS SCC*mec* I a VI

FONTE: Deuremberg et al, Clin Microbiol Infect, 13(3);222-235, 2007.

Estudos recentes têm indicado que isolados bem definidos de MRSA comunitário s (CA-MRSA) carregam SCC*mec* tipos IV, V e VI, enquanto os MRSA hospitalares (HA-MRSA) carregam SCC*mec* tipos I, II e III e, raramente carregam o gene para PVL. Em contrapartida, SCC*mec* IV, V e VI são relativamente pequenos em tamanho o que confere mobilidade e habilidade de transferência entre as estirpes e, ao menos o tipo IV freqüentemente carrega o gene para PVL (APPELBAUM, 2007). Além disso, a multirresistência que é usualmente vista em isolados de HA-MRSA, nos CA-MRSA a resistência é freqüentemente limitada aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos. Isso ocorre em decorrência da ausência de genes de resistência diferentes do *mecA* em SCC*mec* IV, V e

VI, quando comparado ao acúmulo de múltiplos genes de resistência nos *SCCmec* II e III (ITO,2004).

É notável que alguns tipos *SCCmec* carregam vários elementos genéticos adicionais (*Tn554*, o qual codifica resistência aos macrolídeos, clindamicina e streptograminas; e *pT181*, o qual codifica resistência às tetraciclina), que conferem resistência a outras classes de antimicrobianos. Estes elementos genéticos são especialmente comuns em HA-MRSA. Além disso, isolados resistentes a eritromicina podem rapidamente induzir resistência à clindamicina (APPELBAUM, 2007).

#### 2.6.1. MRSA Hospitalar – HA-MRSA

Infecções por HA-MRSA são geralmente definidas como àquelas desenvolvidas em indivíduos hospitalizados por um período superior a 48 horas, em indivíduos recebendo terapia intravenosa ambulatorial, ou em pacientes que tiveram recente atendimento hospitalar, em clínicas de hemodiálise ou serviços de cuidados prolongados (AMMERLAAN, 2006).

HA-MRSA tem sido associado com *SCCmec* tipos I ao III. Estes tipos *SCCmec* podem conter fatores de virulência e elementos de resistência para numerosas classes de antibióticos, incluindo macrolídeos, lincosamidas, aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, tetraciclina e sulfonamidas. Os tipos *SCCmec* associados ao HA-MRSA são tão grandes que não podem ser incorporados por um fago, do contrário ficariam sem os genes requeridos para recombinação. Sua disseminação se dá através de contaminação cruzada, por inserção sítio-específica no cromossomo bacteriano. Isto sugere que esses grandes elementos genéticos podem, na verdade desfavorecer o crescimento e adaptação do HA-MRSA em locais onde não exista a pressão seletiva dos antimicrobianos (ZETOLA, 2005).

#### 2.6.2. MRSA Associado à Comunidade – CA-MRSA

Infecções por MRSA originário da comunidade constituem um problema emergente em diversas partes do mundo. Muitos surtos de CA-MRSA têm sido reportados nos Estados Unidos. A população afetada por esses surtos possui fatores de risco para aquisição de

MRSA, indicando que o microrganismo está adaptado e transformado em um patógeno associado à comunidade (KARCHMER, 2006).

CA-MRSA é definido epidemiologicamente como um MRSA isolado em até 48 horas após a admissão hospitalar em indivíduos que não sofreram administração de antibióticos intravenosos nos últimos trinta dias; não submetido à hemodiálise; não sendo hospitalizado a menos de um ano e não residindo em clínicas de saúde. A definição mais apropriada é a epidemiologia molecular baseada em tipagem do *SCC<sub>mec</sub>* e genotipagem do MRSA. Tipicamente os isolados de CA-MRSA contém *SCC<sub>mec</sub>* IV, V e VI, freqüentemente carregam o gene do fator de virulência “Panton-Valentine Leukocidine” (PVL) e, não são filogeneticamente relacionados aos isolados de HA-MRSA (AMMERLAAN, 2006).

Os fatores de virulência produzidos por “Panton-Valentine Leukocidin” incluem a produção de citocinas que causam necrose tecidual e destruição de leucócitos, são também associados a infecções de pele e pneumonia necrotizante. Além disso, estes isolados freqüentemente carregam muitos genes mediadores de exotoxinas, gerando respostas inflamatórias exacerbadas (KARCHMER, 2006).

## **2.7. TIPAGEM MOLECULAR DE MICRORGANISMOS**

Os sistemas de tipagem devem ser selecionados com base em seu poder discriminatório, reprodutibilidade e facilidade de interpretação e uso. Uma característica do organismo alvo que apresente relativa estabilidade e diversidade adequada dentro da espécie, deve ser critério para escolha do método (WESTBROOK, 2004).

Os métodos de tipagem microbiana podem ser enquadrados em duas grandes categorias: métodos fenotípicos e métodos moleculares (genotípicos ou não). Os métodos fenotípicos caracterizam os produtos da expressão genética a fim de diferenciar amostras bacterianas. Propriedades como perfis bioquímicos, tipos de bacteriófagos, antígenos presentes na superfície da célula e perfis de suscetibilidade à antimicrobianos são exemplos

de propriedades fenotípicas que podem ser determinadas no laboratório. Por envolverem expressão genética, todas estas propriedades tendem a variar, com base em mudanças nas condições e fases do crescimento além de mutações espontâneas (TENOVER, 1997).

Uma variedade de sistemas não genotípicos tem sido usados para tipagem de *Staphylococcus aureus*, tais como fagotipagem, sorotipagem de polissacarídeos capsulares, análise de proteínas, zimotipagem por análise de padrões de aloenzimas. O sucesso da fagotipagem geralmente usada pode ser limitado pela baixa reprodutibilidade dos resultados e pela ocorrência de cepas de *Staphylococcus aureus* não tipáveis por este método. A tipagem plasmidial está limitada às cepas que carregam plasmídios, e as cepas podem trocar ou mesmo perder seu conteúdo plasmidial. Por outro lado, a zimotipagem provou ser um método de diferenciação de cepas estável e reprodutível. As técnicas de genotipagem, que caracterizam o DNA cromossômico por ribotipagem ou eletroforese em campo pulsado (*Pulsed Field Gel Electrophoresis* – PFGE), são usadas com sucesso para tipagem bacteriana (SCHLICHTING, 1993).

Os vários métodos utilizados para tipagem de *Staphylococcus aureus*, porém, não agrupam as amostras da mesma maneira, de acordo com seu poder discriminatório. Alguns estudos têm avaliado e comparado diferentes métodos de tipagem e, mostraram que as características fenotípicas como antibiograma, biotipagem e fagotipagem apresentam uma instabilidade maior do que os resultados das técnicas moleculares, como por exemplo, análise de plasmídeos, PFGE e perfil isoenzimático. Para a tipagem de *Staphylococcus aureus* resistentes a oxacilina (MRSA) é importante que a técnica utilizada apresente alto poder discriminatório, pois a maioria das cepas é derivada de um número pequeno de clones. Essa similaridade genética entre amostras de MRSA não relacionadas epidemiologicamente parece ser ainda mais acentuada no Brasil (SADER, 1995).

Os métodos genotípicos baseiam-se na análise da estrutura genética de um organismo e verificação de polimorfismo nos padrões de restrição do DNA. Quando clivados com enzimas de restrição, produzem fragmentos em número e tamanho variados, que separados por eletroforese formam um perfil de segmentos que pode ser comparado

entre amostras diferentes. Os métodos genotípicos são menos sujeitos a variação natural, apesar de serem afetados por inserções ou deleções de DNA no cromossomo, por ganho ou perda de DNA extracromossômico, ou por mutações ao acaso que podem criar ou eliminar sítios de restrição para as endonucleases (TENOVER, 1997).

A tipagem molecular de microrganismos caracteriza os isolados microbianos em nível molecular para encontrar eventuais semelhanças entre amostras, caracterizando sua origem evolucionária comum. Um clone é definido como um conjunto de amostras bacterianas geneticamente relacionadas que são indistintas umas das outras por métodos de tipagem molecular, ou amostras tão similares que presume-se serem derivadas de um ancestral comum (TENOVER, 1995).

Métodos moleculares têm sido utilizados para estudar a epidemiologia do MRSA em hospitais, local, nacional e internacionalmente, sendo o PFGE considerado o método mais satisfatório com base em sua habilidade discriminatória e reprodutibilidade (ENRIGHT, 2000). A principal desvantagem do PFGE e outros métodos que comparam fragmentos de DNA em gel é a dificuldade em comparar os resultados obtidos em diferentes laboratórios, mesmo com reagentes e condições padronizadas (COOKSON, 1996).

A análise de fragmentos cromossômicos obtidos por restrição é baseada no fato de que os cromossomos não são estáticos e podem sofrer rearranjos e mutações pontuais. Alterações na sequência de nucleotídeos são refletidas nos padrões de restrição por endonucleases do DNA cromossômico quando os fragmentos são separados em gel de agarose. A caracterização física do DNA bacteriano e fúngico, não mais limitada pela dificuldade na obtenção de fragmentos adequados devido à quebra mecânica de grandes moléculas em solução, e pela incapacidade da eletroforese em gel de agarose convencional de separar moléculas de DNA em tamanhos grandes (40 a 4.000 kb). Estas limitações foram contornadas pelo desenvolvimento de técnicas como a eletroforese em campo pulsado (PFGE), que permite que o DNA genômico total seja separado em um número limitado de fragmentos de restrição com distintas mobilidades eletroforéticas (FIGURA 8).

O PFGE tem se demonstrado altamente efetivo em estudos epidemiológicos moleculares de cepas de bactérias e leveduras. O método foi desenvolvido em 1984 por Schwartz e Cantor, originalmente para células eucarióticas, e adaptado para uso em bactérias (SCHWARTZ e CANTOR, 1984).

O sistema de tipagem recomendado para investigação de surtos de *Staphylococcus aureus* é o PFGE, que fornece resultados em 3 dias. Em comparação com outros métodos, o PFGE tem excelente aplicação quanto aos tipos de microrganismos a serem testados e, excelente reprodutibilidade e poder discriminatório (WESTBROOK, 2004). Devido ao alto poder discriminatório, o PFGE tem sido recomendado por muitos pesquisadores como o método de escolha para a tipagem de MRSA (TENOVER, 1997).

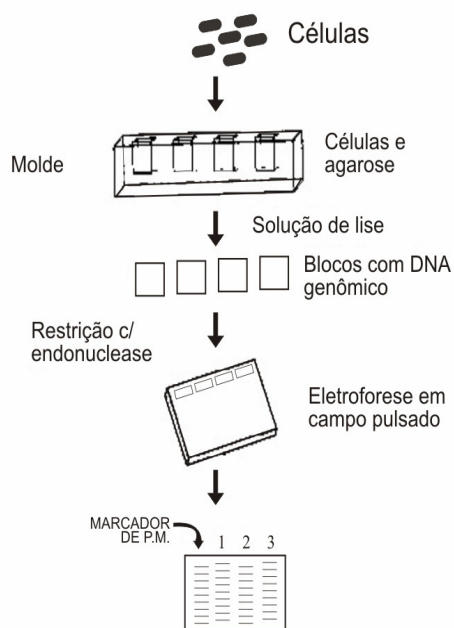


FIGURA 8 – ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PFGE

FONTE: SWAMINATHAN, B.; MATAR, G.M. Molecular Typing Methods. In: PERSING, D.H. *et al*, **Diagnostic Molecular Microbiology Principles and Applications**. Wasington, DC: ASM, p.26-50, 1993.

Análise de macrorrestrições por PFGE é o padrão estabelecido pelo “Center of Disease Control and Prevention” (CDC) para tipagem de *S. aureus* e tem sido usado com sucesso no estudo de disseminações, especialmente na identificação de surtos hospitalares (BANNERMAN, 1995). Assim como outros métodos baseados em sistemas de análise de

gel, a interpretação dos resultados do PFGE é subjetiva. Isso torna o intercâmbio de informações de tipagem de *S. aureus* complicado, dificultando a criação de uma base de dados de *S. aureus* e MRSA (SHOPSIN, 1999).

Sequenciamento de DNA é uma poderosa ferramenta na tipagem de microrganismos, com vantagens na velocidade, dados precisos e simplicidade na criação de base de dados em larga escala. Estas vantagens têm sido descritas por diversos autores, incluindo Maiden e colaboradores (1998), que desenvolveu uma técnica de “Multilocus Sequence Typing” – MLST (SHOPSIN, 1999).

MLST é um método molecular com alto poder discriminatório, que caracteriza isolados bacterianos com base nas seqüências de fragmentos com aproximadamente 450 pb, de sete genes conservados. Para cada fragmento genético, as diferentes seqüências são assinaladas como alelos distintos e, os isolados bacterianos são caracterizados pelos alelos de cada uma das sete regiões conservadas (perfil alélico ou “sequence type – ST”) (ENRIGHT, 2000).

Recentemente, o sequenciamento da região polimórfica X, do gene da proteína A estafilocócica (*spa*) tem sido proposto como alternativa às técnicas para tipagem de *S. aureus*. A região polimórfica X consiste de um número variado de 24 pb repetidas e está localizado imediatamente acima da região codificando o terminal C da parede celular bacteriana. Apesar do sequenciamento *spa* possuir vantagens em termos de velocidade de execução, facilidade de uso e interpretação, ela não possui o poder discriminatório e de resolução do PFGE na detecção de subtipos clonais (SHOPSIN, 1999).

A extensa disseminação geográfica de clones específicos de MRSA têm sido reportados por diversos autores. O clone Ibérico, um MRSA epidêmico bem caracterizado, foi inicialmente detectado em um surto no hospital Bellvitge de Barcelona, Espanha, em 1989. Em seguida, este clone foi detectado em ao menos oito hospitais em Portugal, bem como na Escócia, Itália, Bélgica, Alemanha e Nova Iorque. Em 1999, Sá-Leão e colaboradores descreveram a disseminação intercontinental de outro clone único definido

como característico de infecções pediátricas, em Portugal, Polônia, Argentina, Colômbia e Nova Iorque. O predomínio de clones específicos de MRSA também foram observados na Turquia, Espanha, França, Alemanha, Bélgica e Japão (SOARES, 2001).

No Brasil, um clone epidêmico único (Brazilian Epidemic Clone – BEC) é disseminado em diferentes hospitais de norte a sul do país. BEC têm sido identificado causando infecções em outros países da América do Sul (Argentina e Uruguai) e Europa (Portugal e República Tcheca) (SOUZA, 1998). Porém, não há dados publicados com relação à epidemiologia do MRSA em nossa cidade e estado.

Assim, a caracterização do MRSA por PFGE trará respostas sobre a epidemiologia do microrganismo em Curitiba e região, como também uma possível relação entre os clones encontrados e clone epidêmico brasileiro (BEC).



### 3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

#### 3.1. CASUÍSTICA E AMOSTRAS:

Durante o período de 08 de dezembro de 2000 a 25 de janeiro de 2005 (4 anos) foram armazenados 271 isolados de *S. aureus* resistentes à oxacilina, provenientes de diferentes materiais biológicos, de pacientes internados na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) adulto do HC-UFPR. A UTI adulto do HC-UFPR destina-se à internação de pacientes provenientes dos ambulatórios, unidades de internação, pós-operatórios, dentre outros, caracterizando-se por uma unidade de atendimento geral, sendo representativa de toda a população adulta hospitalar desta instituição.

A coleta das amostras seguiu protocolos específicos para cada procedimento. Destes isolados, tomou-se apenas os que apresentaram o fenótipo de multiresistência ao antibiograma por disco-difusão, totalizando 107 amostras.

Os isolados bacterianos previamente identificados como MRSA foram suspensos em solução para crioprecipitação e armazenados a -80°C para realização de testes posteriores. Os microrganismos foram preparados para o congelamento por incubação em placas de ágar-sangue e incubação até a fase estacionária de crescimento (18 – 24 horas). As colônias puras desenvolvidas na superfície do ágar foram recolhidas com alça esterilizada e transferidas diretamente para um criotubo contendo caldo infusão de cérebro e coração (BHI) e 10% de glicerol, emulsionadas até uma suspensão final densa (REIMER, 2003).

#### 3.2. IDENTIFICAÇÃO DOS *Staphylococcus aureus*

As colônias consideradas suspeitas para *S. aureus* nas placas de ágar sangue de carneiro (AS) e ágar chocolate (AC) apresentando-se de tamanho médio, brancas ou levemente douradas, lisas, com bordos regulares, levemente elevadas e hemolíticas, foram submetidas à coloração de gram, provas de catalase e coagulase ligada (em lâmina). Os

resultados de coagulase ligada foram confirmados pela prova da coagulase livre (em tubo) além de testes confirmatórios para a identificação de *Staphylococcus aureus*, a saber: hemólise em ágar sangue de carneiro, crescimento em meio contendo 7,5% de cloreto de sódio (meio de Chapman), fermentação do manitol (em ágar contendo o açúcar e vermelho de fenol), pigmentação das colônias e atividade da desoxirribonuclease (em ágar DNase), de acordo com técnicas preconizadas na 8ª edição do Manual de Microbiologia Clínica da Sociedade Americana de Microbiologia (BANNERMAN, 2003).

#### Coloração de Gram

Através das características morfo-tintoriais analisadas pelo método de Gram, observa-se a presença de cocos Gram-positivos aos pares ou agrupados. Foram utilizadas como controle para coloração as seguintes cepas: *E. coli* ATCC 25922; *S. aureus* ATCC 25923 (YORK, 2004).

#### Prova da Catalase

A detecção desta enzima foi realizada como descrito por MacFaddin, 2000. Sobre uma lâmina limpa, foi depositada uma alçada de cultivo bacteriano puro e adicionada uma gota de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). A formação de bolhas indica prova positiva e a não formação de bolhas indica prova negativa. Foram utilizadas como controle as seguintes cepas: *S. aureus* ATCC 25923: positiva; *S. pyogenes* ATCC 19617: negativa (YORK, 2004).

#### Prova da Coagulase

Foi realizada a pesquisa da enzima coagulase através da metodologia em lâmina (coagulase ligada) e tubo (coagulase livre), utilizando plasma de coelho liofilizado (Newprov, Pinhais, Paraná, Brasil). Uma alçada da colônia pura e isolada foi depositada à superfície de uma lâmina limpa, acrescentando 0,5 mL de plasma de coelho liofilizado reconstituído. Após homogeneizar, observou-se a presença de grumos e precipitados em

caso de prova positiva (coagulase ligada). Paralelamente, foi inoculada uma alçada de colônia pura e isolada em um tubo contendo 0,5 mL de plasma reconstituído e incubamos a 37°C. As leituras foram realizadas após 4 e 24 horas. A formação de coágulo foi indicativa de prova positiva. As seguintes cepas foram utilizadas como controle: *S. aureus* ATCC 25923: controle positivo; *S. pyogenes* ATCC 19617: controle negativo (YORK, 2004).

#### Prova da Desoxirribonuclease (DNase)

A presença da enzima foi detectada semeando-se, em forma de estria densa, colônias da amostra suspeita em meio para DNase preparado segundo especificações do fabricante. Após o período de incubação de 24 horas a 35°C, o teste foi revelado com a adição de algumas gotas de HCl 1M sobre o crescimento bacteriano. A formação de uma zona clara ao redor das colônias foi interpretada como prova positiva, indicando a hidrólise do DNA, já que os oligonucleotídeos são solúveis no ágar. As seguintes cepas foram utilizadas como controle: *E. coli* ATCC 25922: controle negativo; *S. aureus* ATCC 25923: controle positivo (YORK, 2004).

#### Fermentação do Manitol

Estria-se o inóculo bacteriano na superfície do ágar inclinado, em tubo contendo ágar manitol a 7,5% de NaCl. Ao utilizar o manitol, a cor do meio que originalmente é rosa, torna-se amarela, indicando fermentação por parte da bactéria inoculada. Foram utilizadas como controle as seguintes cepas: *S. aureus* ATCC 25923: cepa positiva; *S. pyogenes* ATCC 19617: cepa negativa (YORK, 2004).

### 3.3. CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA EM MRSA

#### 3.3.1. Teste de Triagem por Disco Difusão

Para a detecção da resistência à oxacilina aplicou-se o método de disco difusão (Kirby Bauer) segundo Munro, 2004, onde inicialmente prepara-se uma suspensão

bacteriana com turvação equivalente à escala 0,5 de MacFarland com o auxílio de aparelho fotométrico (BioMeurieux, França), a qual foi inoculada na superfície do ágar Mueller-Hinton (MHA; Difco, Detroit, Michigan). Foram utilizados disco de oxacilina 1µg (NEWPROV, Pinhais, Brasil) e cefoxitina 30µg (NEWPROV, Pinhais, Brasil). As placas foram incubadas a 35°C durante 24 horas. O controle de qualidade dos discos de antibióticos e do meio de cultura foi realizado para cada lote através de cepa *S. aureus* ATCC 25923 e os diâmetros dos halos obtidos foram comparados aos descritos na tabela 2C, M100-S17, do documento do CLSI 2007.

### 3.3.2. Teste de Triagem por Diluição em Ágar

Foi utilizada placa contendo ágar Mueller-Hinton (Difco, Detroit, Michigan), suplementado com 6µg/ml de oxacilina e 4% de NaCl. A realização destes testes foi baseada nas recomendações do CLSI 2007. O teste consiste no preparo de placas contendo ágar Mueller-Hinton acrescidas de 4% de NaCl e 6 µg/mL de oxacilina. O inóculo bacteriano é preparado em salina segundo a escala 0,5 de McFarland ( $10^8$  UFC/mL) e inoculado no meio com a ajuda de um *swab* (HIRAMATSU, 1997).

### 3.4. TESTE DE TRIAGEM PARA VISA (*S. aureus* Vancomicina-Intermediário)

Todas as amostras foram submetidas ao teste de triagem para detecção de resistência à vancomicina. A pesquisa foi realizada utilizando-se placas de triagem para VISA (*S. aureus* Vancomicina-Intermediário), contendo 4 µg/mL de vancomicina, segundo protocolo proposto por Hiramatsushu e colaboradores em 1997.

### 3.5. TESTE DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

Todas as amostras previamente identificadas como MRSA pelo laboratório de bacteriologia do HC-UFPR foram novamente testadas para confirmação da resistência à oxacilina por disco difusão. Posteriormente foram submetidas ao teste suscetibilidade frente aos antimicrobianos mais utilizados no tratamento clínico, pelos métodos de disco difusão e

ágar diluição para determinação da CIM. Para a detecção da resistência à oxacilina, procedeu-se conforme descrito anteriormente (item 3.3.1 e 3.3.2).

As amostras de MRSA foram testadas pelo método de Kirby-Bauer frente aos seguintes antimicrobianos: amicacina, cefoxitina, ciprofloxacino, eritromicina, gentamicina, linezolid, oxacilina, sulfametoxazol/ trimetoprim, teicoplanina e vancomicina.

### 3.5.1. Determinação da Concentração Inibitória Mínima – CIM

A atividade antimicrobiana de um composto pode ser quantificada com base na determinação da concentração inibitória mínima do composto capaz de inibir o crescimento de um microrganismo em 90 %, sendo o valor chamado de Concentração Inibitória Mínima (CIM).

A determinação da CIM foi realizada pelo método de ágar diluição empregando-se diluições sucessivas para os seguintes antibióticos: amicacina, ciprofloxacino, eritromicina, gentamicina, linezolid, oxacilina, sulfametoxazol/trimetoprim, teicoplanina e vancomicina. A clindamicina não foi incluída devido à indisponibilidade do sal.

Calculou-se a quantidade necessária do antimicrobiano utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\text{Peso (mg)} = \frac{\text{Volume (mL)} \times \text{Concentração } (\mu\text{g / mL})}{\text{*Potência } (\mu\text{g/mg)}}$$

\*expressa no rótulo do frasco de antimicrobiano

As placas de ágar Mueller-Hinton foram preparadas com o número de diluições necessárias para cada antibiótico, sendo a maior diluição duas concentrações acima do

ponto de corte para resistência e a menor diluição, a referente ao ponto de corte padronizado pelo CLSI 2008 (M100-S18), suscetível para a cepa padrão (QUADRO 1).

ANTIBIÓTICO	PONTOS DE CORTE ( $\mu\text{g/mL}$ )		DILUIÇÕES TESTADAS ( $\mu\text{g/mL}$ )
	S	R	
Amicacina	$\leq 16$	$\geq 32$	4 - 128
Ciprofloxacino	$\leq 1$	$\geq 4$	0,25 - 16
Eritromicina	$\leq 0,5$	$\geq 8$	0,12 - 32
Gentamicina	$\leq 4$	$\geq 8$	1 - 32
Linezolida	$\leq 4$	$> 4$	1 - 16
Oxacilina	$\leq 2$	$\geq 4$	0,5 - 16
Sulfametoxazol/trimetoprim	$\leq 2/38$	$\geq 8/152$	0,5/9,5 - 32/608
Teicoplanina	$\leq 8$	$\geq 32$	2-128
Vancomicina	$\leq 2$	$\geq 16$	0,5 - 64

Nota : R – Resistente

S- Sensível

#### QUADRO 1 – INTERPRETAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE POR CIM SEGUNDO O CLSI E DILUIÇÕES TESTADAS PARA CADA ANTIMICROBIANO

Após o preparo, as soluções-estoque foram esterilizadas por filtração em membrana Millipore<sup>®</sup> de 0,22  $\mu\text{m}$  de diâmetro, alíquotadas em frascos de 2 mL e estocadas a 2°C, -20°C ou -70°C conforme recomendação do CLSI M7-A6. As diluições dos antibióticos foram preparadas utilizando água estéril (tipo Milli-Q). A solução-estoque foi a primeira diluição a ser utilizada e, a partir desta, foram realizadas diluições 1:2 até atingir a menor concentração.

Para o preparo dos meios, foi pesado ágar Mueller-Hinton (MHA) em quantidade suficiente para todas as diluições dos antibióticos, segundo especificações do fabricante. Posteriormente o meio foi alíquotado em frascos de rosca com boca, nas quantidades de 48 mL para sulfametoxazol/trimetoprim e 49 mL para os demais antibióticos. Os frascos contendo MHA foram esterilizados em autoclave a 121°C durante 15 minutos e resfriados em banho-maria até atingir a temperatura de aproximadamente 50°C. Em cada frasco foram adicionados 2 mL para sulfazotrim<sup>®</sup> (1 mL de sulfametoxazol e 1 mL de trimetoprim) e 1

mL para os demais antibióticos, totalizando um volume de 50 mL, necessário para atingir o volume de 4-5 mL de meio na placa. O frasco foi homogeneizado e o ágar distribuído em placa de petri de 150 mm x 15 mm. As placas foram refrigeradas e utilizadas até 48 horas após seu preparo.

No preparo do inóculo, uma suspensão de concentração referente ao tubo 0,5 de MacFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL) foi acertada com o auxílio de aparelho fotométrico, em absorbância de 625 nm. Como o inóculo final necessário para esta prova é de  $10^4$  UFC por spot de 5-8 mm de diâmetro, a suspensão bacteriana foi diluída 1:10 em solução salina estéril, com concentração final de  $10^7$  UFC/mL. Os inoculadores depositam 1-2  $\mu$ L sobre a superfície do ágar, obtendo-se cerca de  $10^4$  UFC em cada ponto de inoculação.

Foram distribuídos 100  $\mu$ L de cada suspensão bacteriana em placas de ELISA de 96 poços. Com o auxílio de um multi-inoculador de 96 pinos, foram inoculadas as amostras, iniciando da menor concentração do antimicrobiano para a maior. Ao início e fim de cada séries de aplicação de amostras nas placas de antimicrobiano, foi incluída uma placa de MHA pura, avaliando a viabilidade dos microrganismos na ausência de antimicrobiano, bem como se houve contaminação ou carreamento de antimicrobiano. Em seguida, as placas foram incubadas a 35 – 37°C por 24 horas. Após a incubação, a CIM foi considerada como a menor concentração de agente antimicrobiano para a qual não se observou crescimento do microrganismo, avaliado por luz transmitida.

Foi utilizado como controle de qualidade para este teste a cepa *S. aureus* ATCC 29213 e comparamos os limites aceitáveis com aqueles apresentados na Tabela 2C do documento M100-S17 do CLSI (CLSI, 2007).

### 3.6. ANÁLISE DO DNA CROMOSSÔMICO DE *S. aureus* por *PULSED FIELD GEL ELECTROPHORESIS* – PFGE

A análise do DNA cromossômico baseia-se na restrição do DNA por enzimas que irão reconhecer sítios raros (infreqüentes) e clivarão o DNA em fragmentos grandes. O

número de fragmentos vai variar de um isolado clínico para outro. Resumidamente, para a técnica de PFGE, as células de MRSA obtidas foram embebidas em agarose de baixo ponto de fusão, a parede celular bacteriana lisada com lisozima e, após tratamento com proteinase K, submetidas a uma série de lavagens com tampão Tris-EDTA. Finalmente, o DNA é digerido com endonuclease de restrição *Sma*I e os fragmentos separados por eletroforese em campo pulsado, corados com brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta.

### 3.6.1. Preparação dos Blocos de Agarose

As amostras de *S. aureus* criopreservadas foram semeadas em ágar sangue de carneiro 5% (DIFCO-Detroit, USA) e incubadas a 35°C durante 24 horas. No dia seguinte, repicadas em caldo tripticaseína de soja (TSB) e incubadas a 35°C por uma noite. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 20 minutos. O sedimento foi ressuspensão em 1ml de solução SE (Salina-EDTA) estéril e transferido para um tubo de micro-centrífuga tipo *Eppendorff* previamente pesado. Centrifugou-se a suspensão a 14.000 rpm por 1 minuto e descartou-se o sobrenadante. O sedimento foi então pesado e ressuspensão em solução SE, para uma concentração final de 100µg de massa bacteriana por µL. Desta suspensão, 10 µL foram transferidos para um tubo de micro-centrífuga contendo 15µL de lisostafina 100µg/mL e 300µL de tampão SE. Acrescentou-se então 300µL de agarose de baixo ponto de fusão a 2%. Esta suspensão foi transferida para os moldes em placa de acrílico, permanecendo a 4°C por 30 minutos para a solidificação dos blocos. Após esse período, os blocos foram transferidos para um frasco contendo solução de lise (anexo 1). Estes frascos foram incubados por uma noite em banho-maria a 56°C sob leve agitação. O procedimento de lise foi repetido duas vezes. Ao final, os blocos foram lavados com 3,0 mL de solução tampão TE (Tris-EDTA) (4 lavagens com incubação de 2 a 8 °C por 30 minutos) e armazenados nesta solução até serem submetidos à digestão enzimática e eletroforese.



### 3.6.2. Digestão dos Blocos de Agarose

A digestão do DNA cromossômico foi realizada com a enzima de restrição *Sma*I, que reconhece de 12 a 20 sítios de restrição e cliva seqüências de nucleotídeos que aparecem poucas vezes ao longo do DNA de *S. aureus* (PREVOST, 1992).

Para o tratamento com enzima de restrição, cerca de 1/3 do bloco de agarose de cada amostra foi transferido para um tubo de micro-centrífuga tipo Eppendorff contendo 100µl de tampão da enzima (anexo 1) e incubado de 2 a 8°C por 30 minutos. Em seguida, o tampão foi descartado e adicionado 100µl de tampão da enzima fresco acrescido da enzima *Sma*I (20U por amostra). Os blocos foram incubados por uma noite em banho-maria a 30°C.

### 3.6.3. Eletroforese em Gel de Agarose

A eletroforese em campo pulsado foi realizada em gel de agarose a 1,2% em TBE 0,5x (90mM Tris, 90mM ácido bórico, 2mM EDTA), no equipamento CHEF DRII System (BIO-RAD), com intervalos de tempo de pulso de 1 a 80 segundos, ângulo de 120°, temperatura de 14°C e 6,0 volts/cm. Após 24 horas, os géis foram corados com solução aquosa contendo 0,5 µg/mL de Brometo de Etídio (EB) e fotografados sob transiluminação com luz ultravioleta. Foi utilizado como padrão de peso molecular DNA *Lambda Ladder PFG Marker* (NEW ENGLAND – Biolabs inc., Beverly, MA-USA) 250µg, com extensão de bandas 500 pb a 12 kb.

### 3.6.4. Análise dos perfis eletroforéticos

O PFGE é uma modificação da eletroforese convencional, com campo elétrico constante, no qual a direção da corrente elétrica sofre alterações freqüentes, permitindo a separação de moléculas grandes de DNA. Além disso, o uso da enzima de restrição endonuclease *Sma*I que apresenta um sítio de reconhecimento envolvendo diversas bases

nitrogenadas, permite a digestão do DNA cromossômico, em um número limitado de fragmentos relativamente grandes (10 – 800 Kb).

Tenover e colaboradores propuseram um sistema para padronizar a interpretação dos padrões de PFGE com relação à determinação da correlação entre cepas. No seu esquema, as amostras bacterianas que apresentam o perfil eletroforético idêntico em número e distribuição de bandas são denominadas indistinguíveis e, diferindo em um único evento genético, representado como uma diferença de uma a três bandas, são intimamente relacionadas. Amostras diferindo de quatro a seis bandas, representando duas alterações genéticas independentes, são possivelmente relacionadas. Amostras bacterianas contendo seis ou mais bandas diferentes, representativas de três ou mais alterações genéticas, são consideradas diferentes ou não clonais (TENOVER, 1995).

#### 4. RESULTADOS

No período de 4 anos foram armazenados 271 isolados de *S. aureus* resistentes à oxacilina provenientes de líquidos cavitários, sangue, aspirado traqueal, catéter, LBA, escarro e secreção uretral, de pacientes internados no HC-UFPR. Destes isolados 107 foram obtidos de indivíduos internados na UTI adulto totalizando 86 pacientes (TABELA 1).

TABELA 1 – DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS UTILIZADAS NO ESTUDO:

<b>Amostra</b>	<b>Total</b>	<b>UTI</b>
<b>Sangue</b>	86	38 (35,5%)
<b>Secreção traqueal</b>	62	30( 28,0%)
<b>Catéter</b>	41	16 (15,0%)
<b>Escarro</b>	45	7 (6,5%)
<b>LBA</b>	18	10 (9,4%)
<b>Líqu. Peritoneal</b>	10	3 (2,8%)
<b>Líqu. Pleural</b>	6	2 (1,9%)
<b>Secreção uretral</b>	2	1 (0,9%)
<b>Todas</b>	271	107 (100%)

Legenda: LBA – Lavado Broncoalveolar; Líq. Peritoneal – Líquido Peritoneal; Líq. Pleural – Líquido Pleural

Os valores relativos das amostras obtidas na UTI adulto do HC-UFPR frente às amostras provenientes de outras unidades do hospital podem ser visualizadas a seguir (GRÁFICO 1).

O predomínio de amostras como sangue, secreção traqueal e catéter se devem principalmente pelo longo período de ocupação hospitalar, necessidade de acessos arteriais e venosos e gravidade dos casos atendidos na UTI adulto do HC-UFPR.

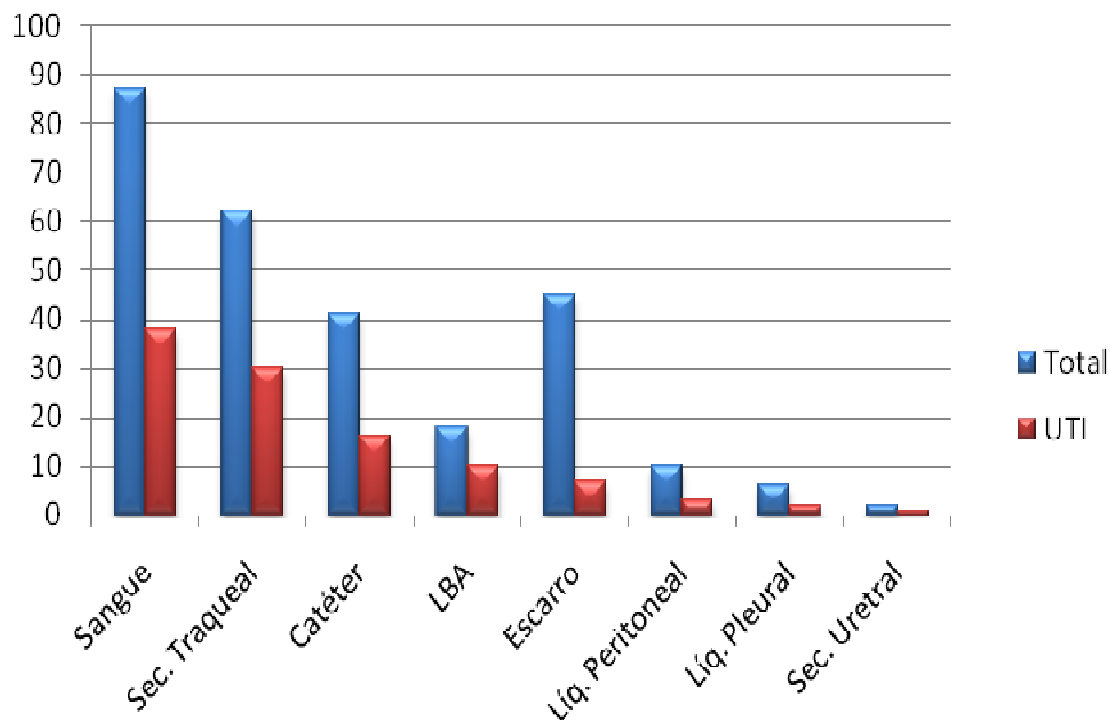


GRÁFICO 1 – AMOSTRAS BIOLÓGICAS INCLUÍDAS NO ESTUDO

A detecção da resistência à oxacilina foi também realizada pelo método de disco difusão para a oxacilina (1 µg) e cefoxitina (30 µg) e os halos de inibição comparados com os diâmetros recomendados pelo CLSI 2007. Não houve discrepância entre os resultados dos dois antimicrobianos, já que todos os isolados foram resistente.

As amostras foram submetidas às análises de suscetibilidade aos antimicrobianos (fenótipo) e molecular (genótipo), através da técnica de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE). Quanto ao gênero dos indivíduos cujas amostras foram incluídas no estudo, 66 (61,7%) eram do sexo masculino e 41 (38,3%) do sexo feminino.

A determinação da CIM dos antimicrobianos testados, demonstrou a maioria deles com baixa potência, com CIM<sub>50</sub> acima dos pontos de corte para suscetibilidade, sendo a oxacilina o menos ativo com nenhum isolado suscetível. Analizando-se as suscetibilidades, linezolida, vancomicina e teicoplanina foram os antimicrobianos com o maior número de isolados suscetíveis (100%), todos com o CIM<sub>90</sub> abaixo dos pontos de corte para suscetibilidade e, os outros agentes apresentando suscetibilidade variando entre 0 e 2% (QUADRO 2).

<b>Antibiótico</b>	<b>CIM50 (µg/mL)</b>	<b>CIM90 (µg/mL)</b>	<b>Suscetibilidade %</b>
Amicacina	64 µg/mL	128 µg/mL	1%
Ciprofloxacino	16 µg/mL	>16 µg/mL	1%
Eritromicina	>32 µg/mL	>32 µg/mL	0,50%
Gentamicina	>32 µg/mL	>32 µg/mL	2%
Linezolida	2 µg/mL	2 µg/mL	100%
Oxacilina	>16 µg/mL	>16 µg/mL	0%
Sulfa/Trimetoprim	32/512 µg/mL	32/512 µg/mL	1%
Teicoplanina	1 µg/mL	2 µg/mL	100%
Vancomicina	2 µg/mL	2 µg/mL	100%

QUADRO 2 – SUSCETIBILIDADE DAS AMOSTRAS DE *S. aureus* E VALORES DE CIM<sub>50</sub> E CIM<sub>90</sub> DOS ANTIBIÓTICOS TESTADOS

Todos os isolados de MRSA foram submetidos à tipagem molecular por PFGE, após digestão do DNA cromossômico com *Sma*I. Assim, foram obtidos 6 (seis) perfis eletroforéticos distintos (FIGURA 9), sendo que segundo os critérios de Tenover e colaboradores (TENOVER,1995), 86 isolados (80,4%) apresentaram um perfil eletroforético indistinguível entre si, sendo denominados no presente estudo como clone A (clone endêmico).

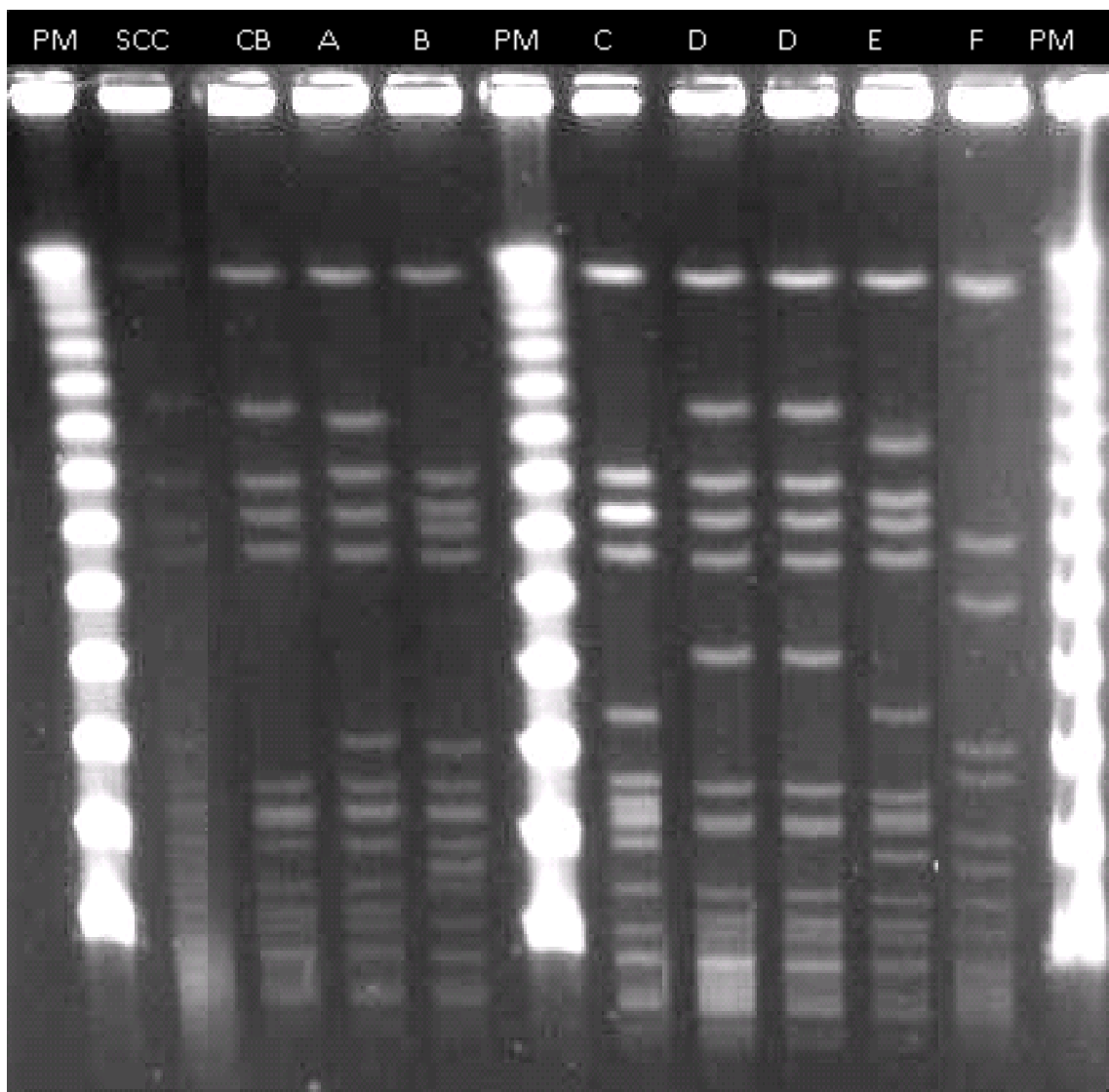


FIGURA 9 – PERFIL ELETROFORÉTICO DOS 6 CLONES IDENTIFICADOS NO ESTUDO

Legenda: Bandas de DNA digeridos por *Sma*I. PM: DNA Ladder (Invitrogen, USA) bandas 500 pb a 12 kb, marcador de peso molecular; SCC: SCCmecIII; CB: Clone Brasileiro; Perfis eletroforéticos encontrados no presente estudo e denominados A, B, C, D, E e F.

A comparação do clone A com o perfil eletroforético dos demais isolados apresentou 08 (oito) isolados com perfil B (7,5%), intimamente relacionados ao clone A, 05

(cinco) isolados do perfil C (4,6%), possivelmente relacionados ao clone A, 04 (quatro) isolados do perfil D (3,7%), intimamente relacionados ao clone A, 02 (dois) isolados do perfil E (1,9%), possivelmente relacionados ao clone A e 02 (dois) isolados do perfil F (1,9%), diferentes do clone A (GRÁFICO 2).

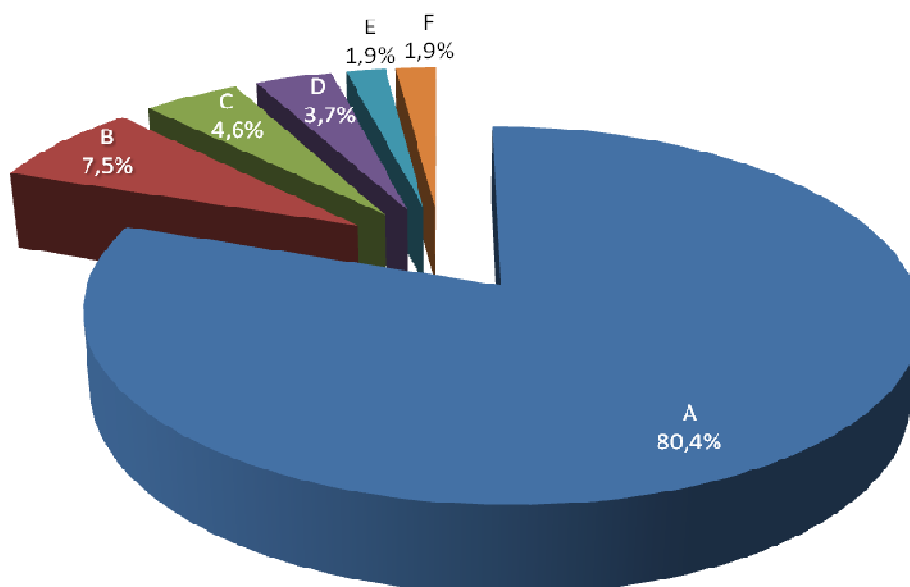


GRÁFICO 2 – PREVALÊNCIA DOS PERFÍS OBTIDOS NO ESTUDO EM RELAÇÃO AO NÚMERO TOTAL DE AMOSTRAS

Também foram analisados os perfis eletroforéticos do clone epidêmico brasileiro (CEB) e *Staphylococcal Chromosome mec III* (SCCmecIII), sendo estes perfis comparados aos perfis eletroforéticos obtidos com os clones A (endêmico), B, C, D, E e F do presente trabalho.

Após analisados os géis de PFGE de todas as amostras de *S. aureus* estudadas pelos programas Gel Pro-Analyzer e NTSYS, construiu-se um dendrograma de similaridade baseado no polimorfismo dos fragmentos de restrição (FIGURA 10).

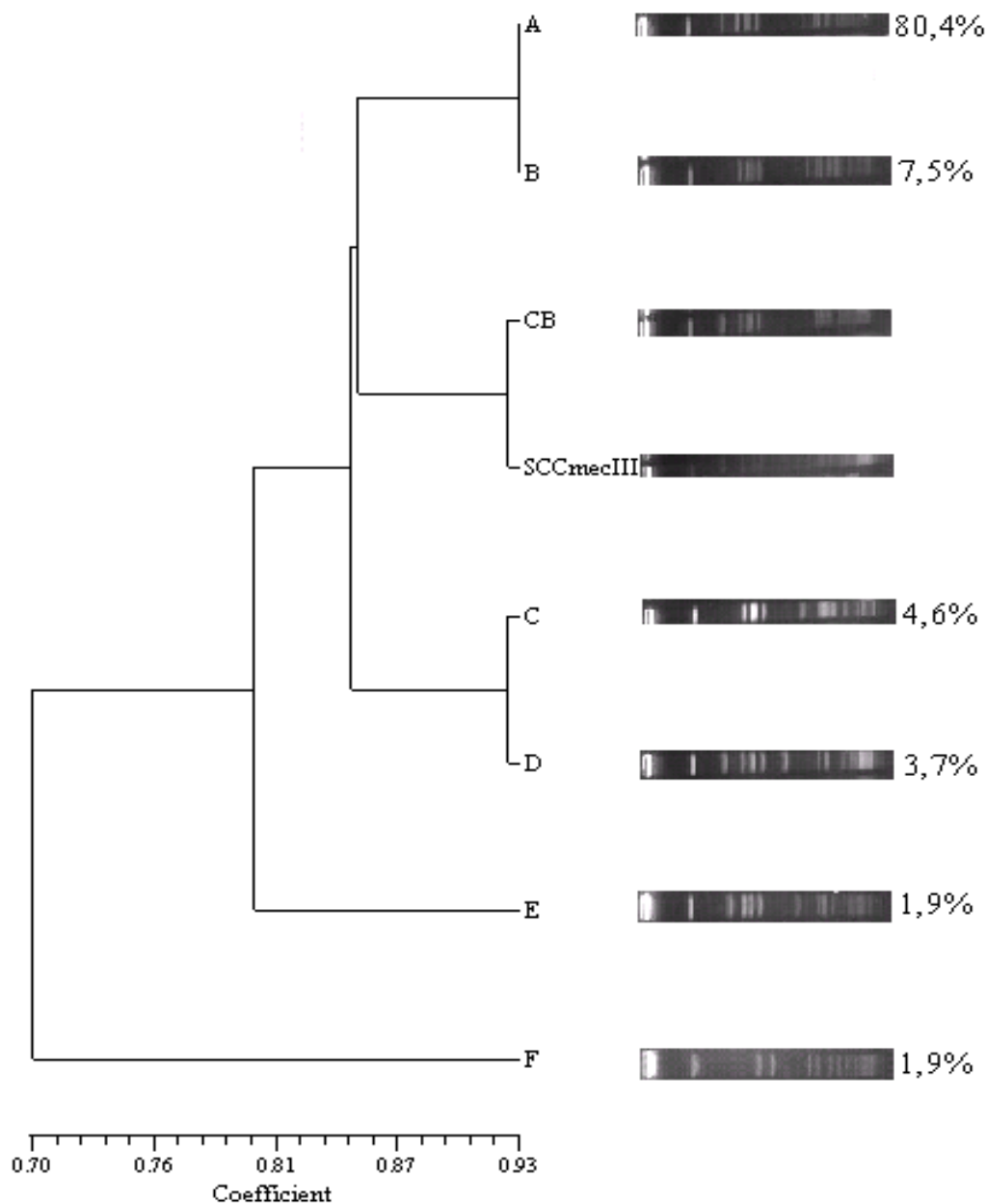


FIGURA 10 – DENDROGRAMA DOS CLONES ENCONTRADOS

Legenda: “A” clone A – 86 isolados (80,4%); “B” perfil B – 8 isolados (7,5%); “CB” Clone Brasileiro; “SCCmecIII” *Staphylococcal Chromossome mec III*; “C” perfil C – 5 isolados (4,6%); “D” perfil D – 4 isolados (3,7%); “E” perfil E – 2 isolados (1,9%); “F” perfil F – 2 isolados (1,9%).

A análise do dendrograma nos permite visualizar a formação de um grande grupo, compreendido pelos perfis eletroforéticos A, B, C, D e E, representando 80,4%, 7,5%,



4,6%, 3,7% e 1,9% dos isolados, respectivamente, sendo os perfis A e B classificados como intimamente relacionados ao clone brasileiro – CB, além dos perfis C, D e E classificados como possivelmente relacionados. O outro grupo é composto por apenas um representante, o perfil eletroforético F, com 2 isolados (1,9%), que segundo os critérios de Tenover, é classificado como diferente.

19 indivíduos possuíam mais de um isolado, de materiais biológicos diferentes, totalizando 39 amostras (36,4%), sendo que 17 deles possuíam o clone epidêmico obtido no estudo (clone A) em seus isolados (TABELA 2).

TABELA 2 – PACIENTES COM MAIS DE UMA AMOSTRA INCLUÍDA NO ESTUDO

DATA	AMOSTRA	SÍTIO INFECCIOSO	PERFIL ELETROFORÉTICO	Nº BLOCO
25/4/2003	Sec. Traqueal	Respiratório	A	1
12/5/2003	LBA	Respiratório	A	3
12/6/2003	Sangue	Sangüíneo	A	4
19/7/2003	Sec. Traqueal	Respiratório	A	9
19/7/2003	Sangue	Sangüíneo	A	10
25/7/2003	Catéter	Sangüíneo	A	11
25/7/2003	Sec. Traqueal	Respiratório	A	12
7/7/2003	Escarro	Respiratório	C	7
30/7/2003	Líqu. Peritoneal	Cavitário	C	14
3/11/2003	Sec. Traqueal	Respiratório	A	31
20/11/2003	Sec. Traqueal	Respiratório	A	34
1/12/2003	Catéter	Sangüíneo	A	36
5/12/2003	Sangue	Sangüíneo	A	37
4/1/2005	Sec. Traqueal	Respiratório	A	39
9/1/2005	Catéter	Sangüíneo	A	40
25/1/2005	Catéter	Sangüíneo	A	42
24/1/2005	Sangue	Sangüíneo	C	44
14/5/2004	Sangue	Sangüíneo	A	53
17/5/2004	Sangue	Sangüíneo	A	54
17/6/2004	Sangue	Sangüíneo	A	57
23/6/2004	Sec. Traqueal	Respiratório	A	60
2/8/2004	Sangue	Sangüíneo	A	63
9/8/2004	Sangue	Sangüíneo	A	65
27/8/2004	Catéter	Sangüíneo	A	66
30/8/2004	Catéter	Sangüíneo	A	68
14/10/2004	Sangue	Sangüíneo	A	73
22/10/2004	Sangue	Sangüíneo	A	75
29/10/2004	LBA	Respiratório	A	76
26/10/2004	Sangue	Sangüíneo	A	77
24/10/2002	Catéter	Sangüíneo	A	83
24/10/2002	Sangue	Sangüíneo	A	84
17/1/2003	Sangue	Sangüíneo	A	88
22/1/2003	Sangue	Sangüíneo	A	90
15/3/2003	Sangue	Sangüíneo	A	94
15/3/2003	Sangue	Sangüíneo	A	95
26/2/2003	Catéter	Sangüíneo	A	96
25/2/2003	LBA	Respiratório	A	98
8/11/2001	Sangue	Sangüíneo	A	104
8/11/2001	Líqu. Peritoneal	Cavitário	A	105

Legenda: LBA – Lavado Broncoalveolar; Sec. Traqueal – Secreção Traqueal; Líq. Peritoneal: Líquido Peritoneal.

A incidência do clone epidêmico por sítio infeccioso pode ser observada no gráfico 3 onde foram agrupadas as amostras como segue: sangüíneo, compreendendo amostras de hemocultura e catéter; respiratório correspondendo às amostras de escarro, lavado broncoalveolar e secreção traqueal; e cavitário, com as amostras de líquido pleural, líquido peritoneal e secreção uretral. De um total de 87 isolados pertencentes ao clone epidêmico obtido no estudo (clone A), 50 isolados classificados como sítio sangüíneo representam 57,5%, 33 isolados de sítio respiratório equivalem à 38% e, 4 isolados de sítio cavitário representam 4,5%.

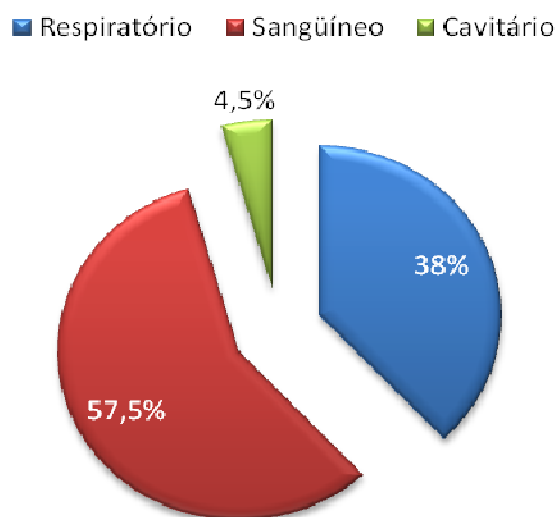


GRÁFICO 3 – DISTRIBUIÇÃO DO CLONE EPIDÊMICO POR SÍTIO INFECCIOSO

A distribuição dos diferentes perfis eletroforéticos obtidos no estudo por sítio infeccioso demonstra numericamente um dado importante, como já citato anteriormente o longo tempo de permanência na unidade de internamento, bem como a necessidade de instalação de dispositivos de acesso como catéteres e manutenção de sinais vitais como ventilador mecânico, elevam o número de infecções nos referidos sítios (sangüíneo e respiratório).

## 5. DISCUSSÃO

A grande variedade de fatores de virulência produzidos pelo *S. aureus* associado a sua versatilidade em adquirir resistência aos antimicrobianos, tornam este microrganismo responsável por altas taxas de morbidade e mortalidade em hospitais. No Brasil, *S. aureus* é o microrganismo mais comumente isolado em infecções nosocomiais (OLIVEIRA, 2001).

Erros na detecção da resistência à oxacilina pode trazer sérias conseqüências clínicas. Resultados de falsa-suscetibilidade podem levar a falhas na terapêutica antimicrobiana e conseqüente disseminação de de MRSA se medidas apropriadas de controle de infecção hospitalar não estiverem devidamente aplicadas. Por outro lado, resultados de falsa-resistência podem levar a um aumento nos custos de internação e tratamento antimicrobiano com a utilização de precauções de isolamento e uso excessivo de glicopeptídeos. Problemas na detecção de MRSA podem estar relacionados à baixos níveis de expressão da resistência à oxacilina em alguns isolados, diminuindo a sensibilidade do teste por disco-difusão com oxacilina. Nestes casos a cefoxitina apresenta melhores resultados em termos de sensibilidade por estimular a expressão da resistência à meticilina mais fortemente que a oxacilina. No presente estudo, não foram encontrados resultados discrepantes com o uso do disco de oxacilina quando comparados à aplicação do disco de cefoxitina, sendo ambos os resultados resistentes. Tal afirmação demonstra tratar-se de isolados altamente resistentes à oxacilina, fato confirmado através dos resultados de concentração inibitória mínima com oxacilina (CIM >16 µg/mL).

A resistência a múltiplos antimicrobianos aumenta a habilidade do microrganismo em sobreviver no ambiente hospitalar. Devido a isso, medidas que promovem a prescrição racional e controle do uso de antimicrobianos são alternativas viáveis na tentativa de contenção do avanço destes microrganismos nas unidades hospitalares. Entretanto, a relação entre MRSA e o uso de antimicrobianos é complexa e sua via de desenvolvimento em ambientes hospitalares requer mais investigação (OLIVEIRA, 2001).

No Brasil, o aumento da incidência de hVISA e VISA entre isolados pertencentes ao BEC tem sido reportado (OLIVEIRA, 2001). *S. aureus* com suscetibilidade intermediária ou resistente à vancomicina não foram detectados no presente estudo. Porém, devido ao antimicrobiano ter seu uso aumentado nos últimos anos, o isolamento destas variantes são potencialmente esperadas, devendo-se monitorar exaustivamente.

Neste trabalho, com a realização de testes fenotípicos de referência para determinação da resistência, como a detecção da concentração inibitória mínima (CIM), foi possível investigar a presença de isolados com fenótipos raros de resistência, como VISA ou VRSA, os quais não foram detectados, reforçando a necessidade de manutenção da vigilância, visto a frequência de isolamentos de cepas de VISA por todo o mundo.

A detecção da concentração inibitória mínima foi realizada utilizando-se a técnica de ágar-diluição. Conforme descrita anteriormente, é trabalhosa quando comparada à utilização de equipamentos automatizados e E-test, mas fornece dados consistentes, sendo caracterizada como método de referência segundo o CLSI 2008.

Resistência a antimicrobianos tem múltiplas implicações no que diz respeito a surtos. Indivíduos infectados por microrganismos resistentes, como o MRSA, apresentam elevada mortalidade. Isto é parcialmente devido ao fato de infecções por organismos resistentes estar associado com o início inapropriado de antibioticoterapia, o principal determinante de sobrevivência em infecções sérias. Além disso, o risco aumentado de morte pode ser devido a esses patógenos possuírem inúmeros fatores de virulência. Ainda, patógenos resistentes contribuem para o aumento dos custos hospitalares. Infecções por MRSA, por exemplo, prolongam o período de estadia em hospitais e unidades de terapia intensivas (UTI) (SHORR, 2007).

Estudos dos primeiros isolados de MRSA mostraram que o componente genético chave, responsável pela resistência, o gene *mecA* não é nativo do genoma de *S. aureus*. O *Staphylococcal Chromosome Cassette mec* (SCC*mec*), tem sido caracterizado como um novo elemento móvel de resistência que difere de transposons e bacteriófagos. MRSA

tipicamente se dissemina através de clones. Entretanto, é conhecido que o gene *mec* tem sido transferido entre isolados de *S. aureus* e, possivelmente, entre outras espécies de *Staphylococcus* (APPELBAUM, 2007).

Relacionado à significância e impacto na mortalidade do MRSA, Cosgrove e colaboradores realizaram uma meta-análise dos estudos de bacteremia por *S. aureus*, comparando a sobrevivência de indivíduos com MRSA versus MSSA. Apesar de limitado devido à muitos estudos incluídos na meta-análise não descreverem os antimicrobianos prescritos inapropriadamente, a bacteremia por MRSA apresentou uma probabilidade duplicada de morte. Em um segundo estudo, Cosgrove e colaboradores reportaram que infecções por MRSA (bacteremia), foram associadas com um maior período de internação hospitalar, bem como maior custo de tratamento quando comparado a infecções por MSSA. Em um estudo similar, uma análise retrospectiva de pacientes críticos com bacteremia, Blot e colaboradores reportaram que infecções por MRSA frente o MSSA, demonstraram maiores índices de evolução para falência renal aguda e instabilidade hemodinâmica, longa permanência em UTI e uso de ventilação mecânica.

Infecções por MRSA constituem um problema crescente, especialmente em instituições onde os níveis de resistência são altos. As características epidemiológicas e microbiológicas dos patógenos têm mudado rapidamente devido a pressão seletiva do meio. Isolados de MRSA são comumente encontrados em serviços de saúde e, mais recentemente, na comunidade. MRSA multiresistentes avançam rapidamente, incluindo os isolados VISA. Existem avanços relevantes na determinação das características genéticas do MRSA, entretanto este aspecto não está completamente entendido e, novas questões têm sido levantadas, como por exemplo, a importância do PVL como fator de virulência em CA-MRSA. Opções no tratamento de infecções por *S. aureus* multiresistentes são poucas e, com novas estirpes emergentes, as opções se tornam cada vez mais limitadas (APPELBAUM, 2007).

Existem 6 subtipos de *SCCmec* identificados (tipos I – VI), os quais variam em tamanho de 20 a 68 kb. Os subtipos menores (I, IV, V e VI) codificam apenas

recombinases e genes regulatórios para resistência a meticilina. Eles não carregam elementos transponíveis e genes codificando resistência a outros antimicrobianos que não  $\beta$ -lactâmicos. Isolados hospitalares (HA-MRSA) tipicamente possuem subtipos SCC*mec* I, II ou III e, raramente carregam o gene para PVL. Em contrapartida, os tipos IV, V e VI estão associados à isolados da comunidade (CA-MRSA) e, ao menos o tipo IV, freqüentemente carrega o gene para PVL (DERESINSKI, 2005).

Notadamente, alguns tipos SCC*mec* carregam vários elementos genéticos adicionais (*Tn554*, que codifica resistência aos macrolídeos, clindamicina e streptograminas e, *pT181*, o qual codifica resistência às tetraciclina) que podem conferir resistência a outras classes de antimicrobianos. Esses elementos genéticos são especialmente comuns em HA-MRSA (APPELBAUM, 2007).

Tipagem de *S. aureus* tem se tornado uma importante ferramenta no estudo da origem dos isolados, relação clonal e epidemiologia dos surtos. Dentre outros, o propósito deste estudo foi determinar o perfil clonal dos isolados de MRSA provenientes da UTI do HC-UFPR, podendo estabelecer níveis de disseminação e elucidar a epidemiologia do MRSA e seus clones epidêmicos nesta instituição.

Após determinar a suscetibilidade à antimicrobianos, foi usado DNA genômico digerido *Sma*I separado por PFGE para caracterizar isolados de MRSA e estabelecer o genótipo por PFGE. Os resultados obtidos apontam para uma prevalência de um clone em 80,4% dos isolados da UTI do HC-UFPR, representando uma ampla disseminação.

Estudos epidemiológicos com diferentes técnicas de tipagem molecular têm indicado uma ampla disseminação geográfica de MRSA, resultante de um número relativamente pequeno de clones. Os sete principais clones de MRSA (Ibérico, Brasileiro, Hungaro, Nova Iorque/Japão, pediátrico, EMRSA-15 e EMRSA-16), têm sido identificados como causadores das principais infecções hospitalares por *S. aureus* no mundo, indicando sua habilidade em causar infecções, persistir e se disseminar, até mesmo entre continentes (PÉREZ-ROTH, 2004).

Até o presente momento, nenhum estudo epidemiológico envolvendo tipagem de MRSA havia sido feito na cidade de Curitiba-PR. Neste estudo, o perfil eletroforético denominado clone A, possui uma ampla distribuição entre os isolados avaliados, apresentando-se intimamente relacionado ao clone epidêmico brasileiro (BEC) de MRSA previamente descrito.

A comparação dos resultados obtidos no presente trabalho com o de outros estudos leva a considerar que o clone epidêmico encontrado entre as amostras coletadas na UTI adulto do HC-UFPR, pelo seu caráter intimamente relacionado ao BEC, está amplamente disseminado em nível local. Estudos complementares, incluindo outras instituições em nossa região, podem fornecer informações valiosas no que diz respeito à presença de clones epidêmicos causando surtos.

Notadamente, a análise do dendrograma apresenta uma elevada similaridade entre os perfis eletroforéticos obtidos por PFGE (superior a 80%) das amostras estudadas, sugerindo terem sido originadas a partir de um genótipo comum que, após mutações pontuais como aquisições e deleções no cromossomo bacteriano, apresentam-se íntima ou possivelmente relacionadas, mas todas com o fenótipo multirresistente. Não é possível afirmar precisamente tal informação sem a aplicação de métodos genotípicos complementares como MLST (*Multi Locus Sequence Typing*) ou sequenciamento, podendo este trabalho fomentar demais pesquisas a esse respeito.

Outros fatores podem também contribuir para disseminação deste microrganismo endêmico como a capacidade de colonizar, se multiplicar e invadir epitélios e mucosas do hospedeiro, bem como a habilidade de resistir à pressão seletiva de ambientes hospitalares. Essa situação destaca a importância do monitoramento da distribuição e rotas de disseminação dos clones endêmicos de MRSA (EMRSA), em ambos os níveis, no hospital e entre localidades distantes (PÉREZ-ROTH, 2004). Muitas outras condições facilitam a disseminação do MRSA de um hospital a outro e, entre cidades e Estados no Brasil. Dentre estas, hospitais superlotados, a transferência de indivíduos entre hospitais, muitas vezes em

diferentes cidades e, a deficiência do controle do uso de antimicrobianos de amplo espectro, por parte das comissões de controle de infecção hospitalar (PANNUTI, 1995).

Uma condição crucial para prever surtos é enfatizar o aumento na coleta e análise de dados epidemiológicos. Entender o comportamento local das infecções nosocomiais e informações de prevalência e suscetibilidade, torna possível desenvolver estratégias eficientes na abordagem e acompanhamento de indivíduos hospitalizados com infecções graves (SHORR, 2007).

Apesar de diferentes técnicas fenotípicas e, mais recentemente moleculares, estarem disponíveis para diferenciação de *S. aureus*, nenhum método é claramente superior em todas as condições. Atualmente, análise de macrorrestrrição por PFGE é a técnica padrão do CDC para tipagem de isolados de *S. aureus* e tem sido usado com sucesso no estudo de disseminação, especialmente em ambientes hospitalares devido ao seu alto poder discriminatório (SHOPSIN, 1999).

Em trabalhos prévios, Lencastre e colaboradores usaram PFGE para determinar linhagens de MRSA que circulam na Europa, América do Sul e Estados Unidos e, nomeando as linhagens, como clone arcaico, clone ibérico, clone pediátrico e clone Tóquio/Nova Iorque. Em trabalho similar, Simor e colaboradores usaram PFGE para determinar 4 (quatro) linhagens de MRSA no Canadá, designadas CMRSA de 1 a 4. Estes outros estudos têm mostrado que PFGE pode identificar linhagens estáveis de MRSA e pode ser usado para determinar a via de disseminação dessas linhagens de continente a continente por extensos períodos de tempo (McDOUGAL, 2003).

Portanto, PFGE é considerado o padrão ouro para estabelecer a relação clonal em nível local e parece ser bem discriminatória para comparações globais. Ao contrário, MLST tem sido verificado como um método adequado para estudos epidemiológicos globais e de longa duração (PÉREZ-ROTH, 2004).



As ferramentas utilizadas no presente estudo, incluindo os testes fenotípicos e de tipagem molecular, especificamente o PFGE, mostraram-se técnicas de boa reprodutibilidade, confiáveis em termos de resultado, alto nível discriminatório e ausência de resultados duvidosos, demonstrando fácil interpretação.

No passado, o compartilhamento dos dados de PFGE entre laboratórios era difícil e os resultados de tipagem para o mesmo microrganismo, realizados em diferentes laboratórios, freqüentemente eram discordantes. Entretanto, avanços recentes em softwares de análise de gel permitem a criação e armazenamento de uma grande base de dados, a fim de normatizar a análise de fragmentos e bandas similares com relativa facilidade. Normatização da análise de bandas e fragmentos usando padrões estabelecidos e o advento de ferramentas para intercâmbio de dados, servem ambas para facilitar a troca de informações entre laboratórios de referência, mesmo em diferentes países (McDOUGAL, 2003).

A utilização dos critérios de análise de bandas propostos por Tenover, bem como a aplicação de softwares de análise de perfis eletroforéticos por similaridade, permitiram a obtenção de dados consistentes no presente estudo, tanto na identificação de clones epidêmicos como na detecção de surtos na instituição estudada. Dessa forma, as metodologias empregadas apresentaram-se como ferramentas indispensáveis para a obtenção de resultados confiáveis em termos de vigilância epidemiológica, bem como na investigação de mudanças no perfil de resistência e presença de surtos. Assim, os dados encontrados podem ser compartilhados com outras instituições e laboratórios a fim de fornecer elementos para comissões de controle de infecção hospitalar, elaboração de procedimentos de contenção de surtos e de disseminação bacteriana nas respectivas unidades de saúde.

## 6. CONCLUSÕES

- Não houve discrepância entre os resultados obtidos pelo método de disco-difusão com oxacilina e cefoxitina e os resultados de resistência por disco-difusão e CIM para oxacilina;
- CIM por ágar-diluição mostrou-se uma técnica que apresenta resultados confiáveis e valiosos no estudo fenotípico de resistência bacteriana;
- A técnica de ágar diluição como metodologia de triagem para detecção de VISA e VRSA apresentou um alto valor preditivo negativo (VPN), pois todas as amostras eram suscetíveis (ausência de crescimento), fato comprovado pela detecção da CIM para a vancomicina;
- PFGE foi uma ferramenta de análise de DNA por macrorestrição eficiente para o estudo epidemiológico de MRSA, apresentando discriminação suficiente para determinar diferenças entre os clones isolados, podendo ser utilizado no laboratório de rotina em microbiologia;
- O perfil eletroforético prevalentemente encontrado no presente estudo evidenciou ser intimamente relacionado ao clone epidêmico brasileiro (BEC).
- A tipagem molecular de microrganismos fornece elementos indispensáveis para a obtenção de dados consistentes, podendo estes ser compartilhados entre laboratórios e unidades de vigilância epidemiológica para detecção e contenção de surtos nas unidades de saúde.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMMERLAAN, H. S. M. & BONTEN, M. J. M., **Daptomycin: Graduation Day**, CMI, v.12, suppl. 8, p. 22 – 28, Dec. 2006.

APPELBAUM, P. C., **The Emergence of Vancomycin-intermediate and Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus***. Clin Microbiol Infect; 12 (Suppl. 1): 16 – 23, 2006.

APPELBAUM, P. C., **MRSA – the Tip of the Iceberg**. Clin Microbiol Infect; 12 (Suppl. 2): 3 – 10, 2006.

APPELBAUM, P. C., **Microbiology of Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus***, Clin Infect Dis; 45 (suppl. 3): 165 – 170, 2007.

AYLIFFE, G. A., **The Progressive Intercontinental Spread of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus***. Clin Infect Dis; 24 (suppl 1): S74 – S79, 1997.

BANNERMAN, T. L., HANCOCK, G. A., TENOVER, F. C., et al, **Pulsed-Field Gel Electrophoresis as a Replacement for Bacteriophage Typing of *Staphylococcus aureus***. J. Clin. Microbiol., 33, p. 551 – 555, 1995.

BANNERMAN, T. L., ***Staphylococcus, Micrococcus* and other catalase-positive cocci that grow aerobically**. In: P. R. Murray (Ed.). Manual of Clinical Microbiology, Eighth Edition. Washington, DC: ASM Press, v.1, p.384 – 404, 2003.

BLOT, S. I., VANDEWOUDE, K. H., HOSTE, E. A., et al., **Outcome and Attributable Mortality in Critically Ill Patients with Bacteremia Involving Methicillin-susceptible and Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus***, Arch Intern Med, 162:2229 – 2235, 2002.

BROWN, D. F. J. & WALPOLE, E., **Evaluation of the Mastalex Latex Agglutination Test for Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus* Grown on Different Screening Media**, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v.47, p. 187 – 189, 2001.

CARBON, C., **MRSA and MRSE: is there an answer?** Clinical Microbiology and Infection, v. 6, suppl. 2, p. 17 – 22, 2000.

Centers for Disease Control and Prevention. ***Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin** – United States. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1997; 46: 765 – 766.

CHAMBERS, H. F., **Methicillin Resistance in Staphylococci: Molecular and Biochemical Basis and Clinical Implications**, CMR, v. 10, n. 4, p. 781 – 791, 1997.

CHAMBERS, H. F., **The Changing Epidemiology of *Staphylococcus aureus*?**, Emerging Infectious Diseases, 7, n° 2, 2001.

CHANG, S., SIEVERT, D. M., HAGEMAN, J. C., et al, **Infections with Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Containing the VanA Resistance Gene**. N Engl J Med 348: 1342 – 1347, 2003.

*Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing.* Fifteenth informational supplement, M100-S15. Wayne, PA, 2005.

*Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico; Norma Aprovada — Sexta Edição,* M7-A6, Wayne, PA, 2005

*Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing.* Fifteenth informational supplement, M100-S17. Wayne, PA, 2007.

*Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing.* Eighteenth informational supplement, M100-S18. Wayne, PA, 2008.

COSGLOVE, S. E., SAKOULAS, G., PERENCEVICH, E. N., et al., **Comparison of Mortality Associated with Methicillin Resistant and Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* Bacteremia: a meta-analysis,** *Clin Infect Dis*; 36:53 – 59, 2003.

COOKSON, B. D., APARICIO, P., DEPLANO, A., et al, **Inter-centre Comparison of Pulsed-Field Gel Electrophoresis for the Typing of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** *J. Med. Microbiol.*, n. 44, pg 179 – 184, 1996

CRISOSTOMO, M. I., WESTH, H., TOMASZ, A., et al, **The evolution of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: Similarity of genetic backgrounds in historically early methicillin susceptible and resistant isolates and contemporary epidemic clones**, PNAS, v. 98, n. 17, p. 9865 – 9870, Aug 2001.

DECKER, J. **Biofilms: Microbial Communities and Infectious Disease**. Disponível em: <http://microvet.arizona.edu/Courses/MIC438/decker/biofilms/biofilms.html>

DERESINSKI, S., **Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: an Evolutionary, Epidemiologic, and Therapeutic Odyssey**, Clin Infect Dis; n. 40, p 562 – 573, 2005.

DEURENBERG, R. H., VINK, C., KALENIC, S., et al, **The Molecular Evolution of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus***, Clin Microbiol Infect, v. 13 n. 3, p. 222 – 235, 2007.

DINGES, M. M., ORWIN, P. M., SCHLIEVERT, P. M., **Exotoxins of *Staphylococcus aureus***. Clinical Microbiology Reviews, Washington, v. 13, n. 1, p. 16 – 34, 2000.

ENRIGHT, M. C., DAY, N. P. J., DAVIES, C. E., et al, **Multilocus Sequence Typing for Characterization of Methicillin-resistant and Methicillin-Susceptible Clones of *Staphylococcus aureus***. J. Clin. Microbiol, v. 38, n. 3, p 1008 – 1015, 2000.

HANSEN, A. M., **Local Variants of Staphylococcal Cassette Chromosome *Mec* in Sporadic Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Methicillin-Resistant**

**Coagulase-Negative Staphylococci: Evidence of Horizontal Gene Transfer?**, A. Agents Chemotherapy, v. 48, n. 1, p. 285 – 296, Jan 2004.

HIRAMATSU, K., KONDO, N., ITO, T., **Genetic Basis for Molecular Epidemiology of MRSA**, J. Infect Chemother, V. 2, p. 117 – 129, 1996.

HIRAMATSU, K., ARITAKA, N., HANAKI, H., et al., **Dissemination in Japanese hospitals of strains of Staphylococcus aureus heterogeneously resistant to vancomycin**. Lancet; 350: 1670 – 1673, 1997.

ITO, T., MA, X. X., TAKEUCHI, F., et al., **Novel Type V Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Driven by a Novel Cassette Chromosome Recombinase, *ccrC***, Antimicrob. Agents Chemother, v. 48, p. 2637 – 2651, 2004.

JARLOV, J. O., BUSCH-SORENSEN, C., ESPERSEN, F., et al. **Evaluation of different methods for the detection of methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci**. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v.40, p. 241 – 249, 1997.

JORGENSEN, J. H. & TURNIDGE, J.D. **Susceptibility test methods: dilution and disk diffusion methods**. In: P. R. Murray (Ed.). Manual of Clinical Microbiology, Eighth Edition. Washington, DC: ASM Press, v.1, p.1108 – 1127, 2003.

KARCHMER, A. W., **From Theory to Practice: Resistance in *Staphylococcus aureus* and New Treatments**, Clin Microbiol Infect, v. 12, suppl. 8, p. 15 – 21, Dec. 2006.

KARCHMER, A. W., **Nosocomial Bloodstream Infections. Organisms, Risk Factors and Implications.** Clin Infect Disease, 31 (suppl. 4): S139 – S143, 2000.

KATAYAMA, Y., et al, **Genetic Organization of the Chromosome Region Surrounding *mecA* in Clinical Staphylococcal Strains: Role of IS431-mediated *mecI* Deletion in Expression of Resistance in *mecA*-carrying, Low Level Methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus*.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 45, n. 7, p. 1955-1963, 2001.

KLUYTMANS-VANDEN BERGH, M. F. Q., KLUYTMANS, J. A. J. W., **Community-acquired Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Current Perspectives.** Clin Microbiol Infect; 12 (Suppl. 1): 9 – 15, 2006.

LIU, C. & CHAMBERS, H. F., ***Staphylococcus aureus* with Heterogenous Resistance to Vancomycin: Epidemiology, Clinical Significance, and Critical Assessment of Diagnostic Methods.** Antimicrob Agents Chemother; 47: 3040 – 3045, 2003.

LODE, H., **Can  $\beta$ -lactams Act on Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*?** Clin Microbiol Infect; 12 (Suppl. 2): 1 – 2, 2006.

LOWY, F. D., **Antimicrobial Resistance: The Example of *Staphylococcus aureus*.** J Clin Invest, 111: 1265 – 1273, 2003.



MAIDEN, M. C., BYGRAVES, J. A., FEIL, E., et al, **Multilocus Sequence Typing: a Portable Approach to the Identification of Clones within Populations of Pathogenic microorganisms.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, n 95, p 3140 – 3145, 1998.

McDOUGAL, L., STEWARD, C. D., KILLGORE, G. E., et al, **Pulsed-Field Gel Electrophoresis Typing of Oxacillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from the United States: Establishing a National Database,** JMC, v. 41, n. 11, p. 5113 – 5120, 2003.

MORRISON, D., WOODFORD, N., BARRETT, S. P., et al., **DNA Banding Pattern Polymorphism in Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* and Criteria for Defining Strains,** Journal of Clinical Microbiology, v. 37, n. 4, p. 1084 – 1091, 1999.

MUNRO, S., Disk diffusion test. In: H. D. Isenberg (Ed.). **Clinical Microbiology Procedures Handbook, Second Edition.** Washington, DC: ASM Press, v. 1, 5.1.1 – 5.1.15, 2004.

MURAKAMI, K., MINAMIDE, W., WADA, K., et al. **Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction.** Journal of Clinical Microbiology, v. 29, n. 10, p. 2240 – 2244, 1991.

MURRAY, P. R., **Microbiologia Médica,** Ed. 3, Rio de Janeiro,: Guanabara Koogan, 1992.

National Nosocomial Infections Surveillance System. **National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report.** Am J Infect Control; 32: 470 – 485, 2004.

NICOLA, F. G., McDOUGAL, L. K., BIDDLE, J. W., *et al*, **Characterization of Erythromycin-Resistant Isolate of *Staphylococcus aureus* Recovered in the United States from 1958 to 1969**. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 42: 3024 – 3027, 1998.

NOVICK, R. P., SCHLIEVERT, P., RUZIN, A., **Pathogenicity and Resistance Islands of *Staphylococci***. *Microbes and Infection*, Amsterdam, v.3, p. 585 – 594, 2001.

OLIVEIRA, G. A., FARIA, J. B., LEVY, C. E., MAMIZUKA, E., **Characterization of the Brazilian Endemic Clone of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from Hospitals Throughout Brazil**. *Braz J Infect Dis*; 5(4): 163 – 170, 2001.

OLIVEIRA, G.A., DELL'AQUILA, A. M., MASIERO, R. L., *et al*. **The first isolation of multiple *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin from the same hospital in Brazil**. *Infect Control Hosp Epidemiol*;22(7):443 – 8, 2001.

PANNUTI, C.S. & GRINBAUM, R.S., **An overview of nosocomial infection control in Brazil**. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 16:170 – 174, 1995.

PÉREZ-ROTH, E., LORENZO-DIAS, F., BATISTA, N., *et al*, **Tracking Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clones during a 5-Years Period (1998 to 2002) in a Spain Hospital**. *J. Clin. Microbiol.*, v.42, n.10, p 4649 – 4656, 2004.

PINHO, M. G., LENCASTRE, H., TOMASZ, A., **An Acquired and a Native Penicillin-binding Protein Cooperate in Building the Cell Wall of Drug-resistant *Staphylococci***, *PNAS*, v. 98, n. 19, p. 10.886-10.891, 2001.

PREVOST, G, JAULHAC, B., PIEMONT, Y., **DNA fingerprinting by pulsed-field gel electrophoresis is more effective than ribotyping in distinguishing among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates.** *J. Clin. Microbiol.*,v 30, p. 967-973, 1992.

REIMER, L. G. & CARROL, K. C., Procedures for the Storage of Microorganisms. In: P. R. Murray (Ed.). **Manual of Clinical Microbiology**, 8° ed., Washington, DC: ASM Press, v. 1, 67 – 73, 2003.

ROBINSON, D. A. & ENRIGHT, M. C., **Multilocus Sequence Typing and the Evolution of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*.** *Clin Microbiol Infect*; 10: 92 – 97, 2004.

SADER, H. S., GALES, A. C., PFALLER, M. A., et al, **SENTRY antimicrobial surveillance program report: Latin American and Brazilian results for 1997 through 2001**, *Braz J Infect Dis*, vol.8, no.1, Feb., 2004.

SADER, H. S., HOLLIS, R. J., PFALLER, M. A., **The use of molecular techniques in the epidemiology and control of infectious diseases.** *Clin Lab Med*, v.15, n.2, p.407 – 431, 1995.

SANCHES, I., LENCASTRE, H., MATO, R., **Molecular typing of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and Enterococci: an international multicenter study from 21 countries.** In: Program and abstracts: 39th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, American Society for Microbiology, San Francisco – USA, p.185, 1999.

SHUKLA, S. K., **Novel Polymorphisms in *mec* Genes and a New *mec* Complex Type in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates Obtained in Rural Wisconsin**, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48, No. 8, p. 3080-3085, 2004.

SAKAI, H. PROCOP, G. W., KOBAYASHI, N., et al. **Simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci in positive blood cultures by real-time PCR with two fluorescence resonance energy transfer probe sets**. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 42, n. 12, p. 5739 – 5744, 2004.

SCHITO, G. C., **The Importance of the Development of Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus***, *CMI*, 12 (Suppl. 1): 3 – 8, 2006.

SCHLICHTING, C., BRANGER, C., FOURNIER, J. M., et al. **Typing of *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis, zymotyping, capsular typing, and phage typing: resolution of clonal relationships**. *J Clin Microbiol*, v.31, n.2, p.227 – 232, 1993.

SHOPSIN, B., GOMEZ, M., MONTGOMERY, S. O., et al, **Evaluation of Protein A Gene Polymorphic Region DNA Sequencing for Typing of *Staphylococcus aureus* Strains**. *J. Clin. Microbiol*, v. 37, n. 11, p 3556 – 3563, 1999.

SHORR, A. F., **Staphylococcal Resistance Epidemiology**, *Clin Infect Dis*, n 45; (Suppl. 3), p 171 – 176, 2007.

SOARES, M. J. S., TEIXEIRA, L. A., NUNES, M. R., **Analysis of Different Molecular Methods for Typing Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Isolates Belonging to the Brazilian Epidemic Clone**, J. Med. Microbiol., V. 50, p. 732 – 742, 2001.

SOUZA, M. A., SANCHES, I. S., FERRO, M. L., **Intercontinental Spread of a Multidrug-resistant Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Clone**. J. Clin. Microbiol., n. 36, p. 2590 – 2596, 1998.

SPICER, W. J., **Bacteriologia, Micologia e Parasitologia Clínica**. Ed. 1, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

SWAMINATHAN, B. & MATAR, G.M. Molecular Typing Methods. In: PERSING, D.H. et al, **Diagnostic Molecular Microbiology Principles and Applications**. Washington, DC: ASM, p.26 – 50, 1993.

SWENSON, J. M., SPARGO, J., TENOVER, F. C., et al., **Optimal inoculation methods and quality control for the NCCLS oxacillin agar screen test for detection of oxacillin resistance in *Staphylococcus aureus***. J Clin Microbiol, v.39, n.10, p.3781 – 3784, 2001.

SWENSON, J. M., HINDLER, J. A., PETERSON, L. R., **Special phenotypic methods for detecting antibacterial resistance**. In: P. R. Murray (Ed.). Manual of Clinical Microbiology, Eighth Edition. Washington, DC: ASM Press, v.1, p.1181 – 1183, 2003.

TENOVER, F. C., WEIGEL, L. M., APPELBAUM, P. C., et al, **Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolate from a Patient in Pennsylvania**, *Antim. Agents and Chemotherapy*, V. 48, n 1, p 275 – 280, 2004.

TENOVER, F. C., ARBEIT, R. D., GOERING, R. V., et al, **How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America**. *Infect Control Hosp Epidemiol*, v.18, n.6, p.426 – 439, 1997.

TENOVER, F. C., ARBEIT, R. D., GOERING, R. V., et al. **Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing**. *J Clin Microbiol*, v.33, n.9, p.2233 – 2239, 1995.

TEIXEIRA, L.A., NUNES, A. P. F., BASTOS, C. C. R., et al, **Geografic spread of epidemic multiresistant *Staphylococcus aureus* clone in Brazil**. *J Clin Microbiol*; 33: 2400 – 2404, 1995.

TRINDADE, P. A., McCULLOCH, J. A., OLIVEIRA, G. A., et al, **Molecular Techniques for MRSA Typing: Current Issues and Perspective**. *Braz J Infect Dis*; 7: 32 – 43, 2003.

WALDVOGEL, F. A., *Staphylococcus aureus*. Em: Mandell, G. L.; Bennet, J. E.; Dolin, R.; et al, *Principles and Practice of Infections Diseases*, Philadelphia: Churchill Livingstone, p. 2069 – 2092, 2000.

WESTBROOK, G. & HOLMES, H. Epidemiologic Strain Typing. In: H. D. Isenberg (Ed.). **Clinical Microbiology Procedures Handbook, Second Edition**. Washington, DC: ASM Press, v.1, p.13.5.1 – 13.5.5, 2004

WHITENER, C., CAPUTO, G. M., WEITEKAMP, M. R., et al. **Endocarditis due to coagulase-negative staphylococci: microbiologic, epidemiologic and clinical considerations**. Infectious Disease Clinics of North America, v. 7, n. 1, p. 81 – 96, 1993.

WHO – World Health Organization. **GLOBAL STRATEGY FOR CONTAINMENT OF ANTIMICROBIAL RESISTANCE**. <http://www.who.int/drugresistance>

YORK, M. K. Aerobic Bacteriology. In: H. D. Isenberg (Ed.). **Clinical Microbiology Procedures Handbook, Second Ed**. Washington, DC: ASM Press, v.1, p.3.1.1 – 3.18.2.1, 2004.

ZETOLA, N., FRANCIS, J. S., NUERMBERG, E. L., et al., **Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging threat**. Lancet Infect Dis; 5: 275 – 286, 2005.

ZHU, W., CLARK, N. C., McDOUGAL, L. K., et al., **Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates Associated with Inc18-Like *vanA* Plasmids in Michigan**, Antim. Agents and Chemotherapy, V. 52, n 2, p 452 – 457, 2008.

## **ANEXO 1**

### **SOLUÇÕES E REAGENTES**



### **TAMPÃO TRIS-EDTA (TE)**

Tris \_\_\_\_\_ 1,21 g  
EDTA \_\_\_\_\_ 3,72 g  
H<sub>2</sub>O MILLI-Q estéril \_\_\_\_\_ 1000 mL

Preparo:

Pesar os sais e dissolver em 900 mL de H<sub>2</sub>O MILLI-Q estéril, em seguida ajustar o pH em 7,5 com NaOH 10M. Completar o volume para 1000 mL.

### **TAMPÃO SALINA-EDTA (TSE)**

NaCl \_\_\_\_\_ 4,38 g  
EDTA \_\_\_\_\_ 9,30 g  
H<sub>2</sub>O MILLI-Q estéril \_\_\_\_\_ 1000 mL

Preparo:

Pesar os sais e dissolver em 900 mL de H<sub>2</sub>O MILLI-Q estéril, em seguida ajustar o pH em 7,5 com NaOH 10M. Completar o volume para 1000 mL.

### **TAMPÃO BORATO-EDTA 10X**

Tris \_\_\_\_\_ 108,00 g  
EDTA \_\_\_\_\_ 7,5 g  
Ácido Bórico \_\_\_\_\_ 55,80 g  
H<sub>2</sub>O MILLI-Q estéril \_\_\_\_\_ 1000 mL

Preparo:

Pesar os sais e dissolver em 800 mL de H<sub>2</sub>O MILLI-Q estéril, em seguida completar o volume para 1000 mL. Não ajustar o pH.

## TAMPÃO DE LISE GRAM-POSITIVO

TRIS-HCl	0,36 g
EDTA Na <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	100 ml
NaCl 1 M	100 ml
Brij 58 – polioxietileno	2,5 g
Desoxicolato de Sódio	1,0 g
Sarcosyl NL 30	8,25 ml
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	1,0 ml
H <sub>2</sub> O MILLI-Q estéril	500 ml

### Preparo:

Solução EDTA 0,5 M (100 ml): Pesar 16,8 g de EDTA Na<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O e dissolver em 100 ml de H<sub>2</sub>O MILLI-Q estéril.

Solução NaCl 5 M (100 mL): Pesar 29,2 g de NaCl e dissolver em 100 mL de H<sub>2</sub>O MILLI-Q estéril.

Solução MgCl<sub>2</sub> 0,5 M (10 ml): Pesar 1,0 g e dissolver em 10 ml de H<sub>2</sub>O MILLI-Q estéril.

Após a preparação das soluções: Adicionar 100 ml de EDTA e 100 ml de NaCl a 200 mL de H<sub>2</sub>O MILLI-Q estéril. Adicionar os reagentes secos e o MgCl<sub>2</sub>. Incubar essa mistura em Banho-Maria a 56°C até dissolver. Resfriar em temperatura ambiente, ajustar o pH a 7,5 e completar o volume para 500 ml com H<sub>2</sub>O MILLI-Q estéril.

## HIDRÓXIDO DE SÓDIO 10M (NaOH 10M)

NaOH	40,0 g
H <sub>2</sub> O MILLI-Q estéril	100 mL

### Preparo:

Pesar o sal e dissolver em 100 mL de H<sub>2</sub>O MILLI-Q estéril. Utilizar a solução após 24 horas.

**ANEXO 2**

**PLANILHA DE DADOS**

Criobanco										
Cultura	Prontuário	Data	Unidade	Amostra	Sítio Infecioso	Criob.	S.	Perfil	Bloco	
323	19006204	25/4/2003	UTI Ad	Traqueal	Respiratório	A 1	Vanco	A	1	
960	10310105	1/5/2003	UTI Ad	Sangue	Sangüíneo	A 2	Vanco	A	2	
2084	19006204	12/5/2003	UTI Ad	LBA	Respiratório	A 3	Vanco	A	3	
4340	19006204	2/6/2003	UTI Ad	Sangue	Sangüíneo	A 4	Vanco	A	4	
4478	3812260	3/6/2003	UTI Ad	Traqueal	Respiratório	A 5	Vanco	B	5	
8191	19097529	8/7/2003	UTI Ad	Escarro	Respiratório	A 6	Vanco	B	6	
8136	18636280	7/7/2003	UTI Ad	Escarro	Respiratório	A 7	Vanco	C	7	
8419	16113697	9/7/2003	UTI Ad	Sangue	Sangüíneo	A 8	Vanco	C	8	
9453	9368809	19/7/2003	UTI Ad	Traqueal	Respiratório	A 9	Vanco	A	9	
9454	9368809	19/7/2003	UTI Ad	Sangue	Sangüíneo	A 10	Vanco	A	10	
199	19135861	25/7/2003	UTI Ad	Catéter	Sangüíneo	B 1	Vanco	A	11	
274	19135861	26/7/2003	UTI Ad	Traqueal	Respiratório	B 2	Vanco	A	12	
423	19146928	28/7/2003	UTI Ad	Sangue	Sangüíneo	B 3	Vanco	C	13	
705	18636280	30/7/2003	UTI Ad	Peritoneal	L. Cavitários	B 4	Vanco	C	14	
1303	16204200	5/8/2003	UTI Ad	LBA	Respiratório	B 5	Vanco	D	15	
2073	6189946	12/8/2003	UTI Ad	LBA	Respiratório	B 6	Vanco	D	16	
4163	17979191	1/9/2003	UTI Ad	Traqueal	Respiratório	B 7	Vanco	E	17	
5055	8419698	10/9/2003	UTI Ad	Escarro	Respiratório	B 8	Vanco	E	18	
5491	19080501	15/9/2003	UTI Ad	Traqueal	Respiratório	B 9	Vanco	F	19	
7317	11096700	30/9/2003	UTI Ad	Escarro	Respiratório	B 10	Vanco	F	20	
7962	19132498	6/10/2003	UTI Ad	Traqueal	Respiratório	C 1	Vanco	B	21	
8207	12200544	7/10/2003	UTI Ad	Escarro	Respiratório	C 2	Vanco	D	22	
8327	19007383	8/10/2003	UTI Ad	Peritoneal	L. Cavitários	C 3	Vanco	D	23	
8986	19251713	14/10/2003	UTI Ad	LBA	Respiratório	C 4	Vanco	B	24	
498	7421745	27/10/2003	UTI Ad	Traqueal	Respiratório	C 5	Vanco	B	25	
9893	19259463	21/10/2003	UTI Ad	Sangue	Sangüíneo	C 6	Vanco	C	26	
25	828211	22/10/2003	UTI Ad	Sangue	Sangüíneo	C 7	Vanco	B	27	
444	19266397	27/10/2003	UTI Ad	Traqueal	Respiratório	C 8	Vanco	B	28	
485	18266997	27/10/2003	UTI Ad	Traqueal	Respiratório	C 9	Vanco	A	29	
668	19239322	28/10/2003	UTI Ad	Catéter	Sangüíneo	C 10	Vanco	A	30	
1284	9346910	3/11/2003	UTI Ad	Traqueal	Respiratório	D 1	Vanco	A	31	
1418	7421745	4/11/2003	UTI Ad	Liq Pleural	L. Cavitários	D 2	Vanco	A	32	
1367	19278778	4/11/2003	UTI Ad	Sangue	Sangüíneo	D 3	Vanco	A	33	
3158	9346910	20/11/2003	UTI Ad	Traqueal	Respiratório	D 4	Vanco	A	34	
4503	17562991	2/12/2003	UTI Ad	Traqueal	Respiratório	D 5	Vanco	A	35	
4371	19298663	1/12/2003	UTI Ad	Catéter	Sangüíneo	D 6	Vanco	A	36	
4927	19298663	5/12/2003	UTI Ad	Sangue	Sangüíneo	D 7	Vanco	A	37	
4998	19298000	6/12/2003	UTI Ad	Traqueal	Respiratório	D 8	Vanco	A	38	
6582	11951538	4/1/2005	UTI Ad	Traqueal	Respiratório	D 9	Vanco	A	39	
7043	11951538	9/1/2005	UTI Ad	Catéter	Sangüíneo	D 10	Vanco	A	40	
8139	19822117	18/1/2005	UTI Ad	Sangue	Sangüíneo	E 1	Vanco	A	41	
8914	4134630	25/1/2005	UTI Ad	Catéter	Sangüíneo	E 2	Vanco	A	42	
8739	19641490	24/1/2005	UTI Ad	Catéter	Sangüíneo	E 3	Vanco	A	43	
8715	4134630	24/1/2005	UTI Ad	Sangue	Sangüíneo	E 4	Vanco	C	44	
197	19302504	3/2/2004	UTI Ad	Sangue	Sangüíneo	E 5	Vanco	A	45	
8186	19270440	13/1/2005	UTI Ad	Traqueal	Respiratório	E 6	Vanco	A	46	
9452	19360148	26/1/2004	UTI Ad	Traqueal	Respiratório	E 7	Vanco	A	47	
1971	19397793	17/2/2004	UTI Ad	Traqueal	Respiratório	E 8	Vanco	A	48	
3179	8116792	2/3/2004	UTI Ad	Traqueal	Respiratório	E 9	Vanco	A	49	
4730	19363473	16/3/2004	UTI Ad	Traqueal	Respiratório	E 10	Vanco	A	50	
8031	19434087	15/4/2004	UTI Ad	LBA	Respiratório	F 1	Vanco	A	51	
196	6059201	4/5/2004	UTI Ad	Sangue	Sangüíneo	F 2	Vanco	A	52	
1557	19330303	14/5/2004	UTI Ad	Sangue	Sangüíneo	F 3	Vanco	A	53	
1785	19330303	17/5/2004	UTI Ad	Sangue	Sangüíneo	F 4	Vanco	A	54	

MRSA										
Cultura	Prontuário	Data	Unidade	Amostra	Sítio Infecioso	Criob.	S.	Perfil	Bloco	
1785	19330303	17/5/2004	UTI Ad	Sangue	Sangüíneo	F 4	Vanco	A	54	
2422	19531759	22/5/2004	UTI Ad	Sangue	Sangüíneo	F 5	Vanco	A	55	
4007	12304200	6/6/2004	UTI Ad	Traqueal	Respiratório	F 6	Vanco	A	56	
5136	2915294	17/6/2004	UTI Ad	Sangue	Sangüíneo	F 7	Vanco	A	57	
5119	19580334	17/6/2004	UTI Ad	Catéter	Sangüíneo	F 8	Vanco	A	58	
5504	19237451	21/6/2004	UTI Ad	LBA	Respiratório	F 9	Vanco	A	59	
5719	2915294	23/6/2004	UTI Ad	Traqueal	Respiratório	F 10	Vanco	A	60	
7398	18721457	8/7/2004	UTI Ad	Traqueal	Respiratório	G 1	Vanco	A	61	
8111	19604535	14/7/2004	UTI Ad	Uretral	L. Cavitários	G 2	Vanco	A	62	
130	19650359	2/8/2004	UTI Ad	Sangue	Sangüíneo	G 3	Vanco	A	63	
390	13213739	4/8/2004	UTI Ad	Traqueal	Respiratório	G 4	Vanco	A	64	
837	19650359	9/8/2004	UTI Ad	Sangue	Sangüíneo	G 5	Vanco	A	65	
2989	16340456	27/8/2004	UTI Ad	Catéter	Sangüíneo	G 6	Vanco	A	66	
4109	4837380	30/8/2004	UTI Ad	Traqueal	Respiratório	G 7	Vanco	A	67	
3232	16340456	30/8/2004	UTI Ad	Catéter	Sangüíneo	G 8	Vanco	A	68	
4109	4837380	9/9/2004	UTI Ad	Sangue	Sangüíneo	G 9	Vanco	A	69	
6308	19441016	10/9/2004	UTI Ad	LBA	Respiratório	G 10	Vanco	A	70	
5244	19708225	20/9/2004	UTI Ad	Sangue	Sangüíneo	H 1	Vanco	A	71	
2485	18077957	5/10/2004	UTI Ad	Catéter	Sangüíneo	H 2	Vanco	A	72	
8108	11194982	14/10/2004	UTI Ad	Sangue	Sangüíneo	H 3	Vanco	A	73	
7933	19737241	13/10/2004	UTI Ad	Catéter	Sangüíneo	H 4	Vanco	A	74	
9032	11194982	22/10/2004	UTI Ad	Sangue	Sangüíneo	H 5	Vanco	A	75	
9945	11693121	29/10/2004	UTI Ad	LBA	Respiratório	H 6	Vanco	A	76	
9447	11693121	26/10/2004	UTI Ad	Sangue	Sangüíneo	H 7	Vanco	A	77	
2133	18853132	31/10/2004	UTI Ad	Escarro	Respiratório	H 8	Vanco	A	78	
130	10251311	1/11/2004	UTI Ad	Escarro	Respiratório	H 9	Vanco	A	79	
9700	18729156	28/9/2002	UTI Ad	Sangue	Sangüíneo	H 10	Vanco	A	80	
991	18698757	10/10/2002	UTI Ad	Sec Pleural	L. Cavitários	I 1	Vanco	A	81	
1860	2375044	18/10/2002	UTI Ad	Sangue	Sangüíneo	I 2	Vanco	A	82	
2444	17697170	24/10/2002	UTI Ad	Catéter	Sangüíneo	I 3	Vanco	A	83	
2429	17697170	24/10/2002	UTI Ad	Sangue	Sangüíneo	I 4	Vanco	A	84	
3997	2628473	8/11/2002	UTI Ad	Traqueal	Respiratório	I 5	Vanco	A	85	
4693	16613002	16/12/2002	UTI Ad	Sangue	Sangüíneo	I 6	Vanco	A	86	
7895	572187	21/11/2002	UTI Ad	Sangue	Sangüíneo	I 7	Vanco	A	87	
5244	19708225	17/1/2003	UTI Ad	Sangue	Sangüíneo	I 8	Vanco	A	88	
635	17911120	18/1/2003	UTI Ad	Traqueal	Respiratório	I 9	Vanco	A	89	
932	9042407	22/1/2003	UTI Ad	Sangue	Sangüíneo	I 10	Vanco	A	90	
2722	18879166	10/2/2003	UTI Ad	Sangue	Sangüíneo	J 1	Vanco	A	91	
7744	18988875	29/3/2003	UTI Ad	Traqueal	Respiratório	J 2	Vanco	A	92	
8112	15023660	2/4/2003	UTI Ad	Sangue	Sangüíneo	J 3	Vanco	A	93	
6183	18781484	15/3/2003	UTI Ad	Sangue	Sangüíneo	J 4	Vanco	A	94	
6184	18781484	15/3/2003	UTI Ad	Sangue	Sangüíneo	J 5	Vanco	A	95	
4535	18933241	26/2/2003	UTI Ad	Catéter	Sangüíneo	J 6	Vanco	A	96	
5465	9366512	9/3/2003	UTI Ad	LBA	Respiratório	J 7	Vanco	A	97	
4385	18933241	25/2/2003	UTI Ad	LBA	Respiratório	J 8	Vanco	A	98	
799	16088188	8/12/2000	UTI Ad	Catéter	Sangüíneo	J 9	Vanco	A	99	
9174	18483734	19/3/2002	UTI Ad	Traqueal	Respiratório	J 10	Vanco	A	100	
909	14437282	1/5/2002	UTI Ad	Traqueal	Respiratório	A 1-2	Vanco	A	101	
2668	18494302	22/4/2001	UTI Ad	Catéter	Sangüíneo	A 2-2	Vanco	A	102	
919	17913700	13/1/2001	UTI Ad	Catéter	Sangüíneo	A 3-2	Vanco	A	103	
B1379	9458298	8/11/2001	UTI Ad	Sangue	Sangüíneo	A 4-2	Vanco	A	104	
C5832	9458298	8/11/2001	UTI Ad	Preitoneal	L. Cavitários	A 5-2	Vanco	A	105	
C6709	15323841	26/3/2002	UTI Ad	Sangue	Sangüíneo	A 6-2	Vanco	A	106	
B8832	4332962	17/7/2001	UTI Ad	Sangue	Sangüíneo	A 7-2	Vanco	A	107	

