



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENFERMAGEM

ALINE CRISTINA RISSATO PIEKARSKI

PERFIL FENOTÍPICO, GENOTÍPICO E FATORES DE VIRULÊNCIA DE
***Staphylococcus aureus* ISOLADOS DE CASOS CLÍNICOS E DE PORTADORES**
ASSINTOMÁTICOS EM UM HOSPITAL DO INTERIOR DO PARANÁ

MARINGÁ

2010

ALINE CRISTINA RISSATO PIEKARSKI

**PERFIL FENOTÍPICO, GENOTÍPICO E FATORES DE VIRULÊNCIA DE
Staphylococcus aureus ISOLADOS DE CASOS CLÍNICOS E DE PORTADORES
ASSINTOMÁTICOS EM UM HOSPITAL DO INTERIOR DO PARANÁ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Enfermagem da Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Enfermagem.

Orientador: Prof. Dr. João Bedendo

MARINGÁ

2010

ALINE CRISTINA RISSATO PIEKARSKI

**PERFIL FENOTÍPICO, GENOTÍPICO E FATORES DE VIRULÊNCIA DE
Staphylococcus aureus ISOLADOS DE CASOS CLÍNICOS E DE PORTADORES
ASSINTOMÁTICOS EM UM HOSPITAL DO INTERIOR DO PARANÁ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Enfermagem da Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Enfermagem.

Aprovado em: 22 fevereiro de 2010

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. João Bedendo (Orientador)

Universidade Estadual de Maringá

Prof^ª. Dr^ª. Marinesia Aparecida do Prado Palos (Titular)

Universidade Federal de Goiânia

Prof. Dr. Benício Alves de Abreu Filho (Titular)

Universidade Estadual de Maringá

Prof^ª. Dr^ª. Lourdes Botelho Garcia (Suplente)

Universidade Estadual de Maringá

Prof^ª. Dr^ª. Maria Cristina Bronharo Tognim (Suplente)

Universidade Estadual de Maringá

Dedico este trabalho

A meus pais,
por serem sempre meu caminho e minha luz nesta e em tantas outras jornadas.
Sem vocês, nada disto seria possível...

AGRADECIMENTOS

A DEUS,

por ser meu refúgio e segurança e me conduzir, sempre.

Muito Obrigada, Senhor!

A meus pais Paulo e Aparecida,

por nunca medirem esforços para que eu realizasse os meus sonhos... E acima de tudo, por acreditarem em mim... MUITO OBRIGADA!

A meu esposo Jefferson,

pela confiança, dedicação e por estar sempre a meu lado... E também, por muitas vezes, compreender a minha ausência...

A meus irmãos Paulo e Amanda,

por serem, acima de tudo, meus amigos e caminharem comigo sempre...

As minhas sobrinhas Beatriz e Bárbara,

por serem minhas princesinhas...

A minha cunhada Alessandra, e a meu cunhado Andryus,

por estarem sempre na torcida por mim...

A toda a minha família

por ser meu norte, para onde posso voltar sempre...

A meus avós Miguel Turini e Celeste Turini (*in memoriam*),

pelo exemplo de vida, companheirismo e luta...

Vó, quantas saudades você deixou... Sentimos muito a sua falta...

Às amigas Sílvia Limurci e Adriana Limurci,

que o tempo e a distância nunca separaram...

À prima e amiga Valéria Bianchini,
por me apoiar e sempre estar por perto nos momentos mais importantes...

Ao amigo Hugo Razini e à amiga Francielle Grigoletto,
que mesmo longe sempre se fizeram presentes...

À amiga Suelen Teixeira Faria,
companheira de todos os dias, de tantas horas, de tanto riso e tanto choro!!! Obrigada por
fazer parte desta conquista! Vencemos!!!

Ao prof. João Bedendo,
orientador, mestre e amigo... Pelo incentivo, dedicação e por ensinar os caminhos a seguir...

Às funcionárias do Laboratório de Microbiologia e Imunologia Básica,
por me receberem com carinho, me acolherem e pelos conhecimentos compartilhados.

À Prof^a. Maria Cristina Bronharo Tognim,
pela amizade, compreensão e pelas dicas importantes nos momentos nos quais tudo parecia dar
errado...

Ao Prof. Benício Alves de Abreu Filho e Prof. Celso Luiz Cardoso,
por me acolherem no laboratório e pelo muito que me ensinaram, meus sinceros agradecimentos.

À Prof^a. Sueli Donizete Borelli, pela preocupação de sempre e também pelo acolhimento no
Laboratório de Imunologia.

Às profs. Maria Angélica P. Waidman e Marcelle Paiano Cardoso,
pelo ombro amigo em momentos difíceis...

A todos os docentes e funcionários do Departamento de Enfermagem da Universidade
Estadual de Maringá.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.
À Fundação Araucária, pela bolsa concedida.

“... E ainda se vier noites traiçoeiras
Se a cruz pesada for, Cristo estará contigo
O mundo pode até fazer você chorar...
Mas Deus te quer sorrindo...”
(Pe. Marcelo Rossi)

PIEKARSKI, Aline Cristina Rissato. **Perfil fenotípico, genotípico e fatores de virulência em *Staphylococcus aureus* isolados de casos clínicos e de portadores assintomáticos em um hospital do interior do Paraná.** 2010. 66 f. Dissertação (Mestrado em Enfermagem) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2010.

RESUMO

Indivíduos sadios são colonizados por *Staphylococcus aureus* desde a amamentação, podendo albergar o micro-organismo na nasofaringe, superfície corporal e na vagina. A partir desses sítios, podem ser veiculados para indivíduos susceptíveis, ocasionando infecções. *S. aureus* tem sido associado à etiologia das infecções hospitalares e comunitárias e a gravidade da doença depende da expressão de fatores de virulência e do perfil de resistência frente aos antimicrobianos usualmente utilizados na prática clínica. Este estudo teve como objetivo avaliar o perfil fenotípico, genotípico e fatores de virulência de amostras de *Staphylococcus aureus* isolados de casos clínicos infecção hospitalar e de portadores assintomáticos. Utilizaram-se 147 amostras de *S. aureus*, estocadas no Laboratório da Universidade Estadual de Maringá, sendo 68 procedentes de casos clínicos de infecção associadas aos cuidados em saúde e 79 de portadores assintomáticos. A susceptibilidade aos antimicrobianos foi avaliada pelo método de disco difusão, conforme recomendações do CLSI, sendo que para oxacilina e vancomicina também se utilizou o teste de determinação da concentração inibitória mínima (CIM). O DNA foi extraído com Ctab e a técnica de Reação em Cadeia da polimerase (PCR) foi empregada para a realização da tipagem genética com o oligonucleotídeo RW3A, identificação do gene *mecA*, detecção do gene para a produção de *PVL* e detecção dos genes *icaA* e *icaD*. Todas as amostras de *S. aureus* mostraram um amplo perfil de resistência aos antimicrobianos usualmente empregados na rotina clínica. Através do teste de CIM observou-se que das 68 amostras, clínicas 58 (85%) apresentaram resistência à oxacilina e dessas 55 (95%) carregavam o gene *mecA*. As 58 amostras de oxacilina resistentes identificadas pelo CIM 55 (98%) também se mostraram resistentes pelo método de disco difusão. Entre as 79 amostras de portadores assintomáticos, 7 (9%) apresentaram resistência à oxacilina pelo método de CIM, e dessas, 6 (86%) expressaram o gene *mecA*. Para as 7 amostras de portadores resistentes à oxacilina, 6 (86%) apresentaram resistência também pelo método de disco difusão. Entre as amostras isoladas de portadores à resistência, foi de 100% para penicilina e cefoxitina e 0% para linezolida, telitromicina e teicoplanina. Para as amostras

clínicas a resistência foi de 100% para penicilina, cefoxitina e telitromicina; e 0% para teicoplanina. Todas as amostras foram sensíveis à vancomicina pelos dois métodos empregados. O gene *PVL* foi identificado em apenas 1(14%) das 7 amostras oxacilina resistentes isoladas de portadores assintomáticos. O gene *icaA* e *icaD* concomitantemente foi detectado em apenas 1 (14%) das 7 amostras oxacilina resistentes procedentes de portadores assintomáticos e em 41(60%) das 68 amostras clínicas. A tipagem genética das 79 amostras de portadores assintomáticos demonstrou que entre 15 delas houve 100% de similaridade e entre 23 o grau de similaridade foi superior a 80%. Para as 68 amostras clínicas, verificou-se que 19 apresentaram 100% de similaridade, 3 tiveram similaridade próxima a 90%, 23 acima de 84% e 19 em torno de 80% de similaridade.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*. Infecção hospitalar. Infecção comunitária. Fatores de virulência. Tipagem bacteriana.

PIEKARSKI, Aline Cristina Rissato. **Phenotypic profile, genotype and virulence factors in *Staphylococcus aureus* isolated from clinical cases and asymptomatic carriers in a hospital the interior of Parana.** 2010. 66 f. Dissertation (Master's in Nursing)–Maringá State University, Maringá, 2010.

ABSTRACT

Healthy subjects are colonized by the *Staphylococcus aureus* since breastfeeding and this microorganism can be found in the nasopharynx, skin and vagina. From these areas this bacteria can be transmitted to susceptible subjects causing them infections. The *S. aureus* has been associated to hospital and community infections whereas the severity of the disease depends on the expression of virulence factors and the resistance profile towards antimicrobial agents applied in clinical practice. The aim of this study was to assess the phenotypic and genotypic profile and the virulence factor of *Staphylococcus aureus* samples isolated from symptomatic and asymptomatic carriers. Therefore 147 *S. aureus* samples stored at the Maringá State University Laboratory were used, where 68 were drawn from infection associated with health care cases and 79 were drawn from asymptomatic carriers. The susceptibility to antimicrobial agents was assessed using the disc diffusion method as recommended by the CLSI, and for the oxacillyn and vancomycin resistance the minimum inhibitory concentration (MIC) determination test was also used. The DNA was extracted with Ctab and the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique was applied for the genetic characterization with the RW3A oligonucleotide, identification of the *mecA* gene, detection of the gene for the production of *PVL* and detection of the *icaA* and *icaD* genes. All *S. aureus* samples showed a wide range of resistance to the antimicrobial agents often used in clinical practice. The MIC test results showed that from the 68 symptomatic samples, 58 (85%) presented oxacillyn resistance and 55 (95%) of them carried the *mecA* gene. For the 58 oxacillyn resistant samples identified by the MIC test, 55 (98%) also displayed resistance using the disc diffusion method. Among the 79 asymptomatic carriers samples, seven (9%) were oxacillyn resistant by the MIC test and six (86%) expressed the *mecA* gene. For the seven oxacillyn resistant samples from asymptomatic carriers, six (86%) also showed resistance by the disc diffusion method. The samples isolated from asymptomatic carriers had 100% resistance for penicillyn and cefoxitin and 0% to linezolid, telithromycin and

teicoplanin. The samples isolated from symptomatic cases had 100% resistance for penicillin, cefoxitin and telithromycin and 0% to teicoplanin. All samples were sensitive for vancomycin by both methods applied. The *PVL* gene was detected in only one (14%) of the seven oxacyllin resistant samples isolated from asymptomatic carriers. The *icaA* and *icaD* genes were both detected in only one (14%) of the seven oxacillyn resistant samples isolated from asymptomatic carriers and in 41 (60%) of 68 samples isolated from symptomatic clinical cases. The genetic characterizations of the 79 samples isolated from asymptomatic carriers showed that 15 of them shared a similarity rate of 100% and 23 showed a similarity rate above 80%. From the 68 symptomatic clinical samples, 19 presented a similarity rate of 100% and three shared a similarity rate above 90%, 23 above 84% and 19 shared a similarity rate around 80%.

Keywords: *Staphylococcus aureus*. Cross infection. Community infection. Virulence factors. Bacterial typing techniques.

PIEKARSKI, Aline Cristina Rissato. **Perfil fenotípico, el genotipo y factores de virulencia de *Staphylococcus aureus* aisladas de casos clínicos y los portadores asintomáticos en un hospital del interior de Paraná** . 2010. 66 f. Disertación (Maestría em Enfermería), Universidad Estadual de Maringá. Maringá, 2010.

RESUMEN

Individuos sanos son colonizados por *Staphylococcus aureus* desde el periodo de lactancia, pudiendo albergar el microorganismo en la nasofaringe, superficie corporal y en la vagina. A partir de esos sitios pueden ser transmitidos para individuos susceptibles ocasionando infecciones. *S. aureus* ha sido asociado a la etiología de las infecciones hospitalarias y comunitarias y la gravedad de la enfermedad depende de la expresión de factores de virulencia y del perfil de resistencia frente a los antimicrobianos comunmente utilizados en la práctica clínica. El objetivo de este estudio fue evaluar el perfil fenotípico, genotípico y factores de virulencia de muestras de *Staphylococcus aureus* aislados de casos clínicos, infección hospitalaria y de portadores asintomáticos. Se utilizó 147 muestras de *S. aureus* estocadas en el Laboratorio de la Universidade Estadual de Maringá siendo 68 procedentes de casos clínicos de infecciones asociadas con el cuidado de la salud y 79 de portadores asintomáticos. La susceptibilidad a los antimicrobianos fue evaluada por el método de disco difusión, conforme recomendaciones del CLSI, siendo que para oxacilina y vancomicina también se utilizó el test de determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM). El DNA fue extraído con Ctab y la técnica de Reacción en Cadena de la polimerase (PCR) fue empleada para la realización tipaje genética con el oligonucleotídeo RW3A, identificación del gen *mecA*, detección del gen para la producción de *PVL* y detección de los genes *icaA* e *icaD*. Todas las muestras de *S. aureus* mostraron un amplio perfil de resistencia a los antimicrobianos usualmente empleados en la rutina clínica. A través del test de CIM se observó que de las 68 muestras clínicas 58 (85%) presentaron resistencia a oxacilina y de estas 55 (95%) (acarreaban) el gen *mecA*. Para las 58 muestras oxacilina resistentes identificadas por el CIM 55 (98%) también se mostraron resistentes por el método de disco difusión. Entre las 79 muestras de portadores asintomáticos 7 (9%) presentaron resistencia a la oxacilina por el método de CIM y de estas 6 (86%) manifestaron el gen *mecA*. Para las 7 muestras de portadores resistentes a oxacilina 6 (86%) presentaron resistencia también por el método de disco difusión. Entre las muestras aislada de portadores a resistencia fue de 100%

para penicilina y cefoxitina y 0% para lenezolida, teletromicina y teicoplanina. Para las muestras clínicas la resistencia fue de 100% para penicilina, cefoxitina y telitromicina; y 0% para teicoplanina. Todas las muestras fueron sensibles a vancomicina por los dos métodos empleados. El gen *PVL* fue identificado en sólo 1 (14%) de las 7 muestras oxacilina resistentes aisladas de portadores asintomáticos. El gen *icaA* e *icaD* concomitantemente fue detectado en solo 1(14%) de las 7 muestras oxacilina resistentes procedentes de portadores asintomáticos y en 41 (60%) de las 68 muestras clínicas. El tipaje genética de las 79 muestras de portadores asintomáticos demostró que entre 15 de ellas hubo 100% de similitud y entre 23 el grado de similitud fue superior a 80%. Para las 68 muestras clínicas se observó que 19 presentaron 100% de similitud, 3 tuvieron similitud próxima a 90%, 23 (a cima) de 84% y 19 alrededor de 80% de similitud.

Palabras-clave: *Staphylococcus aureus*. Infección hospitalaria. Infección comunitaria. Factores de virulencia. Técnica de tipificación bacteriana.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Tabela 1	Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> isolados de portadores assintomáticos e de casos clínicos, avaliadas por meio do método de disco difusão.....	43
Figura 1	Resultados da análise de similaridade das amostras de <i>S. aureus</i> isoladas de portadores assintomáticos realizado através do programa Numerical Taxonomy System (NTSYS)	45
Figura 2	Resultados da análise de similaridade das amostras clínicas de <i>S. aureus</i> realizado através do programa Numerical Taxonomy System (NTSYS).....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMH	Agar Mueller Hinton
AMS	Agar Manitol Salgado
ATCC	<i>American Type Culture Colleciton</i>
CA-MARSA	<i>Staphylococcus aureus</i> comunitário resistente à meticilina/oxacilina
CH- MARSA	<i>Staphylococcus aureus</i> hospitalar resistente à meticilina/oxacilina
CIA	Clorofórmio Álcool Isoamílico
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CNA	Proteína de Ligação ao Colágeno
CTAB	Cetyl Trimethylammonium Bromide
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra- Bromide
<i>Fem</i>	<i>Factor essential for methicilyn resistance</i>
GISA	<i>S. aureus</i> com resistência intermediária aos glicopeptídeos
IACS	Infecção associada aos cuidados em saúde
<i>Ica</i>	<i>Intercellular adhesion</i>
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina/oxacilina
NACL	Cloreto de Sódio
NCCLS	<i>National Committee for Clinical Laboratoru Standards</i>
NTSYS	Numerical Taxonomy System
ORSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à oxacilina/meticilina
PBP	Proteína fixadora de penicilina
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
PIA	Adesina polissacarídea intercellular
PVL	Leucocidina de Panton Valentine
<i>S. aureus</i>	<i>Stataphylococcus aureus</i>
SCCmec	Stataphylococcal Chromosomal Cassette
SEC	Enterotoxinas
TE	Solução de Tris-HCL 10 mM e EDTA 1mM
TSB	Caldo de Soja Trypticaseína
TSST-1	Toxina da Síndrome do Choque Tóxico

UEM	Universidade Estadual de Maringá
VISA	<i>S. aureus</i> com resistência intermediária à vancomicina
VRSA	<i>S. aureus</i> resistente à vancomicina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	OBJETIVOS	22
2.1	Objetivo geral	22
2.2	Objetivos específicos	22
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
3.1	O gênero <i>Staphylococcus</i>	23
3.2	<i>Staphylococcus aureus</i>	23
3.3	A patogenicidade do <i>S. aureus</i>	24
3.4	Infecção hospitalar x infecção comunitária	26
3.5	Resistência antimicrobiana	28
3.6	Testes antimicrobianos	30
3.7	Estudos genotípicos	31
4	MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1	Tipo e local de estudo	33
4.2	Amostras bacterianas de estudo	33
4.3	Procedimentos laboratoriais	34
4.3.1	Reativação das amostras e Coloração de Gram.....	34
4.3.2	Teste da Coagulase em tubo.....	34
4.3.3	Testes de susceptibilidade antimicrobiana.....	35
4.3.3.1	<i>Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)</i>	35
4.3.3.2	<i>Teste de disco difusão</i>	36
4.4	Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)	37
4.4.1	Extração de DNA.....	37
4.4.2	Tipagem genética.....	38
4.4.3	Detecção do gene <i>mecA</i>	39
4.4.4	Detecção do gene para a produção da Leucocidina de Panton Valentine (<i>PVL</i>)	39
4.4.5	Detecção dos genes <i>icaA</i> e <i>icaD</i>	40
5	RESULTADOS	42
5.1	Susceptibilidade a oxacilina pelo método da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	42

5.2	Susceptibilidade antimicrobiana pelo método de disco difusão.....	42
5.3	Detecção do gene <i>mecA</i>	43
5.4	Detecção do gene para a produção da Leucocidina de Panton Valentine (PVL).....	44
5.5	Detecção dos genes <i>icaA</i> e <i>icaD</i>	44
5.6	Tipagem genética.....	44
6	DISCUSSÃO.....	47
7	CONCLUSÃO.....	53
	REFERÊNCIAS.....	54

1 INTRODUÇÃO

Infecções hospitalares, segundo o Ministério da Saúde, são aquelas adquiridas após a admissão de um paciente em um hospital, quer se manifestem durante a internação ou após a alta, quando puderem ser relacionadas com o período de hospitalização ou procedimentos médicos (BRASIL, 1998, 2004a). De acordo com Fernandes e Ribeiro Filho (2000), a infecção hospitalar é o envolvimento e a interação de fatores complexos, relacionados ao micro-organismo e ao hospedeiro, que violam o equilíbrio da microbiota normal e as próprias defesas do hospedeiro. Ainda conforme os referidos autores, as principais causas da infecção hospitalar têm origem no desequilíbrio ecológico entre as comunidades microbianas que habitam as superfícies epiteliais e das mucosas dos seres humanos e os mecanismos de defesa anti-infecciosos, decorrentes de procedimentos invasivos e do uso indiscriminado de antimicrobianos.

A Organização Mundial de Saúde considera entre 9% a 20% um índice de infecção hospitalar médio aceitável (ASSOCIAÇÃO PAULISTA DE ESTUDOS E CONTROLE DE INFECÇÃO HOSPITALAR, 2005). Em consonância com o Ministério da Saúde, nos EUA e na Europa, a taxa média de infecção hospitalar é de 10% e, no Brasil, é de cerca de 15%. Salienta-se, entretanto, que esse índice varia significativamente, já que está diretamente relacionado com o grau de atendimento e complexidade de cada hospital (FERNANDES, 2000b; BRASIL, 2004b).

Entre os grupos de patógenos envolvidos na etiologia das infecções hospitalares destacam-se mais aquele constituído pelas bactérias da microbiota humana normal, as quais podem causar infecção em indivíduos com estado clínico comprometido (SNYDMAN, 2002).

Indivíduos sadios são colonizados intermitentemente por *Staphylococcus* spp desde a amamentação, podendo albergar o micro-organismo na nasofaringe, superfície corporal e na vagina. A partir desses sítios podem contaminar a pele e membranas mucosas de pacientes, objetos inanimados por contato direto ou por aerossol, ocasionando infecções letais determinadas pelos fatores de virulência e resistência aos antimicrobianos (BRASIL, 2004b; KRAMER; SCHWEBKE; KAMPF, 2006).

O gênero *Staphylococcus* possui pelo menos 42 espécies, sendo que três delas com maior importância clínica: o *Staphylococcus saprophyticus* é comum em infecções do trato urinário em mulheres, o *Staphylococcus epidermidis* está geralmente associado a dispositivos e

aparelhos implantados e o *Staphylococcus aureus*, que ocasiona desde infecções cutâneas e alimentares até infecções graves e fatais (JAWETZ; MELNICK; ADELBERG, 1998).

Staphylococcus aureus tem como característica marcante sua elevada ocorrência entre as infecções associadas aos cuidados de saúde devido a sua versatilidade em adquirir resistência, especialmente às drogas beta-lactâmicas (EL-FAR; RICHTMANN, 2001; BRASIL, 2004a). A oxacilina é uma droga pertencente ao grupo betalactâmico utilizada para tratar infecção causada por *Staphylococcus aureus* produtor de penicilinase. A resistência a essa droga é um marcador de resistência que se estende a todos os betalactâmicos utilizados na terapêutica (FERNANDES *et al.*, 2000; SILVA; RAVANELLO, 2003; ALMEIDA, 2004).

O aumento das infecções associado aos cuidados de saúde por *S. aureus* resistentes à oxacilina (ORSA) foi acompanhado pelo crescimento da resistência a vários antibióticos, como os aminoglicosídeos, quinolonas, macrolídeos, tetraciclinas (RIBEIRO; BOYCE; ZANCANARO, 2005), contudo a preocupação atual se concentra na identificação precoce de ORSA com resistência à vancomicina. A vancomicina é uma das últimas drogas desenvolvidas para o tratamento de infecções por ORSA (FERREIRA, 2003).

A partir do conhecimento da sequência do DNA genômico dos *S. aureus* identificou-se um elemento denominado *Staphylococcal Cassete Chromosome mec (SCCmec)* (KATAYAMA; ITO; HIRAMATSU, 2000; TAYLOR; HEINRICHS, 2002; TEIXEIRA *et al.*, 2008). Esse elemento é composto por 7 subunidades genéticas (I a VII) denominadas genes *mec*, os quais determinam a resistência à meticilina/oxacilina em amostras de *Staphylococcus sp* (DEURENBERG; STOBBERINGH, 2008).

O *Staphylococcus aureus* apresenta vários fatores de virulência que contribuem para a produção de doenças, entre os quais se destacam a cápsula, presença de proteína A na parede celular, constituição da parede celular, produção de enzimas, presença de hemolisinas e produção de toxinas. A virulência, que é multifatorial, é regulada por genes que, por sua vez, podem ter a sua expressão ativada ou inibida. Constantemente são descobertas novas propriedades patogênicas peculiares ao *Staphylococcus aureus* (KONEMAN *et al.*, 2001; SCHAECHTER; EISENSTEIN; ENGLEBERG, 2002; O'RIORDAN; LEE, 2004).

A capacidade de o *Staphylococcus aureus* evadir-se do sistema imune do hospedeiro é associada à existência de fatores de virulência (SOMERVILLE *et al.*, 2002). Diversos genes codificam fatores de virulência, tais como enterotoxina, toxina da síndrome do choque tóxico (tsst-1), toxinas esfoliativas, leucocidinas e proteínas associadas à superfície como, por exemplo, a proteína de ligação ao colágeno (*cna*) e o gene *icaAD*, um dos responsáveis pela produção do biofilme (PROJAN *et al.*, 1997; CAFISO *et al.*, 2004).

Donlan e Costerton (2002) afirmam que biofilme é uma comunidade de microorganismos sésseis caracterizada por células que se aderem a um substrato, interface ou umas às outras, embebidas em matriz ou polímero extracelular, que exibem um fenótipo alterado a respeito de crescimento, expressão gênica e produção de proteínas.

Através de microscopia e estudos genéticos, observou-se que os *S. aureus* produzem biofilme em extensas multicamadas celulares envoltos em uma substância amorfa denominada *Slime*. O biofilme tem sido considerado um dos principais fatores de virulência de *Staphylococcus* sp (ARCIOLA *et al.*, 2006). A produção de biofilme se dá pela presença e expressão de genes do operon *ica* e tem papel importante na patogênese da doença e na virulência das cepas envolvidas em infecções associadas a dispositivos médicos implantados (DOBINSKY *et al.*, 2003; FITZPATRICK; HUMPHREUS; O’GARA, 2005).

S. aureus multirresistentes a antimicrobianos e carreando importantes fatores de virulência vêm sendo isolados de infecções comunitárias, deixando assim de ser uma cepa exclusiva do ambiente hospitalar. Um dos focos dessa infecção foi diagnosticado no Uruguai em 2002, havendo ainda relatos de casos em 1993 na Austrália (VANDEENECH *et al.*, 2003). As principais diferenças entre o *S. aureus* hospitalar (CH-MARSA) e o *S. aureus* comunitário (CA-MARSA) está na sensibilidade aos antimicrobianos, nos fatores de virulência e no quadro clínico da doença (RIBACK; LAPLANTE, 2005). Ainda de acordo com o referido autor o CA-MARSA pode carrear a toxina denominada leucocidina de Pantón – Valentine e outras enterotoxinas, sendo a leucocidina responsável pela destruição dos leucócitos e necrose tecidual.

A caracterização genotípica de patógenos envolvidos na etiologia das infecções bacterianas é uma ferramenta importante para a prática clínica, além de propiciar dados para o melhor conhecimento da epidemiologia e patogênese dos processos infecciosos. A partir do conhecimento do perfil genético dos isolados é possível se fazer inferências sobre as relações entre os diferentes clones, detectar o fluxo gênico e traçar as rotas de dispersão da infecção (SOMMERÄUSER *et al.*, 2003).

Existem várias técnicas de tipagem genética, entre as quais se ressalta a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) desenvolvida por Kary Mullis em 1983, a qual baseia-se nos princípios de replicação do DNA *in vivo*. Essa técnica é realizada por meio de uma reação bioquímica *in vitro* que permite a amplificação de uma ou mais regiões da molécula de DNA as quais, depois de amplificadas, podem ser visualizadas como uma banda discreta, por meio de eletroforese em gel de agarose, corado com brometo de etídeo (OLIVEIRA; DE LENCASTRE, 2002). A técnica de PCR faz uso de “*primers*” complementares de sequências

de DNA repetitivas altamente conservadas e presentes em múltiplas cópias nos genomas da maioria das bactérias. Essas sequências parecem estar localizadas em posições intergênicas distintas no interior do genoma (OLIVEIRA; LENCASTRE, 2002).

Considerando o exposto, surge a intenção, enquanto enfermeira, de estudar um patógeno com importante perfil dentro do âmbito das infecções. A prática diária de assistência sempre indicava a diferença clínica de tratamento entre pacientes provenientes da comunidade colonizada daqueles que passavam a ser contaminados no próprio ambiente hospitalar. Por fazer parte do quadro de funcionários de unidades de terapia intensiva (UTI) e também de comissões de controle de infecção hospitalar (CCIH), observava a evolução distinta dos casos clínicos e terapêuticas utilizadas, surgindo daí a vontade de aprofundar as pesquisas relativas a esse micro-organismo.

A partir do estudo do perfil fenotípico e genotípico do *Staphylococcus aureus* é possível contribuir com o conhecimento acerca das infecções envolvendo o patógeno e sobre seu perfil de sensibilidade aos antimicrobianos, bem como identificar alguns de seus fatores de virulência. Esses conhecimentos podem auxiliar na implementação de medidas de controle de infecções, prevenindo a morbidade, a letalidade e os custos para o tratamento das infecções associadas aos cuidados em saúde bem como para se repensar a importância de se controlar as infecções comunitárias, as quais podem ser agravantes de processos infecciosos. Nesta perspectiva, a presente pesquisa tem como justificativa estudar um micro-organismo que ocupa lugar de destaque na etiologia das infecções hospitalares, apresentando grande versatilidade na aquisição de resistência aos antimicrobianos e também vários genes que codificam diferentes fatores de virulência.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o perfil fenotípico e genotípico de amostras de *Staphylococcus aureus* isolados de casos clínicos e de portadores assintomáticos de uma instituição de saúde do interior do Paraná.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar o perfil de resistência às drogas antimicrobianas de amostras de *Staphylococcus aureus* isolados de casos clínicos e de portadores assintomáticos.
- Verificar, através da técnica de Reação em Cadeia de Polimerase, a presença do gene *mecA*.
- Identificar a presença de genes codificadores de fatores de virulência para Leucocidina de Panton Valentine e produção do biofilme bacteriano em amostras de *Staphylococcus aureus* isolados de portadores assintomáticos e de casos clínicos.
- Realizar a tipagem genética das amostras de *S. aureus* empregando-se o oligonucleotídeo RW3A.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 O gênero *Staphylococcus*

De acordo com *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, o gênero *Staphylococcus* (do grego “*staphyle*” = cacho de uvas e “*coccus*” = semente ou grão) pertence à família *Micrococcaceae*. Apresenta-se em forma de cocos Gram-positivos, com 0,5 a 1,5 µm de diâmetro, formando cachos devido a sua divisão ocorrer de maneira aleatória e em diversos planos. São imóveis, não esporuladas e suas colônias são relativamente grandes, com 1 a 2 mm de diâmetro. As colônias são opacas, convexas, cremosas e suas cores variam do branco a vários tons de amarelo, dependendo da espécie (KONEMAN *et al.*, 2001).

As bactérias pertencentes a esse gênero são catalase e termonuclease positivas, coagulase positivas ou negativas, dependendo da espécie (KLOSS; LAMBE, 1991). Somente as espécies *S. aureus*, *S. delphini*, *S. intermedius*, *S. schleiferi coagulans* e algumas cepas de *S. hyicus* são coagulase positiva. A maioria das espécies de *Staphylococcus* é coagulase negativa (BAIRD-PARKER, 1990).

Os estafilococos são mesófilos, apresentando temperatura de crescimento na faixa de 4 °C a 46 °C, sendo a temperatura ótima de 35 °C a 37 °C e são tolerantes a concentrações de 10% a 20% de cloreto de sódio (FRAZIER; WESHOFF, 2000). Apresentam capacidade de crescer dentro de uma escala compreendida entre os valores de pH 4,0 e 9,8, sendo o pH ótimo para crescimento compreendido entre 6,0 e 7,0 (FRANCO; LANDGRAFF, 2000).

O gênero *Staphylococcus* abrange aproximadamente 42 espécies diferentes (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2006), sendo 20 associadas a uma ampla variedade de infecções de caráter oportunista, em seres humanos e animais (KONEMAN *et al.*, 2001). Em patologias humanas, as principais espécies envolvidas são: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus saprophyticus* (TRABULSI *et al.*, 2002).

3.2 *Staphylococcus aureus*

S. aureus é o patógeno humano mais importante entre os estafilococos. É encontrado no ambiente externo e em narinas anteriores de 20%-40% dos adultos, enquanto que 60% dos

humanos podem ser colonizados temporariamente (BANIA *et al.*, 2006). Outros sítios de colonização incluem pregas cutâneas, períneo, axilas e vagina (KONEMAN *et al.*, 2001).

Esse patógeno representa a espécie geralmente envolvida em infecções humanas, tanto de origem comunitária quanto hospitalar, sendo, conseqüentemente, a mais extensivamente estudada. *S. aureus* é responsável por uma imensa quantidade de problemas médicos, incluindo infecções de pele e tecidos moles, infecções de sítios cirúrgicos, endocardites e bacteremias adquiridas em hospitais. Um grande número de infecções já foi relatado por conta do desenvolvimento de procedimentos médicos, incluindo o uso de próteses, imunossupressores e cateteres (CASEY; LAMBERT; ELLIOTT, 2007).

São patógenos oportunistas e a maioria das cepas produz hemolisinas, que são enzimas que lisam as hemácias. São desoxirribonuclease (DNAse) e nuclease termoestável positivos, novobiocina sensíveis e fermentam manitol. Comumente encontrados nas fossas nasais, garganta, intestino, pele humana e em mucosas, tais como bucal, nasal e auricular. As infecções estafilocócicas podem ser causadas por bactérias do próprio indivíduo, de outros doentes ou de portadores sadios que ocorrem por contato direto ou indireto e podem ocasionar foliculite, furunculose, carbunculose e impetigo quando na pele (KONEMAN *et al.*, 2001; TRABULSI *et al.*, 2002; BERNARDO *et al.*, 2005).

Em indivíduos debilitados por doenças crônicas, traumas físicos, queimaduras ou imunossupressão, *S. aureus* pode causar infecções mais graves. No caso de infecções mais profundas, destacam-se a osteomielite, bacteremia, endocardite, pneumonia, meningite e artrite bacteriana (TRABULSI *et al.*, 2002; SPICER, 2002).

3.3 A patogenicidade do *S. aureus*

A patogenicidade do *S. aureus* é multifatorial e geralmente envolve um grande número de proteínas extracelulares, como a produção de citotoxinas e exoenzimas (VOJTOV; ROSS; NOVICK, 2002). Algumas cepas produzem uma série de toxinas extracelulares e fatores de virulência que contribuem para a patogenicidade do micro-organismo, garantindo o sucesso na sua instalação, desenvolvimento e manutenção no tecido hospedeiro (AKINEDEN *et al.*, 2001; DEGO; VAN DIJK; NEDERBRAGT, 2002; PALMQVIST *et al.*, 2002; STEVENS *et al.*, 2007).

As exotoxinas são proteínas ou enzimas produzidas no interior de algumas bactérias Gram-positivas e liberadas na corrente sanguínea. Em indivíduos infectados ou portadores, são decorrentes da multiplicação e metabolismo dos micro-organismos. Classicamente são agrupadas em três tipos, de acordo com seu modo de ação: citotoxinas, que destroem as células do hospedeiro ou afetam suas funções; neurotoxinas, que interferem na transmissão normal de impulsos nervosos; e enterotoxinas, que afetam as células que revestem o trato gastrointestinal. As endotoxinas correspondem à porção externa da parede celular (lipopolissacarídeos) das bactérias Gram-negativas, que são liberadas após a morte bacteriana ou mesmo após a lise da parede celular (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

A interação do micro-organismo com o hospedeiro é fortemente dependente das propriedades de sua superfície celular, especificamente da presença de exopolissacarídeos na sua camada mais externa, que parece desenvolver um importante papel na virulência. Algumas cepas de *S. aureus* são capazes de produzir essas camadas de exopolissacarídeo ou biofilme (CHRISTENSEN *et al.*, 1990; CUCARELLA *et al.*, 2001; ARSLAN; ÖZKARDES, 2007) que devem impedir a interação entre opsonização e fagocitose (WILKINSON, 1983), além de reduzirem a suscetibilidade a antibióticos, aumentando significativamente a capacidade de colonização dessas cepas (BASELGA *et al.*, 1993).

Essa bactéria pode ocasionar doenças com manifestações clínicas ou ser assintomática, originando os portadores assintomáticos quando presente no organismo hospedeiro, não causando lesões aparentes (CAVALCANTI *et al.*, 2006). A transmissão pode acontecer por contato direto ou indireto, o que possibilita a contaminação do paciente por meio dos profissionais de saúde que dão assistência a outros hospitalizados portadores, ou no manuseio de objetos contaminados (ELLIOT *et al.*, 2002; TAMMELIN *et al.*, 2003). O portador da bactéria tem papel essencial na epidemiologia e patogênese da infecção, aparecendo como importante fator de risco nas infecções hospitalares, já que a maioria dessas infecções é proveniente de fontes exógenas (VANDENBERGH; VERBRUGH, 1999; PERL *et al.*, 2002).

Essas bactérias encontram-se na ponte entre o comensalismo e a patogenicidade, portanto desenvolvem interessantes estratégias para enfrentarem inúmeras condições adversas. Formação de biofilme, aquisição de resistência a antibióticos diversos, bem como a enorme flexibilidade do genoma estafilocócico, são pré-requisitos para a sobrevivência em ambientes específicos. Estas são as principais razões pelas quais os estafilococos tornaram-se importantes patógenos nas infecções (BECKER *et al.*, 2007).

Considerados por longo tempo como contaminantes inofensivos, emergiram como capazes de causar várias infecções humanas, que frequentemente conduzem a uma infecção

persistente, principalmente após cirurgia de implantes; também são responsáveis por doenças em pacientes imunocomprometidos (VANDENESCH *et al.*, 1995; COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999; ARCIOLA; BALDASSARI; MONTANARI, 2002; COSTERTON; MONTANARO; ARCIOLA, 2005). Algumas espécies produzem um muco ou *slime* (polissacarídeo extracelular) – biofilme – que permite à bactéria aderir às superfícies, sendo importante para a colonização. A produção de *slime* é considerada um fator de virulência (TENOVER; LANCASTER; HILL, 1988; VEENSTRA *et al.*, 1996; VUONG; OTTO, 2002). O *slime* pode reduzir também a resposta imune aos fagócitos, interferindo com os mecanismos de defesa do hospedeiro.

O biofilme confere ainda proteção aos micro-organismos contra os mecanismos de defesa imunes do hospedeiro e de agentes antimicrobianos, ocorrendo diretamente pelo bloqueio da penetração destes na célula bacteriana ou indiretamente por mantê-la em um inativo estado de repouso. Por essas razões, a formação do biofilme é considerada o principal fator de virulência e as mais importantes infecções causadas por esses micro-organismos são aquelas que envolvem corpos estranhos (MULDER; DEGENER, 1998; CAFISO *et al.*, 2004; MICHELIM *et al.*, 2005).

Outro fator importante de virulência, além da formação do biofilme, é a presença da Leucocidina de Pantón Valentine (*PVL*), que é uma citotoxina que causa destruição dos leucócitos e necrose tecidual por meio da ação sinérgica de duas proteínas denominadas “S” e “F”. Essa toxina bicomposta (lukS– PV e lukF– PV) está presente em menos de 5% de *S. aureus* hospitalar e associa-se principalmente a lesões de pele e mucosas e pneumonias necrotizantes graves (LINA *et al.*, 1999). Em amostras de *S. aureus* resistentes à oxacilina de origem comunitária (CA-MARSA) essa toxina é mais frequente (DIEDEREN; KLUYTMANS, 2005).

3.4 Infecção hospitalar x infecção comunitária

As infecções hospitalares, ou nosocomiais, são infecções adquiridas no hospital não manifestas **ou fora** do período de incubação no ato da admissão, a menos que estejam relacionadas a internações prévias ou procedimentos invasivos realizados no mesmo hospital. (MARTINS, 2002).

Elas surgiram juntamente com os hospitais. Mesmo não havendo registros, sabe-se que era elevada a incidência de infecções adquiridas nos hospitais devido às precárias condições de higiene e à elevada prevalência das doenças epidêmicas na comunidade. Martins (2002) informa que apenas na metade do século XIX a questão das infecções hospitalares passa a ser enfocada pelos profissionais da saúde. Acrescenta que Ignaz Philipp Semmelweis preconizava a higienização das mãos com água clorada antes da realização de partos, medida esta que contribuiu para a redução da mortalidade materna por febre puerperal. Essa higienização possibilitou que a morbidade infantil passasse de 12% para 3%, conforme registros da época. No mesmo período na Inglaterra, algumas medidas, tais como o isolamento de pacientes por patologia, puderam comprovar a diminuição das doenças infecciosas nosocomiais (FERNANDES, 2000a, 2000b; BOARINI, 2003).

Através do novo *Guideline for Isolation Precautions: Preventing transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings* (SIEGEL, 2007), o termo infecção hospitalar é substituído por infecções associadas aos cuidados em saúde (IACS), porque a transição da realização dos cuidados médicos para outros serviços de saúde, como domicílios e ambulatórios, criou a necessidade de rever as recomendações que pudessem ser aplicadas em todos os ambientes e fez refletir sobre os padrões de mudança desses cuidados, já que existia, então, a dificuldade na determinação do local geográfico de exposição a um determinado agente infeccioso.

As infecções associadas aos cuidados de saúde são importantes porque produzem danos à saúde e aumentam o tempo de internação, a morbidade e a letalidade. Dessa forma, recursos de diagnóstico e tratamento representam uma ameaça constante de disseminação de bactérias multirresistentes (AVILA-FIGUEROA *et al.*, 1999; RICHTMANN, 2002).

O problema da infecção atinge entre 5% e 15% dos pacientes hospitalizados e de 25% a 35% dos pacientes admitidos em UTI (EGGIMANN; SAX; PITTET, 2004). No Brasil, as infecções hospitalares configuram-se como a quarta causa de mortalidade, estão entre os principais problemas encontrados no âmbito hospitalar e provocam graves repercussões econômicas e sociais (CORTÉS *et al.*, 2000; SANTOS, 2000).

O próprio ambiente hospitalar é considerado um grande reservatório de patógenos virulentos e oportunistas e, assim, as infecções associadas aos cuidados de saúde podem ser adquiridas não apenas por pacientes que apresentam maior suscetibilidade, mas também de forma menos frequente por funcionários do próprio hospital (BRASIL, 2004b).

Até então estritamente nosocomial, e um dos patógenos mais importante em infecções hospitalares nos últimos 10 anos, infecções por essas bactérias resistentes (MRSA) começaram

a aparecer também na comunidade. *Staphylococcus aureus* adquirido na comunidade (CA-MRSA) é um patógeno emergente que vem apresentando frequência crescente (FARIA *et al.*, 2005).

Embora as infecções comunitárias sejam geralmente cutâneas, doenças invasivas como bacteremias, endocardites, osteomielites e pneumonias já foram descritas e surtos de infecção hospitalar por cepas comunitárias também já foram relatados (BARTLETT, 2004).

Feu *et al.* (2003) postulam que a origem do *S. aureus* comunitário ainda é indefinida, há hipóteses de aquisição do Dna do *mec* pelas cepas previamente susceptíveis que circularam na comunidade. Estudos recentes indicam que há sete elementos *mecA* identificados, os quais são designados de I a VII, sendo o elemento *mecIV* associado ao CA – MRSA (DEURENBERG; STOBBERINGH, 2008). Essa cepa é geralmente sensível a vários antibióticos. Pode ser verificada a produção de até 18 toxinas não encontradas no MARSA hospitalar, incluindo Panton-Valentine Leucocidina (*PVL*) (GORWITZ *et al.*, 2006). Essa toxina foi identificada em 1984 com potencial lise de leucócitos, sendo as infecções por *S. aureus PVL* positivos mais severas do que as infecções por *S. aureus PVL* negativos (BOYLE-VAVRA; DAUM, 2007).

3.5 Resistência antimicrobiana

Com o surgimento da bacteriologia, aderiu-se ao princípio de que, para cada doença, um agente etiológico deveria ser identificado e combatido por meio de vacinas ou produtos químicos. Foi Louis Pasteur (1822-1895) que, em suas pesquisas, abriu o campo de estudo da bacteriologia. Esse período histórico foi ainda caracterizado pelas grandes conquistas da citologia e microbiologia, um período em que as observações demonstravam que a resistência a antibióticos entre micro-organismos de uma mesma população podia ocorrer. Outro estudioso, Paul Ehrlich (1854-1915), elaborou as teorias sobre o mecanismo de ação das drogas e a ligação a receptores específicos nas células sensíveis – princípio da quimioterapia – que desencadearam a era da pesquisa e da indústria química farmacêutica (FERNANDES, 2000a; BOARINI, 2003).

Com o desenvolvimento da terapia antimicrobiana, foi também conhecida pelo homem a resistência microbiana. Em 1929, foi observada a resistência natural de micro-organismos aos antibióticos em uma mesma colônia, sendo caracterizada como resistência natural ou resistência adquirida. Um exemplo foi em relação à produção de uma enzima, a penicilinase, que inativava

a penicilina. Em 1946, 5% dos *Staphylococcus* eram resistentes às penicilinas. Entre 1950 e 1959, já havia relatos de resistência bacteriana, variando de 50% a 90% em vários hospitais. E com o desenvolvimento dos estudos, a resistência alcançou praticamente todas as espécies (TAVARES, 1996; FERNANDES, 2000c; MURRAY *et al.*, 2004b; RICARDO, 2004). A resistência a antimicrobianos também foi evidenciada em infecções estafilocócicas de origem comunitária (RICARDO, 2004).

A resistência antimicrobiana é reflexo dos hábitos de uso dos antimicrobianos em cada comunidade, sendo imprescindível conhecer o padrão de resistência em cada grupo de pacientes atendidos em cada hospital (AUBRY-DAMON; COURVALIN, 1999). Monitorar a evolução da resistência do *S. aureus* é muito importante, não só por esta ser uma das bactérias mais frequentes na prática médica, mas também por sua capacidade de desenvolver resistência aos antimicrobianos com diferentes matizes de expressão fenotípica a um mesmo antibiótico (TODA, 2003).

A resistência intrínseca dos estafilococos a meticilina/oxacilina resulta de suas proteínas fixadoras de penicilinas (PABs), presentes na parede celular, as quais passam a ser expressas por um gene cromossômico adquirido, *mecA*, que codifica as PBP2' ou 2a, cuja afinidade com os antibióticos betalactâmicos é muito baixa. Essa resistência dos estafilococos aos antibióticos betalactâmicos pode depender de alguns fatores ambientais, como pH, temperatura e osmolaridade (RYFFEL; KAYSER; BERGER-BACHI, 1992).

Alguns genes, denominados genes auxiliares ou fatores essenciais ou genes *fem* (*factor essential for methicilin resistance*), ajudam o gene *mecA* a expressar um elevado nível de resistência aos betalactâmicos. Foram identificados muitos desses genes *fem*, denominados *femA*, *femB*, *femC*, *femD*, *femE* e *femF* (VANNUFFEL *et al.*, 1995). O gene *femA* é essencial para a expressão da resistência dos ORSA e parece ser uma característica peculiar de *S. aureus*, não sendo encontrado em outras espécies de estafilococos. Os genes *femA* e *mecA* têm sido detectados em cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina/oxacilina por meio de técnicas moleculares, como a reação de polimerase em cadeia (PCR). Essa técnica apresenta vantagens em relação às outras, porque oferece elevada eficácia e segurança, além de ser um método rápido e sensível (OLIVEIRA; LENCASTRE, 2002).

Em 1996, ocorreu o surgimento de estirpes de *S. aureus* com reduzida sensibilidade à vancomicina (CIM > 8-16 mcg/ml), inicialmente no Japão, a seguir nos Estados Unidos da América e agora em outros países (MIMICA; MENDES, 2007). Esses estafilococos, chamados inicialmente de VISA e GISA (siglas em inglês indicando *S. aureus* com resistência intermediária a vancomicina ou aos glicopeptídeos), são denominados

simplesmente VRSA (*S. aureus* Vancomicina Resistente) e encontram-se em expansão em hospitais japoneses (HIRAMATSU *et al.*, 1997).

Estafilococos com resistência aos glicopeptídeos foram encontrados no Brasil. Registrou-se o isolamento de *S. aureus* com resistência intermediária à vancomicina no Rio de Janeiro, em São Paulo e Porto Alegre, e de *Staphylococcus* coagulase negativos resistentes à vancomicina e à teicoplanina em São Paulo (SANTOS, 1997; MAMIZUKA; OLIVEIRA, 2000; SANTOS *et al.*, 2007).

Ainda pouco se sabe sobre a resistência adquirida pelo *S. aureus* à vancomicina (FRIDKIN *et al.*, 2001). Acredita-se que esta possa estar relacionada ao envolvimento do gene *Van*, que determina resistência de enterococos a esta droga, com a transmissão por meio de plasmídeos ou pelo espessamento da parede celular, com a produção de maiores quantidades de peptidoglicanos (CUI *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2007).

A resistência microbiana é um fenômeno biológico natural, mas se torna um problema significativo de saúde pública ao ser ampliada várias vezes, por abuso e negligência nas ações desenvolvidas, e inclusive por sua subutilização nos países em desenvolvimento. Em todos os casos, o uso inadequado de antibióticos de amplo espectro resultará posteriormente em drogas menos efetivas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001).

3.6 Testes antimicrobianos

De acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (2009c), vários são os testes realizados para verificação de resistência aos diversos antimicrobianos, entre eles destacam-se o teste de disco difusão e o teste de Agar diluição.

Os testes de sensibilidade são indicados para qualquer micro-organismo causador de um processo infeccioso que requeira terapia antimicrobiana, sempre que sua sensibilidade não possa ser predita de maneira confiável com base na identificação do micro-organismo e quando se acredita que o organismo causador da infecção pertence a uma espécie capaz de demonstrar resistência aos agentes antimicrobianos normalmente usados (NCCLS, 2003; *CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE*, 2009a).

Os testes de disco difusão baseados apenas na presença ou ausência de um halo de inibição, e sem consideração do tamanho do halo não são aceitáveis. Só podem ser obtidos resultados confiáveis com testes de disco difusão que usam o princípio de metodologia

padronizada e medidas do diâmetro do halo de inibição correlacionadas às concentrações inibitórias mínimas (CIMs), com cepas reconhecidamente sensíveis e resistentes a diversos agentes antimicrobianos (NCCLS, 2003).

Diversos são os antimicrobianos preconizados para a realização do Teste de Disco difusão, entre eles: oxacilina 1 µg, cefoxitina 30 µg, vancomicina 30 µg, gentamicina 10 µg, telitromicina 15 µg, tetraciclina 30 µg, linezolide 30 µg, penicilina G 10 µg, eritromicina 15 µg, clindamicina 2 µg, Trimetropim/sulfametoxazol 75 µg, doxicilina 30 µg, rifampicina 5 µg, teicoplanina 30 µg, ofloxacina 5 µg, esses preconizados pelo CLSI através de protocolos e medidas do diâmetro do halo de inibição (*CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE*, 2009c).

3.7 Estudos Genotípicos

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) permite que o DNA de uma região selecionada do genoma de um organismo seja amplificado milhares de vezes, selecionando efetivamente esse DNA do restante do genoma (ALBERTS *et al.*, 2004). Portanto, uma sequência-alvo de DNA é identificada e amplificada até um ponto em que pode ser detectada (KONEMAN *et al.*, 2001). A amplificação de regiões específicas do DNA é fundamental para diversas técnicas moleculares (COBB; CLARKSON, 1994).

As sequências nas bordas das regiões selecionadas precisam ser conhecidas, de modo que dois oligonucleotídeos iniciadores (*primers*), geralmente de 20pb, se associem à molécula de DNA-alvo possibilitando o início da síntese pela DNA-polimerase na região desejada (BROWN, 1999).

A PCR é realizada utilizando-se um “suporte quente” automatizado e computadorizado, denominado termociclagem. Para essa reação, são necessários: DNA, iniciador ou “*primer*” de oligonucleotídeos de cadeia simples, desoxirribonucleotídeos (dNTPs), tampão de reação, MgCl₂ em concentração adequada, uma DNA-polimerase termoestável “*Taq* DNA polimerase”. Esses componentes são colocados em um pequeno recipiente e depositados no termociclador (KONEMAN *et al.*, 2001). O recipiente contendo a amostra é submetido a uma elevada temperatura, geralmente 94°C, para provocar o rompimento das pontes de hidrogênio entre ambas as cadeias de DNA, causando a desnaturação da molécula. A temperatura é diminuída a 50-65°C, quando então os *primers*

têm a oportunidade de se anelarem as suas sequências complementares no DNA genômico. Finalmente, a temperatura é colocada em torno de 72°C, temperatura ideal para que a DNA-polimerase utilizada na reação atue, dirigindo a síntese de novas cadeias (FARAH, 1997). Repetindo-se esses três tipos de passos, desnaturação, anelamento e síntese, por cerca de 30 ciclos permite-se a amplificação do DNA molde de forma exponencial (FARAH, 1997; ZAHA *et al.*, 2003; TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

Del Vecchio *et al.* (1995) propalam que o oligonucleotídeo RW3A é uma das alternativas para a realização da tipagem genética por rep-PCR, na qual a sequência repetitiva do *primer* é complementar a do DNA e após amplificação esta pode ser visualizada como bandas por meio de eletroforese em gel e corante, através de luz ultravioleta, o que vem a ser importante do ponto de vista epidemiológico para se conhecer geneticamente diferentes tipos de cepas dispersas no ambiente hospitalar ou não (LIAO *et al.*, 2006).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Tipo e local de estudo

Estudo quantitativo de prevalência, realizado no Laboratório de Microbiologia Básica da Universidade Estadual de Maringá, no período de junho de 2008 a setembro de 2009.

4.2 Amostras bacterianas de estudo

Para este estudo, foram utilizadas 147 amostras estocadas no banco de bactérias do Laboratório de Microbiologia Básica da Universidade Estadual de Maringá, das quais 68 eram provenientes de casos clínicos de infecção e 79 de portadores assintomáticos. As amostras de portadores assintomáticos são provenientes de mães e recém-nascidos no Hospital Universitário de Maringá no período de fevereiro a abril de 2007 e as demais procedentes de casos clínicos foram isoladas durante os anos de 2007 e 2008.

Das 68 amostras de casos clínicos, 1 amostra foi proveniente de raspado de pele, 1 amostra de secreção de fístula, 4 amostras de secreção de escara, 7 amostras de secreção de abscesso, 8 amostras de ponta de cateteres, 8 amostras de hemograma, 7 amostras de cultura de urina, 11 amostras de secreção traqueal, 12 amostras de secreção de sítio cirúrgico e 9 amostras de secreção gástrica.

Entre as amostras de portadores assintomáticos, 33 delas foram isoladas de mães e 49 de recém-nascidos. As amostras de *S. aureus* maternas foram isoladas do mamilo no período pré-parto. Para os recém-nascidos, o isolamento se deu dos vestíbulos nasais imediatamente após o nascimento, 48 horas após ou quando negativo, com 15 dias de nascido.

Para a realização deste estudo, foram respeitados os princípios éticos da pesquisa com seres humanos. A totalidade das amostras utilizadas foi submetida à avaliação do Comitê de Ética da Universidade Estadual de Maringá. As amostras pertencentes ao grupo de infecções relacionadas aos cuidados de saúde obtiveram o parecer N° 002/05 e as amostras dos portadores assintomáticos o parecer N° 381/2006.

4.3 Procedimentos laboratoriais

Reativação das amostras estocadas, semeadura/isolamento e confirmação da identificação de *S. aureus* por meio de teste de Coloração de Gram, teste para pesquisa da coagulase, susceptibilidade aos antimicrobianos, teste de discodifusão, extração de DNA, Reação em Cadeia de Polimerase e eletroforese.

4.3.1 Reativação das amostras e Coloração de Gram

As amostras estocadas no banco de bactérias foram reativadas em caldo nutriente enriquecido com cloreto de sódio 6,5%, por 24 horas a 37°C, de acordo com as normas estabelecidas por Dias Filho (2001). Após a reativação as amostras em caldo, foram semeadas em placa de Agar manitol salgado com e sem oxacilina, em uma concentração de 4µg/ml, e incubados por 48 horas a 37°C. Pelo menos duas colônias suspeitas de pertencerem a *S. aureus* foram então repicadas em TSB (caldo de soja tripticaseína) e incubadas por 24 horas a 37°C. Após esse período, foram novamente plaqueadas em agar Mueller Hinton (*Becton Dickinson and Company, BD Diagnostic Systems, USA*), por mais 48 horas para verificação da pureza por meio da técnica de Coloração de Gram e leitura em microscopia de imersão (BRASIL, 2004a). As estirpes identificadas como cocos Gram-positivos foram submetidas ao teste para pesquisa da coagulase, conforme metodologia proposta por Koneman *et al.* (2001).

4.3.2 Teste da coagulase em tubo

Após Coloração de Gram e leitura em microscopia, as estirpes identificadas como cocos Gram-positivos foram adicionadas a um tubo contendo plasma de coelho liofilizado (Coagulo-Plasma LB, Laborclin Produtos para Laboratório Ltda, Pinhais Paraná, Brasil), incubado em estante em temperatura $35 \pm 1^\circ\text{C}$, e lidas após 30 minutos, 4 horas e 24 horas respectivamente. Durante a incubação, observou-se a formação de coágulo, a qual é indicativa de prova positiva para *Staphylococcus aureus*, na qual a coagulase extracelular reage com

uma substância presente no plasma denominada fator de reação da coagulase, constituindo um complexo que reage com o fibrinogênio, formando fibrina (KONEMAM *et al.*, 2001; BRASIL, 2004a; MURRAY *et al.*, 2004c).

Em todas as fases da semeadura, identificação e formação de coágulo foram utilizadas amostras de controle de *S. aureus* da American Type Culture Collection (ATCC), sendo uma sensível (ATCC 25923) e uma resistente à oxacilina (ATCC 43300).

4.3.3 Testes de susceptibilidade antimicrobiana

4.3.3.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Para determinar a CIM foi realizado o método de Agar diluição para oxacilina e vancomicina. As placas de Agar Mueller-Hinton foram preparadas de acordo com o número de diluições necessárias, sendo utilizada para a oxacilina uma concentração que variou entre 0,06 µg/ml a 64 µg/ml e para a vancomicina a concentração de 0,06 µg/ml a 16 µg/ml.

As concentrações das soluções-estoque foram calculadas a partir da maior concentração testada para o antimicrobiano, do volume de ágar Mueller-Hinton utilizado nas placas de Petri e do volume final da solução-estoque. A quantidade em miligramas do antimicrobiano necessária para preparar as soluções foi calculada usando-se a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{Peso (mg)}}{\text{Potência do antibiótico}(\mu\text{g/mL})} = \frac{\text{Vol. do Solvente (mL)} \times \text{Conc. da Solução Estoque (mg/mL)}}{1}$$

Após o preparo, as soluções-estoque foram esterilizadas por filtração em membrana Millipore® de 0,22 µm de diâmetro e estocada. A diluição do antimicrobiano foi realizada utilizando-se água estéril. A solução-estoque foi a primeira diluição a ser utilizada, e a partir dela foram feitas diluições 1:2 até atingir a menor concentração. As concentrações testadas abrangeram os cortes descritos nas tabelas do documento M7-A08 do CLSI (*CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE*, 2009b), de 8 µg/ml a 0,06 µg/ml. A solução inicial

com concentração igual a 8 µg/ml foi obtida a partir de uma solução-estoque com concentração igual a 1600 µg/ml, utilizando-se o diluente adequado.

Para o preparo dos meios, foi utilizado ágar Mueller-Hinton diluído e em quantidade suficiente para todas as diluições dos antimicrobianos, segundo especificações do fabricante. Posteriormente esse material foi distribuído em tubos nas quantidades de 19 ml, sendo esterilizados em autoclave a 121°C durante 15 minutos e depois resfriados em banho-maria até atingirem a temperatura de aproximadamente 50°C. Em cada tubo foi adicionado 1 ml do antimicrobiano, totalizando um volume de 20 ml, necessário para atingir a espessura de 4-5 ml de meio na placa. O tubo foi homogeneizado e o ágar distribuído em placas de Petri.

Para o preparo do inóculo, foi usada uma suspensão de concentração referente ao tubo 0,5 de MacFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Foram distribuídos 200 µl de cada suspensão bacteriana em placas de Elisa de 96 poços. Com o auxílio de um aplicador de 28 pinos, as amostras foram inoculadas inicialmente em placa-controle sem antimicrobiano, para se observar a viabilidade das amostras, e na sequência inoculadas nas demais placas, com concentração crescente do antimicrobiano. No final da série de diluição, os isolados foram inoculados em uma placa-controle sem antimicrobiano, para se avaliar a contaminação e o carreamento significativo da droga durante o procedimento. Após 30 minutos de secagem, as placas foram incubadas a 35°C por 24 horas. Utilizou-se como controle de qualidade para esses testes a cepa de *S. aureus* ATCC 29213 e ATCC 43300. A leitura foi realizada e os limites foram comparados com aqueles aceitáveis propostos pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (2009b).

4.3.3.2 Teste de disco difusão

Para realizar o teste de disco difusão, foram utilizadas as normas recomendadas pelo CLSI (2009b). Inicialmente preparou-se uma suspensão bacteriana com turvação equivalente à escala 0,5 de MacFarland, a qual foi inoculada na superfície do meio de ágar Mueller-Hinton. Os antimicrobianos utilizados foram: oxacilina 1 µg, cefoxitina 30 µg, vancomicina 30 µg, gentamicina 10 µg, telitromicina 15 µg, tetraciclina 30 µg, linezolid 30 µg, penicilina G 10 µg, eritromicina 15 µg, clindamicina 2 µg, Trimetropim /sulfametoxazol 75 µg, doxicilina 30 µg, rifampicina 5 µg, teicoplanina 30 µg, ofloxacina 5 µg.

Os discos referentes a cada antimicrobiano foram depositados sobre esse meio com uma pinça estéril. As placas foram incubadas a 35°C durante 24 horas. O controle de

qualidade dos discos de antimicrobianos e do meio de cultura foi realizado para cada lote através da cepa *S. aureus* ATCC 25923, e os diâmetros dos halos obtidos foram comparados aos descritos na Tabela 2C, M2-A9, do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (2009b).

4.4 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

4.4.1 Extração de DNA

A obtenção do DNA se deu por meio de técnica realizada empregando-se CTAB (Brometo de cetiltrimetilamônio), conforme metodologia proposta por Doyle e Doyle (1987). Onde o protocolo tem como fases:

- Após amostra semeada e crescida em agar MuellerHinton (35°C por 24-48 horas), realizou-se a raspagem de uma quantidade de massa bacteriana da placa. Essa massa de células foi então lavada com 200 µl de tampão TRIS-EDTA (TE), centrifugada a 8000 rpm. Depois de centrifugada, desprezou-se o sobrenadante
- O *pellet* formado no fundo do *eppendorf* foi então suspenso em 600 µl de CTAB e 40 µl de Clorofórmio/álcool isoamílico (CIA) e incubado em banho-maria a 65°C por 30 minutos. Após esse tempo, adicionou-se 800 µl de CIA e agitou-se gentilmente por inversão, por cinco vezes, levando para centrifugar a 12000 rpm por cinco minutos.
- Recuperou-se então o sobrenadante, transferindo-o para outro *eppendorf* ; adicionou-se parte igual de isopropanol gelado, deixando em “overnight” a -20°C
- Após o período de “overnight” centrifugou-se a 14000 rpm por 20 minutos, em centrífuga refrigerada em -4°C. Acabada a centrifugação, eliminou-se o sobrenadante.
- Acrescentou-se 500 µl de etanol a 70% gelado e retornou-se para a centrífuga por mais 20 minutos.
- Terminada a centrifugação, eliminou-se o sobrenadante, colocaram-se os *eppendorfs* para secagem e quando secos, acrescentou-se 200 µl de TE e armazenou-se o DNA extraído em freezer.

A presença do DNA genômico foi detectada em gel de agarose a 1,5%, adicionado Brometo de Etídeo e corrida eletroforética realizada por 40 minutos a 100 volts.

4.4.2 Tipagem genética

O perfil genotípico das amostras de *S. aureus* de casos clínicos e de portadores assintomáticos foi realizado empregando-se o oligonucleotídeo RW3A de acordo com a metodologia descrita por Van Belkun *et al.* (1995) e reproduzida por Reinoso *et al.* (2007), com algumas modificações.

A reação de amplificação foi calculada para 25 µl, sendo que 9,35 µl de água estéril, 2,5 µl de tampão 10X buffer, 1,5 µl de *primer* a 50 mM, 0,4 µl de Taq polimerase (5U), 2,25 µl de DMSO a 2,5%, 3,0 µl de Dntp (10 mM), 3,0 µl de MgCl (50 mM) e 3,0 µl de DNA diluído e conservado em TE. O oligonucleotídeo utilizado tem a sequência 5'-TCGCTAAAACAACGACACC-3'. A amplificação se deu em termociclador programado com 1 ciclo de desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos de 1 minuto a 93°C, 1 minuto e 30 segundos a 37°C e 1 minuto a 72°C e finalizando com extensão de 8 minutos a 72°C.

O produto de amplificação foi analisado após corrida em gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídeo e utilizado Ladder 100 pb para separação e quantificação das bandas. A análise dos padrões dos padrões de bandas na genotipagem foi realizada visualmente e o programa NT SYS foi empregado para se avaliar o grau de proximidade das amostras através da confecção do dendograma.

Para organização e posterior análise dos dados esses foram primeiramente colocados em tabela simples do programa Excel. Essa tabela foi então transferida para o programa NT SYS onde se configurou o dendograma.

A análise dos dendogramas se deu visualmente em três etapas distintas. A primeira etapa da análise foi realizada pela por esta pesquisadora, a segunda etapa realizada por outra pesquisadora e na terceira etapa foram cruzadas as informações das duas primeiras etapas para verificar a homogeneidade dos dados obtidos por pesquisadores diferentes no que diz respeito à similaridade das amostras estudadas.

4.4.3 Detecção do gene *mecA*

Para a detecção do gene *mecA* utilizou-se a metodologia proposta por Siripommongcolchain *et al.* (2002), com algumas alterações, sendo descrita a seguir:

- *Primer* utilizado: MRS1- TAGAAATGACTGAACGTC

MRS2- TTGCGATCAATGTTACCGT

Para solução de amplificação foram utilizados os seguintes reagentes em suas respectivas quantidades: 12,1 µL de água Milli Q estéril, 2,5 µL de tampão (10 mM Tris HCl [pH8.8]), 1,5 µL de cloreto de magnésio (1,5 mM), 1,5 µL de dNTP (250 µM), 2 µL de cada *primer*, 3,0 µL de DNA (amostra) e 0,4 µL de Taq polimerase (5 U/µl), para um volume final de 25 µL.

As amplificações se deram em termociclador com a seguinte ciclagem: 95°C por 10 min., 30 ciclos de: 95°C por 30 seg., 52°C por 30 seg., 72°C por 1 min., e por fim, 72°C por 10 min.

A visualização do produto de amplificação se deu após corrida em gel de agarose a 1,5% marcado com brometo de etídeo. A corrida foi de 60 minutos a 100 watts e posterior visualização e fotografia em luz ultravioleta. O amplicom de cada amostra foi de 154 pares de base (pb). Como controle positivo foi utilizada a cepa *S. aureus* ATCC 33591 por expressar o gene.

4.4.4 Detecção do gene para a produção da Leucocidina de Pantón Valentine (*PVL*)

Para detecção do gene *PVL*, foi utilizada metodologia proposta por Lina *et al.* (1999) e reproduzida por Stevens *et al.* (2007), na qual os *primers* foram:

-*luk-PV-1*, 5'-ATCATTAGGTAAAATGTCTGGACATGATCCA-3'

- *luk-PV-2*, 5'-GCATCAASTGTATTGGATAGCAAAAAGC-3'.

Para a amplificação com volume final de 25 µl foram utilizados os seguintes reagentes em suas respectivas quantidades: 12,1 µL de água Milli Q estéril, 2,5 µL de tampão (10 mM

Tris HCl [pH8.8]), 1,5 µL de cloreto de magnésio (1,5 mM), 1,5 µL de dNTP (250 µM), 2 µL de cada *primer*, 3,0 µL de DNA (amostra) e 0,4 µL de Taq polimerase (5 U/µl).

A amplificação se deu em termociclador com a seguinte ciclagem: 1 ciclo de 5 minutos a 95°C, 30 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 53°C e 2 minutos a 72°C, e 1 ciclo de extensão final de 10 minutos a 72°C.

A visualização do produto amplificado se deu após corrida em gel de agarose a 1,5%, marcado com brometo de etídeo. A corrida foi de 60 minutos a 100 watts e posterior visualização em fotografia de luz ultravioleta. O amplicom que indicava a presença do gene possuía 433 pares de bases (pb). Como controle positivo, foi utilizada a amostra MR108.

4.4.5 Detecção dos genes *icaA* e *icaD*

Para detecção dos genes *icaA* e *icaD* utilizou-se metodologia proposta por Rhode *et al.* (2001), em que *primers* foram:

- *icaA*. f: 5'-ACACTTGCTGGCGCAGTCAA-3'
- *icaA*. r: 5'-TCTGGAACCAACATCCAACA-3'
- *icaD*. f: 5'-ATGGTCAAGCCAGACAGAG-3'
- *icaD*. r: 5'-AGTATTTTCAATGTTTAAAGCAA-3'

A amplificação foi realizada separadamente, empregando-se os *primers* *icaA* e *icaD*. A reação foi realizada em um volume final de 25 µl utilizando-se os seguintes reagentes em suas respectivas quantidades: *icaA*(f/r)- *icaD* (f/r) 12,1 µL de água Milli Q estéril, 2,5 µL de tampão (10 mM Tris HCl [pH8.8]), 1,5 µL de cloreto de magnésio (1,5 mM), 1,5 µL de dNTP (250 µM), 2 µL de cada *primer*, 3,0 µL de DNA (amostra) e 0,4µL de Taq polimerase (5 U/µl). A ciclagem foi realizada conforme segue: 1 ciclo de 5 minutos a 94°C, 50 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55.5°C e 30 segundos a 72°C, e 1 ciclo final de extensão de 1 minuto a 72°C. A visualização do produto de amplificação ocorreu após corrida em gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídeo. A corrida foi de 60 minutos a 100 watts e posterior visualização e fotografia em luz ultravioleta. O amplicom de cada amostra foi de 188 pares de bases (pb) para o *icaA* e de 198pb para o *icaD*. Como controle positivo foi

utilizada a amostra clínica 103 da Universidade Estadual de Londrina por ser conhecida na literatura e expressar os dois genes.

5 RESULTADOS

5.1 Susceptibilidade a oxacilina pelo método de determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Os resultados do teste de susceptibilidade antimicrobiana à oxacilina realizado através do método de determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) das 79 amostras de *S. aureus* isoladas de portadores assintomáticos mostraram que 7 (9%) apresentaram resistência com CIM variando entre 4 µg/ml a 8 µg/ml. Entre as 68 amostras de casos clínicos, 58 (86%) foram resistentes à oxacilina, com CIM variando entre 4µg/ml e 64µg/ml. Entre as 58 amostras resistentes à oxacilina, 49 (84%) apresentaram CIM igual ou superior a 64 µg/ml; 3 apresentaram CIM igual a 32 µg/ml, 2 apresentaram CIM igual a 16 µg/ml, 1 apresentou CIM igual a 8 µg/ml e 3 tiveram CIM igual a 4 µg/ml.

Comparando-se o teste de disco difusão e o de CIM para a oxacilina, observou-se que 1 amostra se comportou como resistente pelo CIM e sensível pelo disco difusão. Para as amostras clínicas, ao serem comparados os dois métodos (CIM e discodifusão), verificou-se que 3 amostras que se comportaram como resistentes pelo CIM foram sensíveis pelo método do disco.

5.2 Susceptibilidade antimicrobiana pelo método de disco difusão

O perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos, avaliado através do método de disco difusão, foi semelhante para a maioria das amostras de *S. aureus*, com exceção para a telitromicina e linezolide. Entre as amostras clínicas, observou-se um percentual de resistência de 100% para telitromicina e 37% para linezolide, enquanto que entre as amostras procedentes de portadores assintomáticos esse percentual de resistência foi zero. As amostras de *S. aureus* apresentaram 100% de resistência à penicilina e cefoxetina e um perfil de susceptibilidade semelhante, entre si, para as demais drogas ensaiadas. Todas as amostras de *S. aureus* foram sensíveis à vancomicina tanto pelo método de CIM como de disco difusão. Os resultados do teste de susceptibilidade, por disco difusão, aos antimicrobianos usualmente recomendados pelo CLSI, das amostras de *S. aureus* são mostrados na Tabela 1.

Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos				
Antibiótico	Amostras de Portadores Assintomáticos		Amostras de casos clínicos de Infecção Hospitalar	
	*/**	%	*/**	%
Penicilina G	7/7	100	68/68	100
Oxacilina	6/7	86	55/68	80
Cefoxetina	7/7	100	68/68	100
Eritromicina	6/7	86	52/68	76,4
Clindamicina	4/7	57	53/68	78
Trimetropim/Sulfametoxazol	5/7	71,4	45/68	66
Vancomicina	0/7	0	0/68	0
Telitromicina	0/7	0	68/68	100
Linezolida	0 /7	0	25/68	37
Tetraciclina	4/7	57	52/68	76,4
Doxicilina	5/7	71,4	47/68	69
Rifampicina	6/7	86	53/68	77,9
Teicoplanina	0/7	0	0/68	0
Ofloxacina	4/7	57	45/68	66
Gentamicina	4/7	57	46/68	67

* Numerador = amostras resistentes

** Denominador = total de amostras

% Resistência em percentual

Tabela 1 – Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das amostras de *Staphylococcus aureus* isolados de portadores assintomáticos e de casos clínicos, avaliadas através do método de disco difusão.

5.3 Detecção do gene *mecA*

A presença do gene *mecA* foi identificada em 6 (86%) das 7 amostras de *S. aureus* resistentes à oxacilina procedentes de portadores. Entre as amostras clínicas, o gene foi identificado em 55 (95%) das 58 amostras avaliadas.

5.4 Detecção do gene para a produção de Leucocidina de Panton Valentine (*PVL*)

A técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) foi aplicada para as 7 amostras de *S. aureus* resistentes à oxacilina (CIM) isoladas de portadores e em apenas 1(14%) se detectou a presença do gene para a produção da toxina. Entre as 68 amostras clínicas, nenhuma carrou o gene.

5.5 Detecção dos genes *icaA* e *icaD*

Empregando-se a técnica de PCR para detecção dos genes *icaA* e *icaD* entre as 7 amostras de *S. aureus* oxacilina resistentes (CIM) isoladas de portadores, observou-se que em apenas 1 (14%) amostra houve a identificação dos 2 genes. Isoladamente os genes *icaA* e *icaD* não foram identificados em nenhuma das amostras. Entre as 68 amostras procedentes de casos clínicos oxacilina resistentes (CIM), em 41 (60%) foi detectada a presença dos 2 genes. Isoladamente os genes *icaA* e *icaD*, respectivamente, foram detectados em 12 (18%) e 7 (10%) das 68 amostras. Apenas 8 (11%) amostras clínicas não expressaram nenhum dos genes.

5.6 Tipagem genética

Os resultados da tipagem genética das amostras de *S. aureus* realizada por PCR, utilizando o *primer* RW3A, foram inseridos no programa Numerical Taxonomy System (Exeter Software), que gerou dendrogramas demonstrativos do perfil genético de cada amostra, possibilitando a comparação. Entre as 79 amostras de portadores assintomáticos, 15 tiveram 100% de similaridade e 23 amostras tinham grau de similaridade superior a 80%. Entre as demais, o grau de similaridade variou entre 40% e 70%.

Para as 68 amostras de casos clínicos, em 19 observou-se 100% de similaridade; 3 tiveram similaridade de aproximadamente 90%; 23 tiveram similaridade de 84%; e 19

amostras apresentaram similaridade em torno de 80%. Os resultados da análise de similaridade entre as amostras de *S. aureus* são ilustrados nas Figuras 1 e 2.

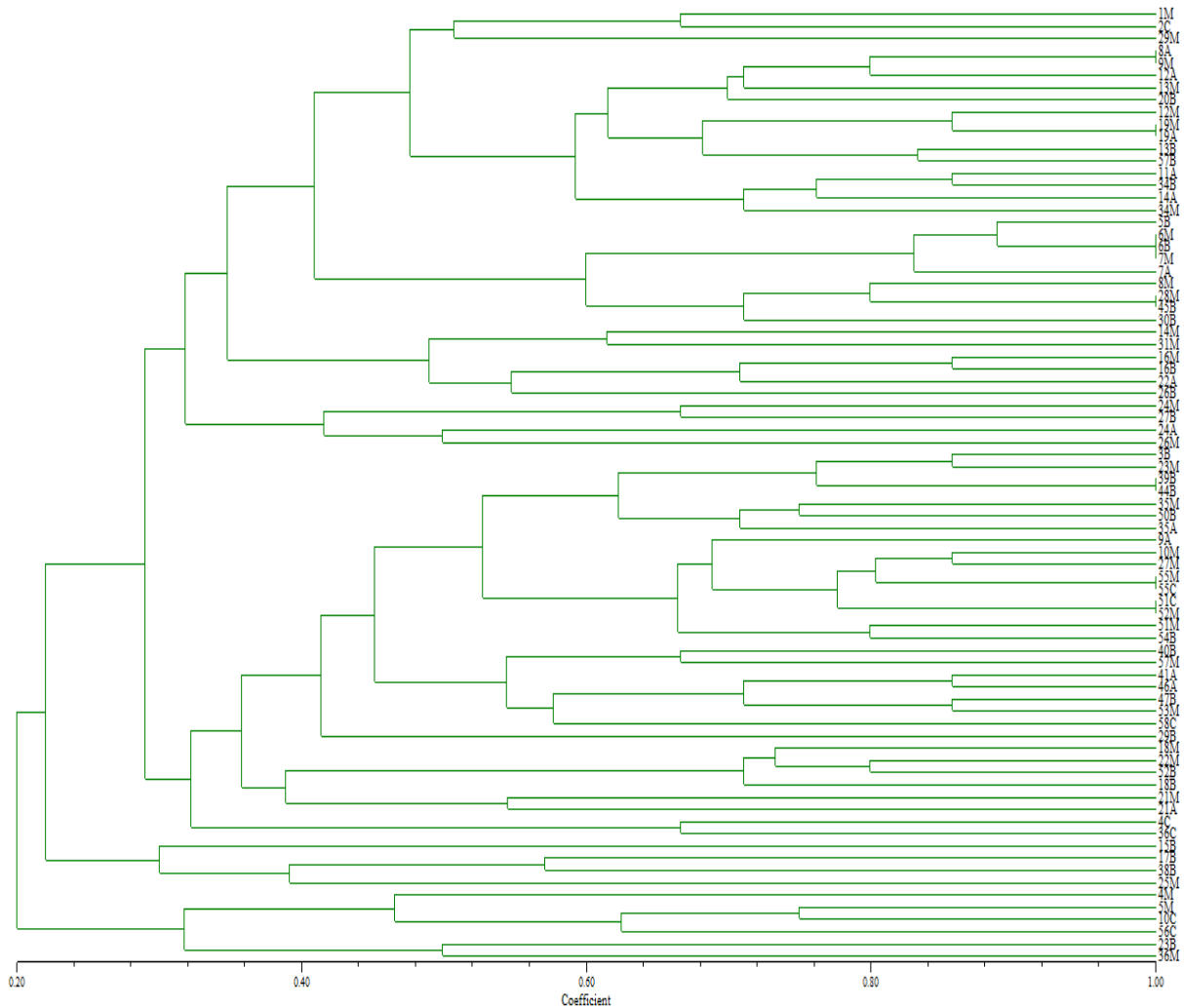


Figura 1 – Resultados da análise de similaridade das amostras de *S. aureus* isoladas de portadores assintomáticos realizado através do programa Numerical Taxonomy System (NTSYS).

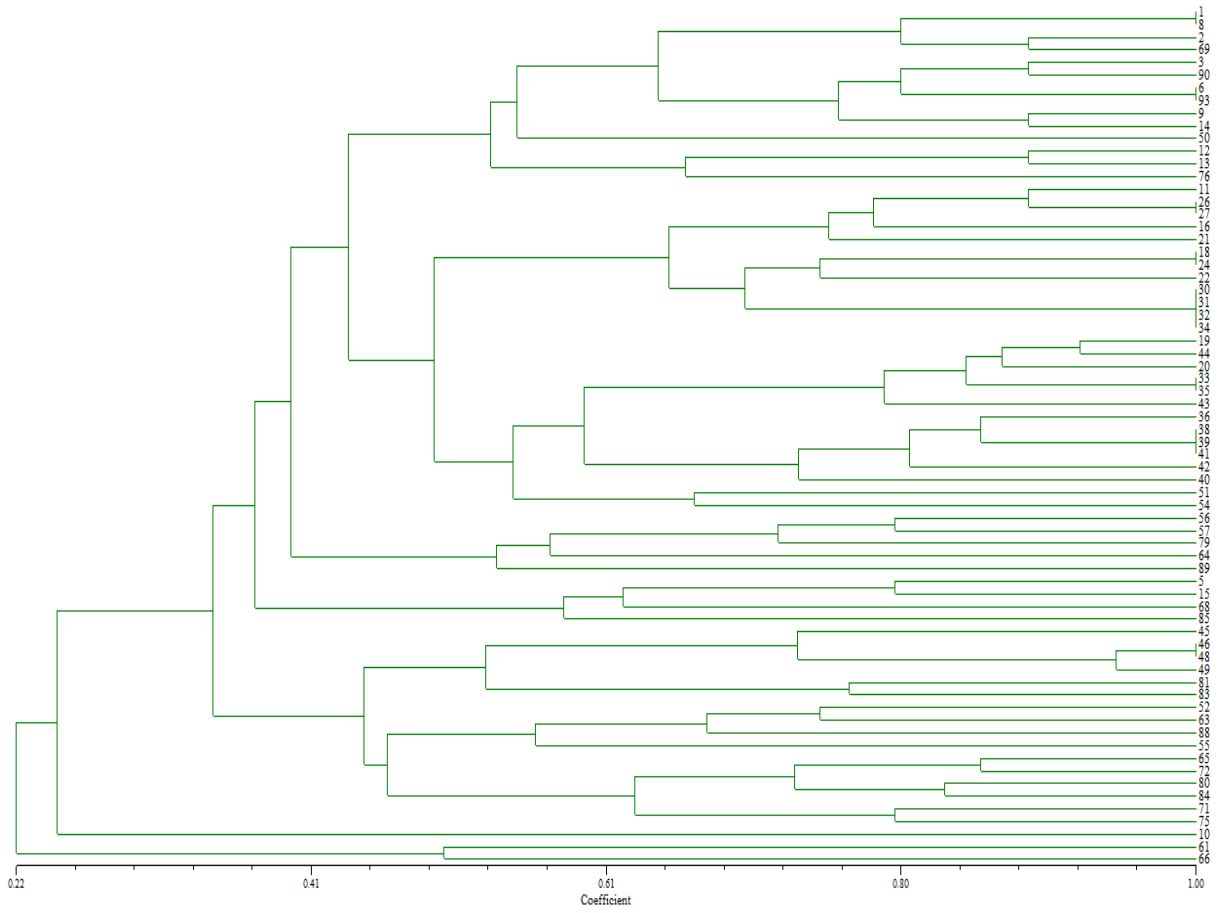


Figura 2 – Resultados da análise de similaridade das amostras clínicas de *S. aureus* realizado através do programa Numerical Taxonomy System (NTSYS).

6 DISCUSSÃO

A frequência de isolamento de *Staphylococcus aureus* multirresistentes aos antimicrobianos usualmente empregados na rotina clínica tem aumentado consideravelmente nas últimas décadas (SANTOS *et al.*, 2007). Questionamentos vêm sendo feitos sobre a real capacidade do arsenal terapêutico disponível atualmente no combate aos micro-organismos multirresistentes, entre eles os *S. aureus*.

O espectro dessa resistência é amplo, atingindo a maioria das drogas pertencentes aos diferentes grupos incluindo as penicilinas, aminoglicosídeos, macrolídeos, tetraciclina, cloranfenicol e fluoquinolonas (MANDELL; BENNETT; DOLIN, 2005; SANTOS *et al.*, 2007). Neste estudo, as amostras de *S. aureus* avaliadas apresentaram perfil de multirresistência independente da fonte de isolamento. Considerando que parte das amostras foram isoladas de portadores assintomáticos, considera-se esse fato bastante preocupante. Fica evidenciada a circulação de *S. aureus* multirresistente entre as diferentes camadas da população, incluindo recém-nascidos com pouco contato com o mundo exterior.

A oxacilina é uma droga pertencente ao grupo dos betalactâmicos que foi introduzida na terapia na década de 1960; entretanto, precocemente ocorreu o aparecimento de resistência (SANTOS *et al.*, 2007). Alguns autores reforçam o risco que os *S. aureus* oxa-resistentes representam para os pacientes internados e ressaltam a importância da identificação e controle dessa estirpe entre indivíduos saudáveis, pois na atualidade um percentual importante dessas cepas tem sido encontrado na comunidade (CHAMBERS, 2001; NEVES *et al.*, 2007). Atualmente, nos testes de sensibilidade antimicrobiana para *S. aureus* o CLSI recomenda a inclusão da oxacilina, porque se trata de um marcador de resistência para outros antimicrobianos. O CLSI também recomenda que para oxacilina e vancomicina, além do teste de disco difusão, seja realizado o teste de determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para confirmação dos resultados (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2009b).

Em relação à oxacilina, estudos realizados entre países da América Latina (México, Argentina e Brasil) mostraram incidência média entre 26,5% e 31,3% de MARSAs como agente etiológico de infecção comunitária (MENDES *et al.*, 2003; FOWLER JUNIOR *et al.*, 2001). Para grupos de amostras isoladas de portadores assintomáticos a literatura tem acusado taxas de 10% para *S. aureus*, de acordo com estudos publicados em 2003 (EGIDO; BARROS, 2003). Outro estudo é o de Wang *et al.* (2004), o qual encontrou uma positividade de 8,3%

para *S. aureus* resistentes a oxacilina, embora a população estudada fosse composta por profissionais da saúde. Já Menegoto e Picolé (2007) registraram uma taxa de 7,5% de CAMARSA.

As amostras deste estudo foram inicialmente avaliadas quanto à susceptibilidade à oxacilina e à vancomicina, por meio do método de Agar difusão para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e posteriormente realizado o antibiograma pelo método de disco difusão, em conformidade com a recomendação do *Clinical and Standards Institute* (2009a).

Entre as 79 amostras de portadores assintomáticos, 7 (9%) apresentaram resistência à oxacilina pelo método de CIM e dessas uma não confirmou pelo método de disco difusão. O percentual de resistência de aproximadamente 9% é compatível com dados da literatura citados anteriormente (WANG *et al.*, 2004; MENEGOTO; PICOLÉ, 2007).

Para o grupo das 68 amostras clínicas submetidos ao teste da CIM observou-se que 58 (86%) foram resistentes à oxacilina e 55 dessas (80%) confirmaram o resultado pelo método de disco difusão. Comparando-se esses dados com aqueles da literatura, verifica-se que houve um aumento na taxa de prevalência nesta pesquisa, pois estudos realizados por Tiemarsma *et al.* em 2004 mostraram uma prevalência de 40% de resistência à oxacilina em isolados de infecções relacionadas ao cuidado em saúde no sul e leste Europeu. Índices de 31% entre isolados de pacientes com infecções de pele e tecidos moles em hospitais da América Latina (GALES *et al.*, 2000), chegando a aproximadamente 65% em UTI's de hospitais norte-americanos (KLEVENS *et al.*, 2006).

Houve diferença entre os métodos utilizados para detecção de resistência à oxacilina, nos quais se observou que 4 amostras foram consideradas resistentes pelo método de CIM e negativas pelo discodifusão. A provável causa da não identificação pelo método de disco pode ser a proximidade do ponto de corte para a resistência, pois as 4 amostras apresentaram CIM de 2 µg/ml, o que é próximo ao ponto de corte de 4 µg/ml preconizado pelo CLSI. Fica então evidenciada a necessidade de se comparar os dois métodos e correlacioná-los de acordo com o que preconiza o *Clinical and Laboratory Standards Intitute* (2009b).

Por meio do método do disco difusão verificou-se que as amostras de ORSA apresentaram elevados percentuais de múltipla resistência aos antimicrobianos testados. Entre as amostras clínicas, a resistência foi de 100% para penicilina, cefoxetina e telitromicina, e para as amostras de portadores assintomáticos a resistência foi de 100% para penicilina e cefoxetina. Essa multirresistência, incluindo a resistência à oxacilina, pode trazer dificuldades no que diz respeito à terapia empregada no tratamento de infecções causadas por esse micro-

organismo, cuja prevalência vem aumentando em todo o mundo (OKUMA *et al.*, 2002; CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2004). Outro fato preocupante é que dados da literatura e também os obtidos neste estudo demonstram que o perfil de susceptibilidade antimicrobiana de amostras ORSA de origem hospitalar tem sido semelhante àqueles de isolados de CA-ORSA adquiridos na comunidade (HEROLD *et al.*, 1998; SKIEST *et al.*, 2007).

As amostras clínicas estudadas foram 100% sensíveis apenas à teicoplanina e vancomicina e tiveram baixo perfil de resistência à linezolida (37%). Já as amostras de portadores assintomáticos foram 100% sensíveis à teicoplanina, vancomicina, linezolida e telitromicina. Esses achados são corroborados por outros estudos, os quais revelam que as opções terapêuticas para o tratamento das infecções causadas por *S. aureus* resistentes à oxacilina diminuem a cada dia, limitando-se ao uso da vancomicina, da teicoplanina e da linezolida, embora já existam relatos de resistência a esses antimicrobianos em alguns casos isolados (SAIID-SALIM; MATHEMA; KREISWIRTH, 2003; SANTOS *et al.*, 2007).

A totalidade de amostras deste estudo foi sensível à vancomicina tanto pelo método de CIM quanto de disco difusão. CUI *et al.* (2006) pontuam que essa droga permaneceu até recentemente como sendo a última escolha em casos de ORSA. O aparecimento, em 1996, de *S. aureus* vancomicina intermediário (VISA) com um MIC de 8 mg/l despertou grande preocupação entre pesquisadores de todo o mundo, os quais preconizaram a vigilância epidemiológica. VISA está se tornando prevalente em vários países, como Japão (CUI *et al.*, 2006), Estados Unidos (SMITH *et al.*, 1999), Brasil (OLIVEIRA *et al.*, 2001), Alemanha (REIPERT *et al.*, 2003) e China (LU *et al.*, 2005). Entretanto, essa disseminação ainda não se configurou em nosso meio, estando restrita a casos isolados (SANTOS *et al.*, 2007).

A resistência aos antimicrobianos em *S. aureus* pode ser codificada cromossomicamente ou mediada por plasmídios. Fazem parte dos mecanismos de resistência à oxacilina a hiperprodução de betalactamases a presença de uma proteína ligadora de penicilina (PBP *protein binding penicilin*) alterada denominada PBP2a e modificações na capacidade de ligação das PBPs. Essa proteína alterada é codificada por um gene cromossômico denominado *mecA*, que é responsável pela resistência intrínseca dos estafilococos à oxacilina e a todos os antibióticos betalactâmicos (CHAMBERS, 1997). O determinante gênico da proteína PBP2A é o gene *mecA*, que é constituído por cerca de 2000 pares de nucleotídeos. Esse gene não é nativo de *S. aureus*, e assim, só as estirpes resistentes o possuem (DE LENCASTRE *et al.*, 1994). Para confirmação dessa resistência genética se

utiliza a técnica de PCR, que possibilita de maneira rápida e eficiente o carregamento do gene (KLUYTMANS; VAN BELKUM; VERBRUGH, 1997).

Todas as amostras identificadas como resistentes à oxacilina pelo método de CIM foram avaliadas quanto à presença do gene *mecA*. Observou-se que 6 (86%) das 7 amostras isoladas de portadores e 55 (95%) das 58 oriundas de casos clínicos carregavam o gene. De acordo com Ito *et al.* (2003), os mecanismos de aquisição de resistência em *S. aureus* são classificados em duas categorias: mutação de gene cromossômico bacteriano e aquisição de gene de resistência de outros micro-organismos por troca genética, havendo ainda a resistência mediada por outros mecanismos, como alteração de permeabilidade de membrana, alteração do sítio de ação do antimicrobiano, bomba de efluxo e mecanismo enzimático. Esses achados justificam que determinada amostra possa apresentar resistência e não carrear o gene *mecA*. Estudos relativos à resistência à oxacilina por meio de métodos fenotípicos como disco difusão ou agardiluição e genotípicos, tais como a presença do gene *MecA*, têm demonstrado resultados contraditórios e por isso é válida a recomendação da importância de se confirmar essa resistência por meio de técnicas laboratoriais especializadas (KOTILAINEN *et al.*, 1995).

Os *S. aureus* produzem diversos fatores de virulência. Muitos desses fatores estão ligados a sua parede celular e são geralmente mencionados como produtos ou fatores de superfície ou somáticos. Tais fatores são importantes, principalmente na interação do micro-organismo com o hospedeiro durante o processo inicial de colonização (adesão e invasão), nos mecanismos de evasão (fuga) às defesas do hospedeiro e na modulação da resposta imune. Além disso, esses micro-organismos podem secretar uma ampla variedade de proteínas conhecidas como exoproteínas. Estas, por sua vez, podem funcionar, por exemplo, como agressinas (causando danos aos tecidos e órgãos do hospedeiro), evasinas (evadindo à ação das células de defesa do hospedeiro) ou modulinas, modulando a resposta imune (SALYERS; WHITT, 2002).

Um dos fatores de virulência de grande importância médica produzido por alguns *S. aureus* é a Leucocidina de Pantón Valentine (*PVL*), a qual é uma potente citotoxina com capacidade de lisar tanto as células brancas do sangue como de mediar a necrose tecidual em diferentes tecidos e órgãos, incluindo aqui os órgãos vitais, como os pulmões. (LINA *et al.*, 1999). Alguns estudos também relataram que infecções causadas por CA-MRSA são, geralmente, associadas com a formação de abscessos subcutâneos, e, mais raramente, com pneumonia necrosante (VANDENESCH *et al.*, 2003; ZETOLA *et al.*, 2006).

Para identificação desse fator de virulência a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) foi aplicada para as 7 amostras de *S. aureus* resistentes à oxacilina (CIM) isoladas de portadores e em apenas 1 (14%) se detectou a presença do gene para a produção da toxina. Entre as 68 amostras clínicas, nenhuma carregou o gene. Mas esse dado de apenas 14% passa a ter extrema significância quando se observa que, para que exista a transmissão é necessário apenas um gene, e este, se carregado, pode contaminar toda uma população.

Uma hipótese levantada por alguns pesquisadores para justificar a presença do gene *PVL* em amostras de origem comunitária é o fato das cepas CA-MRSA possuírem a ilha *SCCmec* tipo IV, a qual, por ter um tamanho menor que as ilhas encontradas nas cepas hospitalares (*SCCmec* tipo I-III), teria maior mobilidade e, assim, maior facilidade de transferência entre diversas cepas de *S. aureus* de background genéticos diferentes, através de plasmídeos e bacteriófagos (DAUM *et al.*, 2002, GELATTI *et al.*, 2009). As amostras deste estudo não foram avaliadas quanto ao tipo de gene carregado.

Vários estudos mostram que *Staphylococcus sp* produzem biofilme em extensas multicamadas celulares envoltos em uma substância amorfa denominada *slime*. O biofilme também tem sido considerado um dos principais fatores de virulência dessas bactérias (ZIEBÜHR *et al.*, 1997; ARCIOLA *et al.*, 2006).

A adesina polissacarídea intercelular (PIA) medeia a adesão bacteriana e permite o crescimento do biofilme. Esta é sintetizada *in vitro* pela enzima *N-acetilglicosaminil* transferase, a qual é codificada pelo gene *Ica* (*Intercellular adhesion*) e é composto pelos genes *icaA*, *icaD*, *icaB*, *icaC* e *icaR*. (GERKE *et al.*, 1998; GÖTZ, 2002). Recentemente, o desenvolvimento de métodos moleculares tem permitido elucidar a base genética da produção de *slime* pelo operon *Ica*. Técnicas baseadas na PCR permitem a detecção dos genes (ARCIOLA; BALDASSARI; MONTANARO, 2001b; CHAIEB; MAHDOUANI; BAKHROUF, 2005).

Desta maneira, utilizando a técnica de PCR, as amostras que se portaram como resistentes à oxacilina pelo CIM foram submetidas à detecção dos genes *icaA* e *icaD*, sendo observado que das 7 amostras de portadores assintomáticos, 1 (14%) carregou ambos os genes. Das 68 amostras de casos clínicos de infecção hospitalar, 41(60%) carregavam os genes concomitantemente, 12 (18%) apenas o gene *icaA* e 7 (10%) apenas o gene *icaD*. Ainda 8 amostras clínicas (11%) não apresentaram o gene.

Götz (2002) afirma que a enzima *N-acetilglicosamil transferase* só tem sua atividade aumentada quando ocorre a co-expressão *icaAD*, e somente quando eles aparecem concomitantemente a cadeia de PIA é sintetizada, podendo haver a produção do biofilme.

Outro fator importante que cabe ser ressaltado, também evidenciado neste estudo, é que o biofilme é de característica nosocomial (MARIA-LITRAN *et al.*, 2002).

Tenover *et al.* (1995) postulam ser importante definir, do ponto de vista epidemiológico, a origem dos organismos envolvidos na etiologia de uma doença. A adequada identificação do patógeno é um requisito indispensável para detecção do reservatório e fonte de infecção, e também para monitorar sua dispersão dentro e entre a população estudada. O conhecimento do perfil epidemiológico-molecular das doenças causadas por *S. aureus* poderá auxiliar na elaboração de estratégias de controle mais eficientes para a redução da infecção, uma vez que, a partir dos perfis moleculares, podem-se inferir relações genéticas entre os diferentes clones, detectar o fluxo gênico e traçar rotas de dispersão da infecção (LANGE *et al.*, 1999; SOMMERÄUSER *et al.*, 2003).

Neste estudo, a técnica de PCR com o oligonucleotídeo RW3A possibilitou a identificação de 2 perfis genéticos distintos entre os 2 grupos de amostras estudadas. Para as amostras de portadores assintomáticos encontrou-se uma população mista, ou seja, 38 amostras (48%) apresentaram similaridade superior a 80% e 41 amostras (52%) variaram seu perfil entre 40% a 70% de similaridade. Já para o grupo de amostras clínicas foi identificada uma população mais homogênea, sendo que 54 amostras (80%) apresentaram similaridade superior a 80%, o que remete à existência de clones dentro do ambiente hospitalar. 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 se presume serem derivadas de um ancestral comum (TENOVER *et al.*, 1995; SOMMERÄUSER *et al.*, 2003).

7 CONCLUSÃO

- Os dois grupos de amostras de *Staphylococcus aureus* mostraram diferenças no perfil fenotípico e genotípico.
- A taxa de resistência à oxacilina foi de 9% pelo método de Agar diluição (CIM) e de 7,5% pelo método de discodifusão para o grupo de portadores assintomáticos.
- Para o grupo de amostras clínicas, a resistência foi de 85% pelo método de CIM e de 81% pelo método de discodifusão.
- Houve discordância na identificação de resistência à oxacilina pelos dois métodos utilizados.
- A totalidade de amostras de *S. aureus* deste estudo apresentou 100% de resistência à penicilina e cefoxetina e um perfil de susceptibilidade semelhante, entre si, para as demais drogas ensaiadas.
- Todas as amostras avaliadas se mostraram sensíveis à vancomicina pelos dois métodos adotados.
- A maioria das amostras oxacilino-resistentes carregavam o gene *mecA* (93,8%).
- O gene *PVL* foi encontrado em 1 amostra de portador assintomático.
- Os genes *icaA* e *icaD* foram isolados concomitantemente em 41 amostras (60%) de casos clínicos.
- A tipagem genética demonstrou um perfil mais homogêneo nas amostras clínicas, sendo que 54 delas (80%) apresentaram similaridade superior a 80%. Já para as amostras de portadores assintomáticos obteve-se perfil misto com variações de similaridade.

REFERÊNCIAS

- AKINEDEN, Ö. et al. Toxin genes and other characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, Washington, DC, v. 8, no. 5, p. 959-964, 2001.
- ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da célula**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.
- ALMEIDA, E. A. Bactérias multirresistentes. In: COUTO, Renato C.; PEDROSO, Tânia M.G. **Guia prático de controle de infecção hospitalar: epidemiologia, controle e terapêutica**. 2. ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2004. cap. 14, p. 233-247.
- ARCIOLA, C. R.; BALDASSARI, L.; MONTANARI, L. In cateter infections by *Staphylococcus epidermidis* the intercellular adhesion (ica) locus is a molecular marker of the virulent slime-producing strains. **J. Biomed. Mater. Res.**, Hoboken, v. 59, no. 3, p. 557-562, 2002.
- ARCIOLA, C. R.; BALDASSARI, L.; MONTANARO, L. Presence of *icaA* and *icaD* genes and *slime* production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, D. C., v. 39, no. 6, p. 2151-2156, June 2001b.
- ARCIOLA, C. R.; CAMPOCCIA, D.; BALDASSARI, L.; DONATI, M. E.; PIRINI, V.; GAMBERINI, S.; MONTANARO, L. Detection of biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* from implant infections. Comparason of a PCR-method that recognizes the presence of *ica* genes with two classic phenotypic methods. **J. Biomed. Mater. Res.**, Hoboken, v. 76A, no. 2, p. 425-430, Feb. 2006.
- ARSLAN, S.; ÖZKARDES, F. Slime production and antibiotic susceptibility in staphylococci isolated from clinical samples. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, p. 29-33, 2007.
- ASSOCIAÇÃO PAULISTA DE ESTUDOS E CONTROLE DE INFECÇÃO HOSPITALAR. **Infecções hospitalares no Brasil: uma medida de sua magnitude nos anos 1990 e comparação com os índices europeus**. 2005. Disponível em: <http://www.apceih.org.br/infecoes_hospitalares.htm>. Acesso em: 25 jan. 2008.
- AUBRY-DAMON, H.; COURVALIN, P. Bacterial resistance to antimicrobial agents: selected problems in France, 1996 to 1998. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 5, no. 3, p. 315-320, 1999.
- AVILA-FIGUEROA, C. et al. Prevalencia de infecciones nosocomiales en niños: encuesta de 21 hospitales en Mexico. **Salud Publica de México**, México, DF, v. 41, p. S18-S25, 1999. Supplement 1.
- BAIRD-PARKER, A. C. The *Staphylococci*: an introduction. **J. Appl. Bacteriol.**, Oxford, v. 19, p. 1S-8S, 1990. Supplement.

BANIA, J. et al. The profiles of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* from nasal carriers. **Lett. Appl. Microbiol.**, Oxford, v. 42, p. 315-320, 2006.

BASELGA, R. et al. Phase variation of slime production in *Staphylococcus aureus* implications in colonization and virulence. **Infect Immun.**, Washington, DC, v. 61, no. 11, p. 4857-4862, Nov. 1993.

BARTLETT, J. G., Diagnostic test for etiologic agents of community-acquired pneumonia **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 18, no. 4, p. 809-827, 2004.

BECKER, K. et al. Prevalence of Genes Encoding Pyrogenic Toxin Superantigens and Exfoliative Toxins among Strains of *Staphylococcus aureus* Isolated from Blood and Nasal Specimens. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, D. C., v. 41, p. 1434-1439, 2003.

BECKER, K. et al. Understanding the physiology and adaptation of staphylococci: apost-genomic approach. **Int. J. Med. Microbiol.**, Jena, v. 297, no. (7/8), p. 483-501, Nov. 2007.

BERNARDO, W. L. C. et al. *Staphylococcus aureus* ampicillin-resistant from the odontological clinic environment. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 47, p. 19-24, 2005.

BOARINI, M. L. Higiensismo, eugenia e a naturalização do social. In: _____. **Higiene e raça como projetos: higienismo e eugenismo no Brasil**. Maringá: Ed. da UEM, 2003. cap. 1, p. 19-44.

BOYLE-VAVRA, S.; DAUM, R. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; The Role of Pantone-Valentine Leukocidin. **Laboratory Investigation**, Baltimore, v. 87, no.1, p. 39, Jan. 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Regulamenta as ações de controle de infecções hospitalares no Brasil**: Portaria n. 2.616 de 12 de maio de 1998, Brasília, DF, maio 1998.

_____. **Deteção e identificação de bactérias de importância médica**. Brasília, DF, 2004a.

_____. **Manual de microbiologia clínica para o controle de infecção em serviços de saúde**. Brasília, DF, 2004b. Edição Comemorativa para o IX Congresso Brasileiro de Controle de Infecção e Epidemiologia Hospitalar. Salvador, 30 de agosto a 3 de setembro de 2004. Versão preliminar.

BROWN, T. A. **Genética, um enfoque molecular**: estudo de genes clonados. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

CAFISO, V.; BERTUCCIO, T.; SANTAGATI, M. et al. Presence of the *ica* operon in clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* and its role in biofilm production. **Clin. Microbiol Infect.**, Oxford, v. 10, p. 1081-1088, 2004.

CASEY, A. L.; LAMBERT, P. A.; ELLIOTT, T. S. J. Staphylococci. **Int. J. Antimicrob. Agents**, Amsterdam, v. 29, p. 23-32, 2007.

CARVALHO, A. L. I. de et al. Catalase-negativa, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as cause of septicemia. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, São Paulo, 2003, v. 39, n. 1, p. 45-48. Disponível em: <[http:// www.Scielo.br/scielo.php?script=sci](http://www.Scielo.br/scielo.php?script=sci)>. Acesso em: 30 dez. 2007.

CAVALCANTI, S. M. M. et al. Estudo comparativo de *Staphylococcus aureus* importado para as unidades de terapia intensiva de hospital universitário, Pernambuco, Brasil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 9, p. 436-446, 2006.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. BRIEF REPORT. Vancomycin-resistant *S. aureus*. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep.**, New York, v. 53, p. 322-3, 2004.

CHAIIEB, K.; MAHDOUANI, K.; BAKHROUF, A. Detection of *icaA* and *icaD* Loci by polymerase chain reaction an biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* isolated from dialysate and needles in a dialysis unit. **J. Hosp. Infect.**, New York, v. 61, no. 3, p. 225-230, Nov. 2005.

CHAMBERS, H. F. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, D. C., v. 10, p. 781- 791, 1997.

CHAMBERS, H. F. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? **Emerging Infect. Dis.**, Atlanta, v. 7, no. 2, p. 178-182, 2001.

CHRISTENSEN, G.D. et al. Colonial morphology of staphylococci on memphis agar. Phase variation of slime production, resistance to beta-lactam antibiotics and virulence. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v. 161, p. 1153-1169, 1990.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance Standards for antimicrobial disk susceptibility testes**: approved stardard. 10. ed. Waine, PA: Clinical and Laboratory Standards Intitute, 2009a.

_____. **Performance Standards for antimicrobial disk susceptibility testing**: nineteenth informational supplement. CLSI document M100-S19. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2009b.

_____. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**: approved standard. Eighth edition. CLSI document M07-A8. Wayne, PA: Clinical and laboratory Standards Intitute, 2009c.

COBB, B. D.; CLARCKSON, J. M. A simple procedure for optimising the polymerase chain reaction (PCR) using modified Taguchi methods. **Nucleic Acids Res.**, Oxford, v. 22, p. 3801-3805, 1994.

CORTÉS, R. L. et al. Limpeza, desinfección y esterilización del material quirúrgico. **Enfermagem Integral**, v. 27, n. 53, p. 28-32, 2000.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infection. **Science**, Washington, D.C., v. 284, no. 5418, p. 1318-1322, 1999.

- COSTERTON J. W.; MONTANARO L.; ARCIOLA C. R. Biofilm in implant infections: its production and regulation. **Int. J. Artif. Organs.**, Milano, v. 28, p. 1062-1068, 2005.
- CUCARELLA, C. et al. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. **Journal Bacteriol.**, Washington, D. C., v. 183, p. 2888–2896, 2001.
- CUI, L. et al. Novel mechanism of antibiotic resistance originating in vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, D.C., v. 50, no. 2, p. 428-438, 2006.
- DAUM, R. S.; ITO, T.; HIRAMATSU, K. et al. A novel methicillin-resistance cassette in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates of diverse genetic backgrounds. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v. 186, p. 1344-1347, 2002.
- DEGO, O. K.; VAN DIJK, J. E.; NEDERBRAGT, H. Factors involved in the early pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion – a review. **Veterinary Quarterly**, The Hague, v. 24, p. 181-198, 2002.
- DE LENCASTRE, H.; COUTO, I.; SANTOS, I. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease in a Portuguese hospital: characterization of clinical types by a combination of DNA typing methods. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, Berlin, v. 13, p. 64-73, 1994.
- DEURENBERG, R. H.; STOBBERINGH, E. E. The evolution of *Staphylococcus aureus*. Infection, Genetics and Evolution. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, D. C., v. 8, no. 6, p.747-763, 2008.
- DEL VECCHIO, V. G.; PETROZIELLO J. M.; GRESS, M. J. et al. Molecular genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* via fluorophore-enhanced repetitive-sequence PCR. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, D. C., 33, p. 2141-2144. 1995.
- DIAS FILHO, B. P. et al. **Manual de aulas práticas – Enfermagem**. Maringá: UEM: Departamento de Análises Clínicas, 2001.
- DIEDEREN, B. M. W.; KLUYTMANS, J. A. J. W. The emergence of Infections with community- associate methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **J. Infectol.**, v. 52, no. 3, p. 157-168, 2005.
- DOBINSKI, S.; KIEL, K.; ROHDE, H. et al. Glucose-related dissociation between icaADBC transcription and biofilm expression by *Staphylococcus epidermidis*: evidence for an additional factor required for polysaccharide intercellular adhesion synthesis. **J. Bacteriol.**, Baltimore, v. 185, no. 9, p. 2879- 2886, May 2003.
- DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms; survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, D. C., v. 15, no. 2, p. 167-193, Apr. 2002.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochem Bull.**, v. 19, p. 11-15, 1987.

EL-FAR, F.; RICHTMANN, R. Prevenir ainda é a melhor opção: a luta contra os Gram-positivos multirresistentes. **Prática Hospitalar**, São Paulo, ano 3, n. 13, p. 7-9, jan./fev. 2001.

EGGIMNN, P.; SAX, H.; PITTET, D. Catheter-related infections. **Microbes Infect.**, Paris, v. 6, p.1033-1042, 2004.

EGIDO, M.; BARROS, M. L. Preliminary study of community-acquired *Staphylococcus aureus* infection in Manaus Hospital, Amazonas Region, Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 36, p. 707-709, 2003.

ELLIOT, M. J. et al. Nasal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among paramedics in the Sedgwick Medical Service in Wichita, Kansas. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, Thorofare, v. 23, p. 60-63, 2002.

FARIA, N. A.; OLIVEIRA, D. C. et al. Epidemiology of emerging methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Denmark: a nationwide study in a country with low prevalence of MRSA infection. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, D. C., v. 43, p. 1836-1842, 2005.

FARAH, S. B. **DNA segredos e mistérios**. São Paulo: Sarvier, 1997.

FERNANDES, A. T. et al. Bactérias anaeróbicas. In: FERNANDES, A. T.; FERNANDES, M. O. V.; RIBEIRO FILHO, N. **Infecção hospitalar e suas interfaces na área da saúde**. São Paulo: Atheneu, 2000. cap. 14, p. 336-405.

FERNANDES, A. T. As bases do hospital contemporâneo: a enfermagem, os caçadores de micróbios e o controle de infecção. In: FERNANDES, A. T.; FERNANDES, M. O. V.; RIBEIRO FILHO, N. **Infecção hospitalar e suas interfaces na área da saúde**. São Paulo: Atheneu, 2000a. cap. 7, p. 91-128.

_____. Entre a fé e a ciência: a medicina na Idade Média In: FERNANDES, A. T.; FERNANDES, M. O. V.; RIBEIRO FILHO, N. **Infecção hospitalar e suas interfaces na área da saúde**. São Paulo: Atheneu, 2000b. cap. 4, p. 43-55.

_____. O desafio da infecção hospitalar: a tecnologia invade um sistema em desequilíbrio. In: FERNANDES, A. T.; FERNANDES, M. O. V.; RIBEIRO FILHO, N. **Infecção hospitalar e suas interfaces na área da saúde**. São Paulo: Atheneu, 2000c. cap. 8, p. 129-159.

FERREIRA, N.; MARQUES, T. D.; RADDI, G. S. M. et al. Avaliação Citológica da mucosa nasal de portadores de *Staphylococcus aureus*. **Rev. Bras. Anál. Clín.**, Rio de Janeiro, v. 35, p. 151-153, 2003.

FEU, P. D.; SAID-SALIM, B.; RUPP, M. E. et al. Comparative Molecular Analysis of Community- or Hospital- Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, DC, v. 47, p. 196- 203, 2003.

FITZPATRICK, F.; HUMPHREUS, H.; O'GARA, J. P. Evidence for icaADBC- independent biofilm development mechanisms in methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, D. C., v. 43, no.4, p.1973-1976, Apr. 2005.

FOWLER JUNIOR V. G.; MIRO, J. M.; HOEN, B. et al. Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-ímmunes. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. cap.12, p. 147-159. 2001.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAFF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2000.

FRAZIER, W. C.; WESHOFF, D. C. **Microbiologia de los alimentos**. 4. ed. Zaragoza: Editorial Acribia, 2000

FRIDKIN, S. K. et al. The effect of vancomycin and third generation cephalosporins on prevalence of vancomycin resistant enterococci in 126 US adult ICU. **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, v.135, n.3, p.175-183, 2001.

GALLES, Two-year assessment of the pathogen frequency and antimicrobial resistance patterns among organisms isolated from skin and soft tissue infections in Latin America hospitals: results from the SENTRY antimicrobial surveillance program, 1997-98. SENTRY Study Group. **Int. J. Infect. Dis.**, Hamilton, v. 4, no. 2, p. 75- 84, Apr./June 2000.

GELATTI L. C. et al. Sepsis por *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina adquirida na comunidade no sul do Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 42, n.4, p. 458-460, jul./ago. 2009.

GERKE, C.; KRAFT, A.; SÜSSMUTH, R. et al. Characterization of N-acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosyntheses of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesion. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 273, no. 29, p. 18586-18593, July 1998.

GORWITZ, R. J. et al. **Strategies for clinical management of MRSA in the community:** summary and an expert's meeting convened by the Centers for Diseases Control and Prevention, 2006. Disponível em: <http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/ar_marsa_ca.html>. Acesso em: 15 abr. 2009.

GÖTZ, F. Staphylococcus and biofilms. **Mol. Microbiol.**, Oxford, v. 43, no. 6, p. 1367- 1378, Mar. 2002.

HEROLD, B. C.; IMMERGLUCK, L. C.; MARANAN, M. C. et al. Community acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children with no identified predisposing risk. **JAMA**, Chicago, v. 279, p. 593-598, 1998.

HIRAMATSU, K.; ARITAKA, N.; HANAKI, H. et al. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. **Lancet**, London, n. 350, p. 670-1673, 1997

ITO, T.; OKUMA, Y.; MA, X. X. et al. Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. **Drug Resist. Update**, Edinburgh, v. 6, p. 41-52, 2003.

JAWETZ, E.; MELNICK, J.; ADELBERG, E. A. **Microbiologia médica**. 20. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

KATAYAMA, Y.; ITO, K.; HIRAMATSU. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome *mec*, encodes methicillin-resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, Washington, DC, v. 44, p. 1549- 1555, 2000.

KLEVENS, R. M.; EDWARDS, L. R.; TENOVER, F. C. et al. National nosocomial infections surveillance system. changes in the epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in intensive care units in US hospitals, 1992- 2—3. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v. 42, p. 389- 391, 2006.

KLOSS, W. E.; LAMBE, J. R. *Staphylococcus*. In: BALOWS, A. **Manual of clinical microbiology**. 5. ed. Washington, D. C.: American Society for Microbiology, 1991.

KLUYTMANS, J.; VAN BELKUM, A.; VERBRUGH, H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms and associated risks. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington D.C., v. 10, no. 3, p. 505-520, 1997.

KONEMAN, E. W. et al. Cocos Gram-Positivos: Parte I: estafilococos e microrganismos relacionados. In: KONEMAN, E. W. et al. **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. 5. ed.. Rio de Janeiro: Medsi, 2001. p. 551- 588.

KOTILAINEN, P.; HYVÄRINEN, J.; JÄRVINEN, H. et al. Testing of methicillin resistance by in vitro susceptibility and the presence of the *mecA* gene in clinical *Staphylococcus aureus* isolates in Finland. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v. 27, no. 5, p. 475-479, 1995.

KRAMER, A.; SCHWEBKE, I.; KAMPF, G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. **Biom. Central Infec. Dis.**, London, v. 6, no. 130, 2006. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1564025>>. Acesso em: 12 jun. 2009.

LANGE, C.; CARDOSO, M.; SENCZEK, D. et al. Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* isolates from cases of bovine mastitis in Brazil. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v. 67, p. 127-141. 1999.

LIAO R. S.; STORCH, G A.; RICHARD S. et al. Blinded Comparison of Repetitive-Sequence PCR and Multilocus Sequence Typing for Genotyping Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from a Children's Hospital in St. Louis, Missouri. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, D. C., v. 44, no. 6, p. 2254–2257, June 2006.

LINA, G.; PIEMONT, Y.; GODAIL-GAMOT, F. et al. Involvement of panton-valentine leucocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v. 29, p. 1128-1132, 1999.

LU, P. et al. Risks factors and molecular analysis of community methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* carriage. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, D. C., v. 43, no. 1, p. 132-139, 2005.

MACFADDIN, J. F. **Biochemical tests for identification of medical bacteria**. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p. 431-433.

MAMIZUKA, E. M.; OLIVEIRA, G. A. Isolamento de cepas de *Staphylococcus aureus* com sensibilidade reduzida a vancomicina em hospital brasileiro. **Rev. Pharm. Bras.**, Brasília, DF, ano. 3, p. 7-8, 2000.

MANDELL, G. L.; BENNET, J. E.; DOLIN, R. **Mandell, Douglas and Bennett's principles and practice of infectious diseases**. 6th ed. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone, 2005.

MARIA-LITRAN, T.; KROPEC, A.; ABEYGUNAWARDANA, C. et al. Immunochemical properties of the staphylococcal poly-n-acetylglucosamine surface polysaccharide. **Infect. Immun.**, Washington, D. C., v. 70, p. 4433-4440, 2002.

MARTINS, L. T. Staphylococcus. In: TRABULSI, L. R. et al. **Microbiologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2002. cap.18, p. 149-156.

MENDES, C. et al. Antibacterial resistant of community-acquired respiratory tract pathogens recovered from patients in Latin America: results from the Project surveillance study (1999-2000). **Braz. J. Infect. Dis.**, Salvador, v. 7, n.1, p. 44- 61, Feb. 2003.

MENEGOTTO F. R.; PICOLÉ S. V. *Staphylococcus aureus* oxacilina resistente (MRSA): incidência de cepas adquiridas na comunidade (CA-MRSA) e importância da pesquisa e descolonização em hospital. **Rev. Brás. Anal. Clin.**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 2, p. 147-150, 2007.

MICHELIM, L. et al. Fatores de patogenicidade e resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus epidermidis* associados a infecções nosocomiais em unidades de terapia intensiva. **Braz. J. Microbiol.**, Rio de Janeiro, v. 36, no. 1, p. 17-23, 2005.

MIMICA, M. J.; MENDES, C. M. F. Diagnóstico laboratorial da resistência à oxacilina em *Staphylococcus aureus*. **J. Bras. Patol. Lab.**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 6, p. 399-406, 2007.

MULDER, J. G.; DEGENER, J. E. Slime-producing properties of coagulase-negative staphylococci isolated from blood cultures. **Clin. Microbiol. Infect.**, Paris, v. 4, no. 12, p. 689-694, 1998.

MURRAY, P. R. et al. **Microbiologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992.

MURRAY, P. R. et al. *Staphylococcus* e microrganismos relacionados. In: _____. **Microbiologia médica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004c. cap. 22, p.188-201.

MURRAY, P. R. et al. Princípios e aplicação da microscopia. In: _____. **Microbiologia médica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004b. cap. 16, p. 145-149.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **Taxonomy Browser**. Disponível em: <www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/>. Acesso em: 20 dez. 2006.

NCCLS. **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests**: approved standard. 8th ed. Wayne, 2003. (NCCLS document; M2-A8).

NEVES, M. C. et al. Detecção de genes de resistência antimicrobiana em cromossomos e plasmídeos de *Staphylococcus aureus* SPP. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 74, n. 3, p. 207-213, 2007.

OKUMA, K. K.; IWAKAWA, J. D.; TURNIDGE, W. B. et al. Dissemination of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in the community. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, D. C., v. 40, p. 4289-42894, 2002.

OLIVEIRA, D. C.; LENCASTRE, H. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob. Agents Chemot.**, Washington, DC, v. 46, no. 7, p. 2155-2161, 2002.

OLIVEIRA, G. A. et al. Characterization of the brazilian endemic clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from hospitals throughout. **Braz. J. Infect. Dis.**, Salvador, v. 5, n. 4, p. 163-170, Aug. 2001.

OLIVEIRA, D. C.; LENCASTRE, H. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, D. C., v. 46, no. 7, p. 2155- 2161, 2002.

O'RIORDAN, K.; LEE, J. C. *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, D. C., v. 17, no. 1, p. 218-234, Jan. 2004.

PALMQVIST, N. et al. Protein A is a virulence factor in *Staphylococcus aureus* arthritis and septic death. **Microb. Pathog.**, London, v. 33, p. 239-249, 2002.

PAPPAS, P. A.; ANSTROM, K. J.; WRAY, D. et al. *Staphylococcus aureus* endocarditis: a consequence of medical progress. **JAMA**, Chicago, v. 293, p. 3012-3021, 2005.

PERL, T. M. et al. Intranasal mupirocin to prevent postoperative *Staphylococcus aureus* infections. **N. Engl. J. Med.**, Waltham, v. 346, p. 1871-1877, 2002.

PROJAN, S. J.; KORNBLUM, J.; KREISWIRTH, B. et al. Nucleotide Sequence: the Beta-Hemolysin gene of *Staphylococcus aureus*. **Nucleic Acids Res.**, Oxford, v. 17, p. 3305, 1997.

REINOSO, E et al. Rep-PCR of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in Argentina. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v.4, p. 115-121, 2007. Suplemento.

REIPERT, A.; EHLERT, K.; KAST, T. et al. Morphological and genetic differences in two isogenic *Staphylococcus aureus* strains with decreased susceptibilities to vancomycin. **Antimicrob. Agents Chemot.**, Washington, D. C., v. 47, no. 2, 568- 576, 2003.

RIBACK, M. J.; LAPLANTE, K. L. Community associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a review. **Pharmacother**, Boston, v. 25, p. 74-85, 2005.

RIBEIRO, J.; BOYCE, M. J.; ZANCANARO, Q. P. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) among patients visiting the emergency room at a tertiary hospital in Brazil. **Braz. J. Infect. Dis.**, Salvador, v. 9, 52-55, 2005.

RICARDO, S. B. Emergência de *S. aureus* Meticilina-Resistente (MRSA) na Comunidade. **Prática Hospitalar**, São Paulo, n. 34, p. 131-134, 2004.

RICHTMANN, R. **Guia prático de controle de infecção hospitalar**. [s. l.]: Soriak comércio e promoções, 2002.

ROHDE, H. et al. Correlation of biofilm expression types of *Staphylococcus epidermidis* with polysaccharide intercellular adhesion synthesis: evidence for involvement of icaADBC genotype- independent factors. **Med microbial Immunol.**, v. 190, p. 105-112, 2001.

RYFFEL, C.; KAYSER, F. H.; BERGER-BACHI, B. Correlation between regulation of *mecA* transcription and expression of methicillin resistance in staphylococci. **Antimicrob. Agents Chemot.**, Washington, D. C., v. 36, no. 1, p. 25-31, 1992.

SAIID-SALIM, B.; MATHEMA, B.; KREISWIRTH, B. N. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: na emerging pathogen. **Infect. Control. Hosp. Epidemiol.**, Chicago, v. 24, no. 6, p. 451-455, 2003.

SALYERS, A. A.; WHITT, D. D. **Bacterial strategies for evading or surviving the defense systems of the human body**. In: _____. *Bacterial pathogenesis – a molecular approach*. 2nd ed. Washington, D. C.: ASM Press, 2002.

SANTOS, N. Q. **Infecção hospitalar uma reflexão histórico-crítica**. Florianópolis: UFSC, 1997.

SANTOS, B. M O. Monitoramento da colonização pelo *Staphylococcus aureus* em alunos de um curso de auxiliar de enfermagem durante formação profissional. **Rev. Latino-am. Enfermagem**, Ribeirão Preto, v. 8, n. 1, p. 67-73, 2000.

SANTOS, B. M. O.; DARINI, A. L. C. Colonização por *Staphylococcus aureus* em portadores são relacionados de uma creche de Hospital Universitário. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 35, p. 160-172, 2002.

SANTOS, A. L. et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importancia hospitalar. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, [S.l.], v. 43, n. 6, p. 413-423, dez. 2007

SCHAECHTER, M.; EISENSTEIN, B. I.; ENGLEBRG, N. C. Aspectos genéticos da patogênese bacteriana. In: SCHAECHTER, M. et al. **Microbiologia mecanismos das doenças infecciosas**. Tradução de Patrícia Lydie Voeux e Patrícia Sá de Paula Machado. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. cap. 4, p. 35-54.

SIEGEL, J.D.; RHINEHART, E.; JACKSON, M.; CHIARELLO, L. and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee, 2007. Guideline for isolation precautions: Preventing transmission of infectious agents in healthcare settings, June 2007. **Public Health Service**, US Department of Health and Human Services, Center for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia.

SILVA, N. B.; RAVANELLO, L. M. Controle de infecção hospitalar em terapia intensiva de adultos. In: COUTO, R. C.; PEDROSA, T. M. G.; NOGUEIRA, J. M. **Infecção hospitalar e outras implicações não-infecciosas da doença: epidemiologia, controle e tratamento**. 3. ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2003. cap. 32, p. 609–616.

SIRIPOMMONGCOLCHAIN, T. et al. Evolution of different primers for detecting *mecA* genes by PCR in comparison with phenotypic methods for discrimination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public. Health**, Bangkok, v. 33, no. 4, p. 758-763, 2002.

SKIEST, D. J.; BROWN, K. A. C.; COOPER, B. D. et al. Prospective comparison of methicillin-susceptible and methicillin-resistant community-associated *Staphylococcus aureus* infections in hospitalized patients. **J. Infect.**, London, v. 54, no. 5, p. 427-434, 2007.

SMITH, T. L.; PEARSON, M. L.; WILCOX, K. R. et al. Emergence of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. Glycopeptide-Intermediate *Staphylococcus aureus* Working Group. **New Engl. J. Med.**, Boston, v. 340, no.7, p. 493-501, 1999.

SNYDMAN, D. R. **Infecções nosocomiais e iatrogênicas**. In: SCHAECHTER, Moselio et al. **Microbiologia mecanismos das doenças infecciosas**. Tradução de Patrícia Lydie Voeux e Patrícia Sá de Paula Machado. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. cap. 72, p. 589-592, 2002.

SOMERVILLE, G. A.; STEPHEN, B. B.; FITZGERLD, J. R. et al. In vitro serial passage of *Staphylococcus aureus*: changes in physiology, virulence factor production, and *agr* nucleotide sequence. **J. Bacteriol.**, Washington, D. C., v. 184, p. 1430-1437, 2002.

SOMMERÄUSER, J.; KLOPPERT, B.; WOLTER, W. et al. The epidemiology of *Staphylococcus aureus* infections from subclinical mastitis in dairy cows during a control programme. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v. 96, p. 91-102, 2003.

SPICER, W. J. **Bacteriologia, micologia e parasitologia clínica**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

STEVENS, D. L. et al. Impact of antibiotics on expression of virulence-associated exotoxin genes in methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v. 195, p. 202-211, 2007

TAMMELIN, A. et al. Nasal and hand carriage of *Staphylococcus aureus* in staff at a Department for Thoracic and Cardiovascular Surgery: endogenous or exogenous source? **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, Thorofare, v. 24, p. 686-689, 2003.

TAVARES, W. Resistência bacteriana. In: _____. **Manual de antibióticos e quimioterápicos antinfeciosos**. 2. ed. São Paulo: Ateneu, 1996. cap. 5, p. 43-100.

TAYLOR, J. M.; HEINRICHS, D. E. Transferrin binding in *Staphylococcus aureus*: involvement of a cell wall-anchored protein. **Mol. Microbiol.**, Oxford, v. 43, p. 1603-1614, 2002.

TENOVER F. C.; LANCASTER M. V.; Hill B.C. Characterization of staphylococci with reduced susceptibilities to vancomycin and other glycopeptides. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, D. C., v. 36, p. 1020-1027, 1988.

TENOVER, F. C. et al. Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, D.C., v. 32, p. 407-415, 1994.

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.**, Washington, D. C., v. 33, p. 2233- 2239, 1995.

TEIXEIRA, L. M. et al. *Staphylococcus aureus*. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, p. 307-312, 2008.

TIEMARSMA, E. W. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe, 1999-2002. **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta, v. 10, no. 9, p. 1627-1634, Sept. 2004.

TODA, E. N. **Estudo da susceptibilidade do *Staphylococcus aureus* isolado no Laboratório Central da Santa Casa de São Paulo, no período de setembro/2000 a março/2002**. 2003. 106 f. Dissertação (Mestrado)-Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, São Paulo, 2003.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Bactérias. In: _____. **Microbiologia**. 8. ed., Porto Alegre: Artmed, 2005. 894p.

TRABULSI, L. R. et al. **Microbiologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2002.

UTSUI, Y.; YOKOTA, T. Role of an altered penicillin-binding protein in methicillin- and cephem-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob. Agents Chemot.**, Washington, DC, v. 28. no. 3, p. 397-403, 1985.

VAN BELKUM, A. et al. Multicenter evaluation of arbitrarily primed PCR for typing of *Staphylococcus aureus* strains. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, D. C., v. 33, no. 6, p. 1537-1547, 1995.

VANDENBERGH, M. F. Q.; VERBRUGH, H. A. Carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical relevance. **J. Lab. Clin. Med.**, St. Louis, v. 133, no. 6, p. 525-534, 1999.

VANDENESCH, F.; EYKYN S.; BES M. et al. Identification and ribotypes of *Staphylococcus caprae* isolated as human pathogens and from goat milk. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, D. C., v. 33, p. 888-892, 1995.

VANDENESH, F.; NAIMI, T.; ENRIGHT, M.C. et al. Community-associate methicillin resistant *Staphylococcus aureus* carrying panton-valentine leukocidin genes: worldwide emergence. **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta, v. 9, no. 8, p. 978- 984, 2003.

- VANNUFFEL, P.; GIGI, J.; EZZEDINE, H. et al. Especific detection of methicillin-resistant *Staphylococcus* species by multiplex PCR. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, D. C., v. 33, no.11, p. 2864-2867, 1995.
- VEENSTRA, G. J. C.; CREMERS, F. F. M.; VAN DIJK, H. et al. Ultrastructural organization and regulation of a biomaterial adhesin of *Staphylococcus epidermidis*. **J. Bacteriol.**, Washington, D. C., v. 178, no. 2, p. 537-541, 1996.
- VOJTOV, N.; ROSS, H. F.; NOVICK, R. P. Global repression of exotoxin synthesis by staphylococcal superantigens. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, Washington, D. C., v. 99, p. 10102-10107, 2002.
- VUONG, C.; OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis* infections. **Microbes Infect.**, Paris, v. 4, p. 481- 489, 2002.
- WANG, J. T. et al. Molecular epidemiology anal control of nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in a teaching hospital. **J. Formos. Med. Assoc.**, Formosan, v. 103, no. 1, p. 32-36, Jan. 2004.
- WILKINSON, B. J. Staphylococcal capsules and slime. In: EASMON, C. S.; ADLAM, C. (Ed.). **Staphylococci and staphylococcal infections**. London: Academic Press, 1983. p. 481-524.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Overcoming Antimicrobial Resistance**. Geneva,. p. 1-21, 2001.
- ZAHA, A. et al. **Biologia molecular básica**. 3. ed. Porto Alegre: Mercado Aberto, 2003.
- ZETOLA, N.; FRANCIS, J. S.; NUERMBERGER, E. L. et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging threat. **Lancet Infect. Dis.**, New York, v. 6, no. 12, p. 753-755, Dec. 2006.
- ZIEBÜHR, W.; HEILMANN, C.; GÖTZ, F. et al. Detection of the intercellular adhesion gene cluster (*ica*) and phase variation in *Staphylococcus epidermidis* blood culture strains and mucosal isolates. **Infect Immun.**, Washington, D. C., v. 65, p. 890-896, 1997.