



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

# **RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS EM** ***Staphylococcus aureus***

RAFAEL CÉSAR BOLLELI FARIA

ORIENTADORA: Dra. Ana Maria Bonetti / UFU

CO-ORIENTADORA: Dra. Ana Paula Sarreta Terra / UFTM

UBERLÂNDIA – MG

2008



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

# **RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS EM** ***Staphylococcus aureus***

RAFAEL CÉSAR BOLLELI FARIA

ORIENTADORA: Dra. Ana Maria Bonetti / UFU

CO-ORIENTADORA: Dra. Ana Paula Sarreta Terra / UFTM

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Genética e Bioquímica (Área Genética).

UBERLÂNDIA – MG

2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

---

F224r Faria, Rafael César Bolleli, 1982-  
Resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* /

Rafael César Bolleli Faria. - 2008.

37 f. : il.

Orientador: Ana Maria Bonetti.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de  
Uberlândia, Pro-grama de Pós-Graduação em Genética e  
Bioquímica.

Inclui bibliografia.

1. Genética bacteriana - Teses. 2. Bactérias patogênicas -  
Teses. 3. Microorganismos - Efeitos de drogas - Teses. I.  
Bonetti, Ana Maria. II. Universidade Federal de Uberlândia.  
Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III.  
Título.

CDU:

579.61:615.28

---



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

# RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS EM *Staphylococcus aureus*

RAFAEL CÉSAR BOLLELI FARIA

## COMISSÃO EXAMINADORA

**Presidente:** Dra. Ana Maria Bonetti (Orientadora)

**Examinadores:** Dr. Carlos Ueira Vieira / UFTM

Dr. David Nascimento Silva Teixeira / UFTM

**Data da defesa:** 28 / 02 / 2008

As sugestões da Comissão Examinadora e as normas PGGB para o formato da dissertação foram contempladas.

---

Dra. Ana Maria Bonetti

“A mente que se abre a uma  
nova idéia jamais voltará  
ao seu tamanho original.”  
(Albert Einstein)

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por tudo o que ele faz por mim e pela minha família.

Aos meus pais (Atílio e Lucimar), aos irmãos que amo tanto (Ricardo e Rodrigo), vó Dora, Joviano e Lázara, vocês são as pessoas mais importantes na minha vida. Muito obrigado por me proporcionarem tudo para garantir minha felicidade e formação, devo tudo a vocês. Hoje sei o significado de FAMÍLIA.

Aos meus avós (João Bolleli e Iracema) que não podem estar presentes neste momento tão importante, mas vocês moram no meu coração.

À minha namorada Renata, que me apoiou, me auxiliou, e foi minha grande companheira nos momentos mais difíceis nesta caminhada. Amo-te.

Aos grandes e sinceros amigos de laboratório, que me ajudaram muito na realização deste trabalho, em especial, a Daniela, Carlos Ueira, Luciana Londe, Boscolli, Bel, Edmar, João, Renato, Carol, Flávia, Fausto, Tininha e Cynara. Não poderia esquecer o pessoal do Laboratório de Genética Molecular, agradeço muito a todos pelo convívio e apoio.

À Dra. Ana Maria Bonetti, por ter aceitado me orientar, pelo carinho, atenção, conselhos, correções do trabalho e pelo seu conhecimento.

À Dra. Ana Paula Sarreta, pela idéia do trabalho, por ter me ensinado pacientemente várias etapas do trabalho e pela amizade formada. Muito Obrigado Ana.

Ao Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho por ter se disponibilizado seu laboratório e pelas aulas de Genética I, as quais foram importantes para o meu interesse neste campo de pesquisa.

À Marlene, pelo carinho e apoio em tudo. Sua benção.

À Universidade Federal de Uberlândia e ao Instituto de Genética e Bioquímica, por disponibilizarem o laboratório no qual a pesquisa foi desenvolvida.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

A todos aqueles que direta ou indiretamente estiveram ao meu lado, me ajudando a alcançar mais este objetivo (pessoal de Itirapuã, Diego, Silvano, Vagner, Rafinha, Camila). Meu muito obrigado!

## ÍNDICE

	Página
Lista de Abreviaturas.....	iv
Lista de Tabelas.....	vi
Lista de Figuras.....	vii
Apresentação.....	01
<b>Capítulo 1: Considerações gerais sobre resistência a antimicrobianos em <i>Staphylococcus aureus</i>.....</b>	<b>03</b>
<i>Staphylococcus aureus</i> .....	04
Infecções causadas pelo <i>Staphylococcus aureus</i> .....	05
Mecanismos de Resistência.....	05
O gene <i>mecA</i> .....	08
Referências Bibliográficas.....	11
<b>Capítulo 2: Detecção de resistência a antimicrobianos por testes fenotípicos e genotípicos em <i>Staphylococcus aureus</i>.....</b>	<b>17</b>
Resumo.....	18
Abstract.....	19
1.0 Introdução.....	20
2.0 Material e Métodos.....	21
2.1 Isolamento e identificação bioquímica.....	21
2.2 Teste de sensibilidade antimicrobiana.....	22
2.3.1 Detecção da presença do gene <i>mecA</i> .....	22
2.3.2 Extração de DNA.....	22
2.4 Amplificação do gene <i>mecA</i> .....	23
2.5 Determinação da concentração de DNA.....	24
2.6 Amplificação do DNA de <i>S. aureus</i> por RAPD.....	24
2.7 Análise estatística.....	25
3.0 Resultados e Discussão.....	25
4.0 Conclusões.....	33
Referências Bibliográficas.....	34

## LISTA DE ABREVIATURAS

AMP	Ampicilina
APS	Ampicilina/Sulbactam
ATCC	The American Type Culture Collection
BHI	Infusão de cérebro e coração ( <i>Brain Heart Infusion</i> )
CEB	Clone Epidêmico Brasileiro
CMI	Concentração Mínima Inibitória
CTI	Centro de Terapia Intensiva
CVC	Cateter Vascular Central
D-ala	D-alanina
D-lac	D-lactato
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfato
DO	Densidade ótica
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
g	Gramma
g/l	Grau de Liberdade
h	Hora
LB	Meio de cultura Luria-Bertania
M	Molar
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de Magnésio
MHA	Mueller-Hinton Agar
min	Minuto
ml	Mililitro
mm	Milímetro
Mm	Milimolar
MRSA	Staphylococcus aureus resistente à meticilina
NaCl	Cloreto de sódio
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de sódio
Ng	Nanogramas
nm	Nanômetro
OPA	Prímer do kit A da Empresa Operon Tecnologic

OXA	Oxacilina
pb	Par de Base
PBP	protein binding penicillins
PCR	Reação em cadeia de polimerase (Polimerase chain reaction)
PEN	Penicilina
pH	Potencial Hidrogeniônico
pmol	Picomol
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RNA	Ácido ribonucléico
rpm	Rotações por minuto
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SDS	Sodium Dodecyl Sulphate
s	Segundos
Tris-HCL	Tris Hydrochloride
U	Unidade
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UFTM	Universidade Federal do Triângulo Mineiro
UPGMA	Unweighted Paired Group Method using Arithmetic averages
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
UV	Ultra-Violeta
V	Volts
VAN	Vancomicina
VRSA	Staphylococcus aureus resistente à vancomicina
$\alpha$	Nível de Significância (confiança)
$\lambda$	Absorbância
$\mu$ g	Microgramas
$\mu$ L	Microlitros
$\mu$ m	Micrômetro
°C	Graus Celsius

## LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2		Página
<b>Tabela 1:</b>	<i>Primers</i> utilizados para as reações de RAPD em <i>Staphylococcus aureus</i> e suas respectivas seqüências de nucleotídeos.	25
<b>Tabela 2:</b>	Grupos de resistência aos antimicrobianos nas cepas de <i>S. aureus</i> isolados dos CVC de pacientes do CTI do Hospital Escola da UFTM, Uberaba/MG, 2007.	26
<b>Tabela 3:</b>	Porcentagem e perfil de resistência das cepas de <i>S. aureus</i> isolados dos CVC de pacientes do CTI do Hospital Escola da UFTM, Uberaba/MG, 2007.	27
<b>Tabela 4:</b>	Tabela de Contingência de resistência à oxacilina e presença do gene <i>mecA</i> em cepas de <i>S. aureus</i> isolados dos CVC de pacientes do CTI do Hospital Escola da UFTM, Uberaba/MG, 2007.	28

## LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1 e 2		Página
<b>Figura 1:</b>	Colônias de <i>Staphylococcus aureus</i>	04
<b>Figura 2:</b>	Fragmentos de 513 pb do gene <i>mecA</i> (seta), de cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> isoladas dos CVC de pacientes do CTI do Hospital Escola da UFTM, Uberaba/MG, 2007. Gel de agarose 1,5% corado com Brometo de Etídeo.	28
<b>Figura 3:</b>	Amplificação de DNA por RAPD, para o <i>primer</i> OPA-09, dos grupos fenotípicos de <i>Staphylococcus aureus</i> isolados dos CVC de pacientes do CTI do Hospital Escola da UFTM, Uberaba/MG, 2007. Gel de agarose 1,5%, corado com Brometo de Etídeo.	30
<b>Figura 4:</b>	Dendograma representativo da distância genética por porcentagem de desacordo e agrupamento pelo método de UPGMA entre 11 genótipos utilizando 8 <i>primers</i> .	31

---

---

# APRESENTAÇÃO

---

---

O *Staphylococcus aureus* se caracteriza por ser um importante patógeno para os humanos. A capacidade patogênica de determinada cepa reside no efeito combinado de fatores extracelulares e toxinas juntamente com as propriedades invasivas da cepa. Além destas propriedades intrínsecas, deve-se salientar o alto grau de resistência desse microorganismo a vários antibióticos. As cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a múltiplos antibióticos representam um grande problema no controle das infecções hospitalares (IH). A capacidade de virulência e de propagação das cepas de *S. aureus* depende de fatores imunológicos, socioeconômicos, sistema de controle e vigilância epidemiológicos das infecções hospitalares e características dos hospitais. As infecções hospitalares têm sido estudadas em todas as partes do mundo, o que torna importante a análise da resistência antimicrobiana e diversidade genômica de cepas de *S. aureus*. Esse estudo poderá contribuir para o melhor entendimento do mecanismo de resistência antimicrobiana e das infecções hospitalares e, conseqüentemente, promoção da saúde e melhora da qualidade de vida.

O presente trabalho foi desenvolvido em dois capítulos, o primeiro relata os aspectos gerais do *Staphylococcus aureus* e de sua resistência a antimicrobianos. O segundo capítulo mostra os resultados obtidos, por meio da detecção fenotípica (antibiograma) e genotípica (PCR e RAPD) de *S. aureus*. O material biológico utilizado foram cepas de *S. aureus* isoladas de cateter vascular central de pacientes em leitos do Centro de Terapia Intensiva. Os objetivos foram a análise da resistência antimicrobiana através do antibiograma; identificação da presença do gene *mecA* utilizando a técnica de PCR e detecção da diversidade genômica, utilizando a tipagem molecular por polimorfismo de DNA dessas cepas, amplificado aleatoriamente (RAPD). As referências bibliográficas estão dispostas de acordo com a revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, que segue o estilo usado no *Index Medicus* (<http://www.nlm.nih.gov/serials/lii.html>).

---

---

# CAPÍTULO 1

---

---

**Considerações gerais sobre *Staphylococcus aureus*  
e resistência a antimicrobianos**

## ***Staphylococcus aureus***

Descrito por Ogoston, em 1880 (apud Levy, 1997), como cocos em forma de cachos e responsáveis por infecções piogênicas, o gênero *Staphylococcus* compreendia inicialmente duas espécies discriminadas pela produção de pigmentos: *S. aureus*, de cor amarelo-dourado (Figura 1), e *S. albus*, de colônias brancas. Em 1971, Baird Parker (apud Levy, 1997) reconhecia apenas três espécies de importância clínica, utilizando como característica diferencial a prova da coagulase: a) coagulase-positiva - *S. aureus*; b) coagulase-negativa - *S. epidermidis* e *S. saprophyticus*. Atualmente, esse gênero compreende 28 espécies e 8 subespécies de bactérias caracterizadas como cocos Gram-positivos, catalase-positiva, imóveis, em geral não-capsulados e anaeróbios facultativos (Waldvogel 2000).



**Figura 1:** Colônias de *Staphylococcus aureus*.

Essa bactéria é encontrada em um largo espectro de doenças, desde lesões superficiais até severas infecções sistêmicas, principalmente, em pacientes imunodeprimidos (Coia et al. 1988). Em indivíduo sadio, esse microrganismo é, freqüentemente, um comensal das fossas nasais e do intestino.

## **Infecções causadas pelo *Staphylococcus aureus***

As infecções por estafilococos podem ser didaticamente, classificadas com base em dois mecanismos distintos: 1) processo infeccioso agudo; e 2) doenças causadas por toxinas. As infecções agudas podem ser localizadas como pústulas, furúnculos, impetigos ou processos mais extensos e graves, como infecção cirúrgica, osteomielite, pneumonia, endocardite, meningite, etc., ou disseminadas, como bacteremia e septicemia. Doenças causadas por toxinas de estafilococos apresentam, também, amplo espectro de manifestações clínicas, como celulite, síndrome da pele escaldada, síndrome do choque tóxico e intoxicação alimentar (Arbuthnott, et al. 1990; Almeida 2004).

## **Resistência a Antimicrobianos**

A colonização do *S. aureus* e a subsequente infecção em pacientes hospitalizados constituem um elevado risco, principalmente, devido à possibilidade de apresentarem múltipla resistência aos antibióticos usualmente disponíveis no comércio. Além disso, os *S. aureus* podem expressar diversos fatores de virulência que lhes conferem capacidade de rápida colonização e, encontrando condições apropriadas, pode ocorrer sua disseminação através dos diversos tecidos e órgãos do hospedeiro (Gonçalves et al. 1987; Berger-Bächli 1994). Seu repertório de genes, que pode ser regulado diferentemente dependendo do sinal ambiental, permite a adaptação dessa bactéria a ambientes adversos, possibilitando assim, sua invasão, sobrevivência e multiplicação em diferentes sítios do hospedeiro (Jordens et al. 1989; Lowy 2003). Os genes de resistência bacteriana variam de acordo com sua localização, tipo de transferência e expressão (Koneman et al. 2001).

A cápsula polissacarídica, por exemplo, parece impedir a sua fagocitose opsonizada, enquanto o peptidoglicano, da parede celular, parece estar envolvido na resposta inflamatória do hospedeiro contra infecções estafilocócicas, pela ativação da via alternativa do sistema complemento. Um outro componente da parede celular, o ácido teicóico, parece estar envolvido com a ativação do sistema

complemento e, ainda possivelmente, com a aderência desses microrganismos à mucosa do hospedeiro (Lee et al. 1997).

Além dos componentes de superfície, os *S. aureus* secretam várias enzimas e toxinas, consideradas fatores de virulência (Lebeau et al. 1994). *S. aureus*, produtores de elevada quantidade da enzima catalase, parecem apresentar maior taxa de sobrevivência no interior de fagócitos polimorfonucleares (Mandell 1975; Fung et al. 2001).

O *S. aureus* tornou-se, do ponto de vista clínico, a espécie bacteriana mais importante entre os estafilococos, tendo sido destacado como agente de infecção hospitalar entre as décadas de 50 e 60, particularmente, em função das cepas resistentes à penicilina. Poucas semanas após o lançamento da meticilina, que ocorreu em 1961, foi isolada uma cepa de *S. aureus* resistente a essa droga (“Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*” - MRSA) na Inglaterra (Jevons 1961; Robinson & Enright 2003).

O *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) recebeu maior destaque a partir do final da década de 80, devido à ocorrência de surtos graves de infecções hospitalares em berçários e unidades de terapia intensiva. Esses microrganismos são considerados, até hoje, um dos maiores problemas clínicos e epidemiológicos em infecção hospitalar, ocupando o primeiro lugar nesse tipo de infecção associada a dispositivos invasivos em leitos de CTI, com resistência aos beta-lactâmicos na ordem de 60% (Moreno et al. 2006). Cepas de *S. aureus* multirresistentes são, hoje, comuns nos grandes hospitais de todo o mundo, limitando as opções terapêuticas apenas aos antibióticos vancomicina e teicoplanina (Levy 1997).

O paralelismo entre o uso de antimicrobianos, a seleção e a disseminação de cepas resistentes é registrado e aceito internacionalmente, tendo sido descrito pela primeira vez por Lepper em 1955 (apud Manrique & Galvão 1997). Embora o risco preciso da seleção de resistência aos antibióticos para a saúde pública não tenha sido definido, não há dúvida de que é um problema global e extremamente sério. A disseminação de germes resistentes é cada vez maior, a ponto de ocorrerem situações em que não há opção terapêutica eficaz (Manrique & Galvão 1997; Barie 1998). Tais mutantes resistentes começaram a se disseminar, inicialmente em hospitais de grande porte e mais recentemente, infecções

causadas por *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) foram, também, verificadas em hospitais de pequeno porte e em casas de saúde para idosos (Boyce 1990; Cohen 1992). Os MRSA são responsáveis por elevado número de infecções hospitalares, oriundas da transmissão do patógeno horizontalmente, via transmissão direta, através de auto-infecção, quando o microrganismo parte de um sítio do corpo para outro; de transmissão cruzada, quando o microrganismo é transmitido pelos profissionais de saúde ou por outros pacientes e, finalmente, através de via indireta, devido a contaminações oriundas do ambiente, veiculadas pelo ar, poeira, pelo uso de catéteres e equipamentos cirúrgicos ou outros equipamentos hospitalares, como nebulizadores, sondas, etc. (Cohen 1992; Neu 1992; Boyce et al. 1997; Trzcinski et al. 1997). A infecção associada ao uso de dispositivos intravasculares representa 10 a 20% de todas as infecções nosocomiais e é uma das causas mais frequentes de morbidade e mortalidade, representando uma fonte de bacteremia e sepse em pacientes hospitalizados. Os custos de internação e o tempo de permanência hospitalar aumentam significativamente nos pacientes com bacteremia (Sadoyama & Gontijo Filho 2002; Eggimann et al. 2004).

Estudos realizados com cepas de MRSA em hospitais brasileiros revelam a existência de um único clone predominante em todas as regiões do Brasil, com elevada multirresistência, conhecido como clone epidêmico brasileiro - CEB (Teixeira et al. 1995; Soares et al. 1997; Oliveira et al. 2001).

Procurado-se relacionar a maior gravidade das infecções com o fenômeno de multirresistência, porém, alguns estudos conseguiram apenas estabelecer um aumento da morbi-mortalidade, que parece ser atribuída mais à falta de opções terapêuticas do que à maior virulência dessas cepas (Ehrenkranz 1964; Bradley et al. 1991; Figueiredo et al. 1991; Roman et al. 1997). O tratamento das infecções causadas por bactérias fica restrito ao uso de antibióticos parenterais e de custo elevado (Bradley et al. 1991).

Os alvos de atuação dos antibióticos beta-lactâmicos são as enzimas com função de transpeptidases, que atuam nas etapas finais da formação da parede celular das bactérias. Essas enzimas, que por se ligarem aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, são chamadas de "PBP" ("*Protein Binding Penicillins*"). são proteínas de membrana que estão envolvidas na biossíntese da parede celular e promovem

a formação das pontes transversas de pentaglicinas do peptidoglicano, através da ligação da D-alanina de uma cadeia peptídica com a L-lisina da cadeia subsequente. Os antibióticos beta-lactâmicos, ao inibirem as “PBP”s, impedem a formação da camada de peptidoglicano da parede celular, o que parece desencadear a morte bacteriana por um processo ainda desconhecido. Cepas susceptíveis de *S. aureus* produzem quatro “PBP”s: “PBP” 1, 2, 3 e 4, sendo as “PBPs” 1, 2 e 3 consideradas como principais alvos dos beta-lactâmicos (Waxman & Strominger 1983; Tomasz et al. 1989; Dominguez et al. 1997; Marangoni 1997).

Atualmente, são conhecidos dois mecanismos principais pelos quais pode ocorrer resistência bacteriana aos beta-lactâmicos: 1) alteração da proteína alvo de ação da droga, ou seja, das “PBP”s; 2) produção de enzimas inativadoras, chamadas beta-lactamases (Mendonça 1997; Harbarth et al. 1998).

### **O gene *mecA***

Todas as cepas de MRSA testadas até o momento apresentam o gene *mecA*. Esse gene codifica uma nova proteína-alvo para a penicilina, a qual foi denominada de PBP 2a ou PBP 2' (Hartmam & Tomasz 1986; Chambers & Hackbarth 1987; Berger-Bächli et al. 1992). Trata-se de proteína que apresenta baixa afinidade para os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos e, portanto, no mutante resistente à meticilina não ocorre inibição da síntese da parede bacteriana, em presença da droga, uma vez que a PBP2a parece funcionar como uma PBP substituta (De Jonge et al. 1993). Em 2004, Pinho, Lencastre e Tomasz demonstraram em seu trabalho que para que ocorra uma completa expressão da resistência à oxacilina, o gene estrutural da PBP2 possui função essencial como gene auxiliar. Comparando-se as seqüências de DNA do gene *mecA* de diferentes cepas de MRSA, verificou-se a existência de variações pequenas, indicando uma origem genética comum para esse gene (Ryffel et al. 1990). O gene *mecA* está contido no determinante *mec* ou segmento *mec*, variando, aproximadamente, de 40kb a 60kb. A parte central desse fragmento (o “core” *mec*) é composta pelo gene *mecA* e pelos genes *mecR1-mecI*, responsáveis pela regulação do *mecA*. Além disso, outros elementos genéticos são encontrados no segmento *mec*, como por exemplo a seqüência de inserção IS1272 e o

transposon Tn554, dentre outros (Archer et al. 1994). Tal fato parece sugerir que a introdução do gene *mecA* nos *S. aureus* poderia ter ocorrido em um único evento (Lacey & Grinsted 1973; Matsushashi et al. 1986; Inglis et al. 1990). Tais conclusões foram confirmadas pelos estudos de Kreiswirth et al. (1993), os quais observaram que cada padrão de *southern*-hibridização com o Tn554 ocorre em associação com um e somente um, padrão de *southern*-hibridização *mecA*. A presença constante de ambos, gene *mecA* e o Tn554 sugere que o segmento *mec*, possivelmente, tenha entrado no *S. aureus* uma única vez e que todas as cepas isoladas subsequenteiramente adquiriram o referido gene por transferência vertical. A partir de então, os clones evoluíram através de rearranjos genômicos. Uma hipótese interessante é que os *S. aureus* teriam adquirido horizontalmente o gene *mecA* e seus genes regulatórios a partir de outras espécies bacterianas, possivelmente, de estafilococos coagulase negativas, já que o gene *mecA* e seus genes regulatórios estão, frequentemente, presentes nessas cepas (El-Adhami & Stewart 1997; Marangoni 1997). A expressão fenotípica da resistência dos MRSA pode ser homogênea ou heterogênea. Na resistência heterogênea, apenas uma pequena fração da população expressa resistência. Um fenótipo menos freqüente é a resistência homogênea, onde toda a população de células é resistente.

A expressão de resistência à meticilina em MRSA pode variar em diferentes cepas, desde a concentração mínima inibitória (CMI) de 1,5 µg/ml, muito próxima da CMI de cepas suscetíveis, até 800 µg/ml, em culturas uniformemente resistentes. Os mecanismos reguladores da expressão da resistência são complexos e não totalmente conhecidos (El-Adhami & Stewart 1997; Marangoni 1997; NCCLS 2003).

Uma vez que os MRSA são detectados em um determinado hospital, tendem a persistir, aumentando progressivamente sua prevalência (Thompson, et al. 1982; Beaujean et al. 1997; Hamilton-Miller 1997; Suller et al. 1997). Nos hospitais, a maior forma de transmissão do MRSA é pelas mãos, especialmente pelas mãos dos trabalhadores de saúde, colonização ou infecção de locais do corpo e contacto com material ou superfícies contaminadas com fluidos corporais contendo o MRSA. As precauções *standard* publicadas nas *guidelines* do CDC controlarão na maior parte dos casos a disseminação hospitalar do MRSA (Siegel et al. 2007).

A problemática das infecções por MRSA torna-se ainda mais severa com a emergência recente de cepas apresentando susceptibilidade diminuída à vancomicina (Hiramatsu et al. 1997a; Hiramatsu et al. 1997b; Tenover et al. 1998). Embora a prevalência deste tipo de infecção no resto do mundo seja desconhecida, será importante a aderência às novas recomendações para prevenção da colonização e infecção por estas cepas, como também, a implementação de métodos moleculares para que ocorra um diagnóstico correto e preciso, de forma a controlar a disseminação mundial de *S. aureus* multirresistentes (Mimica et al. 2006). Sistemas de tipagem molecular podem ser utilizados para investigações de surtos, para confirmar e delinear a transmissão de um ou mais clones epidêmicos e monitorar reservatórios de organismos epidêmicos (Santos et al. 2003).

## Referências Bibliográficas

- Almeida EA 2004. Bactérias multirresistentes. In: Couto RC, Pedroso, TMG. *Guia prático de controle de infecção hospitalar: epidemiologia, controle e terapêutic.*, 2ª ed., Medsi, Rio de Janeiro.
- Arbuthnott JP, Coleman DC, Azavedo JS 1990. Staphylococcal toxins in human disease. *J Appl Bacteriol* 19: 101-107.
- Archer GL, Niemeyer DM, Thanassi JA, Pucci MJ 1994. Dissemination among staphylococci of DNA sequences associated with methicillin resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 38: 447-454.
- Baird-Parker AC 1971. Factors affecting the production of bacterial food poisoning toxins. *J Appl Bacteriol* 34: 181-197.
- Barie PS 1998. Antibiotic-resistant Gram-positive cocci: implications for surgical practice. *World J Surg* 22: 118-126.
- Beaujean DJ, Blok HE, Weersink AJ, Verhoef J 1997. Long-term methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) carriage and tagging of patient records: in Utrecht you're not MRSA-positive for life. *J Hos Infect* 37: 338-339.
- Berger-Bächli B, Strässle A, Gustafson JE, Kayser FH 1992. Mapping and characterization of multiple chromosomal factors involved in methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 36: 1.365-1.373.
- Berger-Bächli B 1994. Expression of resistance to methicillin. *Trends Microbiol* 10: 389-393.
- Boyce JM 1990. Increasing prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the United States. *Infect Control Hosp Epidemiol* 11: 639-642.
- Boyce JM, Potter-Bynoe G, Chenevert C, King T 1997. Environmental contamination due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: possible infection control implications. *Infect Control Hosp Epidemiol* 18: 622-627.
- Bradley SF, Terpenning MS, Ransey MA 1991. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: colonization and infection in a long-term care facility. *Ann Intern Med* 115: 417-422.
- Chambers HF & Hackbarth CJ 1987. Effect of NaCl and nafcillin on penicillin-binding protein 2a and heterogeneous expression of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother* 31: 1.982-1.988.
- Cohen ML 1992. Epidemiology of drug resistance: implications for a post-antimicrobial era. *Science*. 257: 1.050-1.055.

- Coia JE, Noor-Hussain I, Platt DJ 1988. Plasmid profiles and restriction enzyme fragmentation patterns of plasmids of methicillin-resistant isolates from hospital and the community. *J Med Microbiol* 27: 271-276.
- Corbella X, Dominguez MA, Pujol M, Ayats J, Sendra M, Pallares R, Ariza J, Gudiol F 1997. *Staphylococcus aureus* nasal carriage as a marker for subsequent staphylococcal infections in intensive care unit patients. *Eur J Clin Microbio Infect Dis* 16: 351-357.
- De Jonge, BLM, Sidaw T, Chang YS, Labischinski H, Berger-Bachi B, Gage DA, Tomasz A 1993. Altered mucopeptide composition in *Staphylococcus aureus* strains with an inactivated *femA* locus. *J Bacteriol* 175: 2.779-2.782.
- Dominguez MA, Linares J, Martin R 1997. Molecular mechanisms of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Microbiologia* 13: 301-308.
- Eggimann P, Sax H, Pittet D 2004. Catheter-related infections. *Microbes and Infection* 6:1033-1042.
- Ehrenkranz, NJ 1964. Person-to-person transmission of *Staphylococcus aureus*: quantitative characterization of nasal carriers spreading infection. *New Engl J Med* 27: 225-230.
- El-Adhami W & Stewart PR 1997. Genome organization of *Staphylococcus aureus* isolates from different populations. *J Med Microbiol* 46: 297-306.
- Gonçalves AJR, Rozembaum R, Cardos FLL 1987. Doenças estafilocócicas. *Arq Bras Med* 61: 13-24.
- Hamilton-Miller, JM 1997. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using the BBL crystal MRSA kit. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 16: 481.
- Harbarth S, Rutschmann O, Sudre P, Pittet D 1998. Impact of methicillin resistance on the outcome of patients with bacteremia caused by *Staphylococcus aureus*. *Arch Intern Med* 158: 182-189.
- Hartman BJ, Tomasz A 1986. Expression of methicillin resistance in heterogeneous strains of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemoter* 29: 85-92.
- Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, Yabuta K, Oguri T, Tenover FC 1997a. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J Antimicrob Chemoter* 40: 135-136.
- Hiramatsu K, Aristaka N, Hanki H, Kawasaki S, Hosoda T, Hori S, Fekuchi Y, Kobayashi I 1997b. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet* 350: 1670-1673.

- Inglis B, Mathews PR, Stewart P 1990. Induced deletions within a cluster of resistance genes in the *mec* region of the chromosome of *Staphylococcus aureus*. *J Gen Microbiol* 136: 2.231-2.239.
- Jevons MP 1961. "Celbenin" - resistant staphylococci. *Br Med J* 1: 124-125.
- Jordens JZ, Duckworth J, Williams RJ 1989. Production of "virulence factors" by epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus in vitro*. *J Méd Microbiol* 30: 245-252.
- Koneman EW 2001. Provas de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos. In: *Diagnóstico Microbiológico – Texto e Atlas colorido*. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn Jr WC, 5ed., Medsi, Rio de Janeiro, p.795-865.
- Kreiswirth B, Kernblim J, Aryeit RD, Eisner W, Maslow JN, McGeer A, Low DE, Novik RP 1993. Evidence for a clonal origin of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Science* 259: 227-230.
- Lacey B & Grinsted J 1973. Genetic analysis of methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*: evidence for their evolution from a single clone. *J Med Microbiol* 6: 511-526.
- Lebeau C, Vandenesch F, Greenland T, Novick RP, Etienne J 1994. Coagulase expression in *Staphylococcus aureus* is positively and negatively modulation by an agr-dependent mechanism. *J Bacteriol* 176: 5.534-5.536.
- Lee YL, Cesario T, Gupta G, Flionis L, Tran C, Decker M, Thrupp L 1997. Surveillance of colonization and infection with *Staphylococcus aureus* susceptible or resistant to methicillin in a community skilled-nursing facility. *Am. J Infect Control*. 25: 312-321.
- Lepper MH, Jackson GG, Dowling HF 1955. Characteristics of the micrococcal nasal carrier state among hospital personnel. *J Lab Clin Med* 45(6):935–942.
- Levy CE 1996. Aspectos Microbiológicos In: *Infecções hospitalares: prevenção e controle*. Rodrigues EAC, Mendonça JS, Amarante JMB, Alves Fo MAB, Grimbaum RS, Richtmann R, Servier, São Paulo, p. 591-598.
- Lowy FD 2003. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest* 111: 1265-1273.
- Figueiredo AMS, De Lencastre H, Tomasz A 1991. *In vitro* stability of heterogeneous expression classes in clinical isolates of methicillin-resistant staphylococci. *J Infect Dis*.164: 883-887.
- Fung CP, Ho MW, Wang FD, Tsai K, Liu CE, Liu CY 2001. Investigation of outbreak caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a cardiovascular surgery unit by ribotyping, randomly amplified polymorphic DNA and pulsed field gel electrophoresis. *APMIS*, 109:474-480.

- Mandell GL 1975. Catalase, superoxide dismutase, and virulence of *Staphylococcus aureus*: *in vitro* and *in vivo* studies with emphasis on *Staphylococcal-leukocyte* interaction. *J Clin Invest* 55: 561-566.
- Manrique EI & Galvão LL 1997. Racionalização e controle de antimicrobianos In: *Infecções hospitalares: prevenção e controle*. Rodrigues EAC, Mendonça JS, Amarante JMB, Filho MBA, Grinbaum RS, Richtmann R, Sarvier, São Paulo, p.117-130.
- Marangoni DV 1997. *Staphylococcus aureus*. In: *Infecções hospitalares: prevenção e controle*. Rodrigues EAC, Mendonça JS, Amarante JMB, Filho MBA, Grinbaum RS, Richtmann R, Sarvier. São Paulo, p. 573 -591.
- Matsushashi M, Song MD, Ishino F, Wachi M, Doi M, Inoue M, Ubakata K, Yamashita N, Konno M 1986. Molecular cloning of the gene of a penicillin-binding protein supposed to cause high resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 167: 975-980.
- Mendonça JS 1997. Mecanismos de resistência bacteriana e suas implicações. In: *Infecções hospitalares: prevenção e controle*. Rodrigues EAC, Mendonça JS, Amarante JMB, Filho MBA, Grinbaum RS, Richtmann R, Sarvier, São Paulo, p. 561-570.
- Mimica MJ, Berezin EN, Carvalho RLB, Schneider E, Caiaffa-Filho, HH 2006. Avaliação da acurácia da placa de *screening* com oxacilina para detecção de resistência em cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de crianças internadas. *Arq Med Hosp Fac Cienc Med S Casa S Paulo* 51(3):76-80.
- Moreno CA, Rosenthal VD, Olarte N, Gomez WV, Sussmann O, Agudelo J, 2006. Device-associated infection rate and mortality in intensive care units of 9 colombian hospitals: findings of the international nosocomial infection control consortium. *Infect Control Hosp Epidemiol* 27:349-56.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards 2003. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. Approved standard M27A6. Wayne: *National Committee for Clinical Laboratory Standards*.
- Neu HC 1992. The crisis in antibiotic resistance. *Science* 257: 1.064-1.073.
- Oliveira GA, Faria JB, Levyand CE, Mamizuka EM 2001. Characterization of the brazilian endemic clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from hospitals throughout Brazil. *Braz J Infect Dis* 5(4):163-170.
- Pinho MG, Lencastre H, Tomasz A 2001. An acquired and a native penicillin-binding protein cooperate in building the cell wall of drug-resistant staphylococcy. *PNA* 98(19):10.886-10.891.

- Robinson DA & Enright MC 2003. Evolutionary models of the emergence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 47(12):3926-34.
- Roman RS, Smith J, Walker M, Byrne S, Ramotar K, Dyck B, Kabani A, Nicolle LE 1997. Rapid geographic spread of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain. *Clin Infect Dis* 25: 698-705.
- Ryffel C, Tesch W, Birch-Machin I, Reynolds PE, Barberis-Maino L, Kayser FH, Berger-Bachi B 1990. Sequence comparison of *mecA* genes isolated from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Gene* 94: 137-138.
- Sadoyama G, Gontijo Filho PP 2002. Colonizações do sítio de inserção e da ponta do cateter vascular central: experiência de 96 pacientes no hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia. *NewsLab* 54:160-168.
- Santos FGB, Mota RA, Siveira Filho VM, Souza HM, Oliveira MBM, Johner JMQ, Leal NC, Almeida AMP, Leal-Balbino TC 2003. Tipagem molecular de *Staphylococcus aureus* isolados do leite de vacas com mastite subclínica e equipamentos de ordenha procedentes do estado de Pernambuco. *Napgama* 6(1): 19-24.
- Siegel JD, Rhinehart E, Jackson M, Chiarello L 2007. *Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings*, p.219.
- Soares MJS, Tokumaru-Miyazaki NH, Noletto ALS, Figueiredo AMS 1997. Enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* clone: detection of brazilian epidemic MRSA clone (III::B:A) among isolates from food handlers workers. *J Med Microbio*. 46: 214-221.
- Suller MT, Stark JM, Lloyd D 1997. A flow cytometric study of antibiotic-induced damage and evaluation as a rapid antibiotic susceptibility test for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 40: 77-83.
- Teixeira LA, Resende CA, Ormonde LR, Rosenbaum R, Figueiredo AMS, De Lencastre H, Tomasz A 1995. Geographic spread of a epidemic multiresistant *Staphylococcus aureus* clone in Brazil. *J Clin Microbiol* 33: 2.400-2.404.
- Tenover FC, Lancaster MV, Hill BC, Steward CD, Stocker SA, Hancock GA, O'Hara CM, Clarck NC 1998. Characterization of staphylococci with reduced susceptibilities to vancomycin and other glycopeptides. *J Clin Microbiol* 36: 1.020-1.027.
- Thompson RL, Cabezudo I, Wenzel RP 1982. Epidemiology of nosocomial infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Ann. Intern. Med.* 97: 309-317.

- Tomasz A, Drugeon HB, De Lencastre HM, Jabes D, McDougall L, Bille J 1989. New mechanism for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* : Clinical isolates that lack the PBP 2a gene and contain normal penicillin-binding proteins with modified penicillin-binding capacity. *Antimicrob Agents Chemother* 33: 1869-1874.
- Trzcinski K, Hryniewicz W, Kluytmans J, van-Leeuwen W, Sijmons M, Dulny G, Verbrugh H, van-Belkum A 1997. Simultaneous persistence of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus* in a neonatal ward of a Warsaw hospital. *J Hosp Infect* 36: 291-303.
- Waxman DJ & Strominger JL 1983. Penicillin-binding protein and the mechanism of action of  $\beta$ -lactam antibiotics. *Ann Rev Biochem* 52: 825-869.

---

---

## CAPÍTULO 2

---

---

**Detecção de resistência a antimicrobianos por  
testes fenotípicos e genotípicos em  
*Staphylococcus aureus*.**

## RESUMO

*Staphylococcus aureus* resistentes a múltiplos antibióticos representam um grande problema no controle das infecções hospitalares. O perfil de resistência a antimicrobianos de isolados de *S. aureus* presentes em cateteres vasculares central de pacientes internados em leitos do centro de terapia intensiva do Hospital Escola da Universidade Federal do Triângulo Mineiro foi avaliado por meio de testes antimicrobianos, pelos quais foi possível detectar um elevado nível de resistência à penicilina (94,7%) e ampicilina (86,8%), considerando-se somente as amostras que possuíam resistência, além de uma cepa resistente à vancomicina. A avaliação da resistência à oxacilina foi confirmada por PCR através da presença do gene *mecA*. A associação dos resultados obtidos no teste fenotípico com a presença do gene *mecA*, considerado um método de referência, foi confirmada através da Tabela de Contingência e do Teste de  $X^2$  com correção de Yates. Em 49 amostras avaliadas, 23 apresentaram resistência à oxacilina, sendo possível detectar a presença do gene de resistência *mecA* em 21 amostras. O teste de tipagem molecular por RAPD permitiu a separação dos grupos fenotípicos em dois padrões diferentes de agrupamento, os que possuíam resistência e os sensíveis aos antimicrobianos, com uma dissimilaridade de 73,3%. Há maior similaridade genética entre grupos que apresentam o mesmo tipo de resistência, confirmando assim as análises fenotípicas. Marcadores moleculares para detecção de resistência à oxacilina, como o gene *mecA*, foram mais sensíveis que os marcadores fenotípicos.

**Palavras-chave:** *Staphylococcus aureus*, resistência antimicrobiana, gene *mecA*, RAPD.

## ABSTRACT

Multiple antibiotic resistant *Staphylococcus aureus* represent a big problem in the control of hospital infections. Resistance pattern of isolated *S. aureus* presented in central vascular catheter of patients interned in the Intensive Therapy Center of the School Hospital of the Universidade Federal do Triângulo Mineiro was evaluated by antimicrobial tests, in which it was possible to detect high level of resistance to penicillin (94.7%) and ampicillin (86.8%), only considering the samples that presented resistance, beyond one strain that presented resistance to vancomycin. The oxacillin resistance evaluation was confirmed by PCR with the presence of the gene *mecA*. The association of the results obtained in the phenotypic test with the presence of the gene *mecA*, considered the reference method, was confirmed through the Table of Contingency and the Test of  $X^2$  with Yates correction. In 49 isolates evaluated, 23 were resistant to oxacillin, being possible to detect the *mecA* gene in 21 samples. The test of molecular screening by RAPD allowed the separation of the phenotypic groups in two different grouping patterns, the ones that presented resistance to antimicrobials and the sensible ones, with a dissimilarity of 73,3%. There is a higher genetic similarity between groups that present the same type of resistance, thus confirming the phenotypic analyses. Molecular markers for detection of resistance to oxacillin, like the gene *mecA*, were more sensitive than the phenotypic markers.

**Key-words:** *Staphylococcus aureus*, antimicrobial resistance, *mecA* gene, RAPD.

## 1.0. Introdução

*Staphylococcus aureus* é considerado um dos principais patógenos causadores de infecções em ambiente hospitalar. As manifestações clínicas vão desde infecções traumáticas até septicemias. Com a introdução da meticilina na terapêutica de infecções estafilocócicas, no início da década de 1960, ocorreu um aumento constante de isolados denominados Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* – (MRSA). Essas infecções por MRSA representam um grande problema para as instituições de saúde, grandes ou pequenas, visto que os fatores predisponentes a essas infecções, tais como: tratamento antimicrobiano prévio, internação prolongada, ventilação mecânica, acompanhamento em UTI, cateterismo intravascular e procedimentos cirúrgicos em geral são comuns na atividade médica (Fagon et al. 1998). Aproximadamente 20% a 40% dos pacientes com cateter vascular central desenvolvem infecção local, e 3% a 10% desenvolvem bacteremia (Bernardo et al. 2005). Estima-se que 30% de todas as bacteremias hospitalares endêmicas e a maioria das candidemias estejam relacionadas à terapia de infusão, principalmente a partir de cateteres vasculares. Sabendo que a duração da cateterização vascular é, provavelmente, o maior determinante desse tipo de infecção e sua incidência, certamente, pode ser minimizada com o emprego de metodologia cuidadosa (Coelho et al 2007).

Muitas cepas de MRSA têm se mostrado resistentes à eritromicina, ciprofloxacina, gentamicina, clindamicina, trimetoprim, rifampicina, além dos beta-lactâmicos em geral, o que dificulta o tratamento e controle dessas infecções (Speller et al. 1997; Aubry et al. 1997). Nos casos de cepas resistentes à oxacilina, opta-se pelo uso da vancomicina, embora já tenham sido reportados casos de *Staphylococcus aureus* resistentes a esse antimicrobiano (Linden 1998; Hiramatsu 1998).

A resistência intrínseca dos estafilococos à meticilina/oxacilina resulta de PBPs (“*Protein Binding Penicillins*”) presentes na parede celular, as quais se expressam a partir de um gene cromossômico adquirido, *mecA*, que codifica as PBP2’ ou 2a, cuja afinidade com os antibióticos beta-lactâmicos é muito baixa. A resistência dos estafilococos aos antibióticos beta-lactâmicos pode ser função de

alguns fatores ambientais como pH, temperatura e osmolaridade (Ryffel et al. 1992).

Existe heterogeneidade genética considerável em populações naturais de *S. aureus* (Tenover et al. 1994; Kapur et al. 1995) a qual pode ser explorada para investigar a disseminação de cepas de *S. aureus* de origens humana e animal. A avaliação desses traços heterogêneos pode ser realizada pelo marcador molecular RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), utilizado para diferenciar os isolados em nível intra-específico (Lange et al. 1999).

Partindo-se do princípio de que infecções hospitalares por *S. aureus* possam ter diversidade fenotípica e genotípica, pode-se esperar que ocorra uma correlação dessas diferenças com o controle da infecção. O presente trabalho teve por objetivo verificar as variabilidades fenotípica e genotípica das cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de Cateter Vascular Central (CVC) de pacientes do Centro de Terapia Intensiva (CTI) do Hospital Escola da UFTM (Universidade Federal do Triângulo Mineiro).

## **2.0. Material e Métodos**

### **2.1. Isolamento e identificação bioquímica**

Foram utilizadas 49 cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas e identificadas previamente pelo serviço de patologia clínica da UFTM, a partir de amostras obtidas dos CVC de pacientes do CTI no período de janeiro de 2005 a fevereiro de 2006. Estes cateteres são habitualmente descartados.

As amostras coletadas foram colocadas em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) e incubadas por 30 minutos, em seguida semeadas em meio de cultivo ágar sangue e manitol e incubadas a 37°C durante 24 horas.

Somente as amostras que revelaram a presença de colônias de cocos com características sugestivas de *S. aureus* foram re-isoladas em novo ágar BHI e, após 24 horas a 37°C, submetidas à prova de catalase e coagulase. As colônias que apresentaram características compatíveis com o gênero e espécie passaram pela confirmação microscópica, após coloração pelo método de Gram.

As amostras, cujas provas de coagulase em tubo, mostraram-se imprecisas foram submetidas à prova da coagulase em lâmina com hemácias de carneiro previamente sensibilizadas com hemolisina e fibrinogênio (Staphy-Test, Probac do Brasil) (Mundim et al. 2003).

## **2.2. Teste de sensibilidade antimicrobiana**

A avaliação da resistência aos antimicrobianos foi realizada utilizando-se o método de difusão em discos. Os isolados de *S. aureus* foram cultivados em meio de cultura Brain Heart Infusion (BHI) a 37° até atingirem a concentração de 10<sup>8</sup> UFC/ml, utilizando-se como referência à escala de turbidez 0,5 da escala de McFarland. Essas amostras foram, individualmente, cultivadas em placas contendo Mueller-Hinton Agar (MHA). Em seguida, foram adicionados os discos contendo os antimicrobianos: ampicilina, penicilina, oxacilina para *S. aureus*, vancomicina e ampicilina/sulbactam, sendo as placas mantidas à 37°C por 24 horas. A interpretação dos resultados baseou-se na presença do halo de inibição produzido ao redor de cada disco sendo as amostras classificadas como sensível ou resistente, segundo a tabela de halos padronizada pelo NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards 1997).

## **2.3. Detecção da presença do gene *mecA***

### **2.3.1. Detecção do gene *mecA* pela técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)**

Foi empregada a técnica de PCR para confirmação da resistência à oxacilina e presença do gene *mecA*, detectados pelo teste de suscetibilidade aos antimicrobianos.

### **2.3.2. Extração de DNA**

O DNA genômico das cepas resistentes foi obtido segundo Ausubel et al. (1987) com algumas modificações, partindo-se de uma colônia de cada cepa crescida em ágar Muller-Hinton por 24hs a 37°C e suspensa em 100 ul de tampão (10mM Tris-HCl e 1mM EDTA, pH8.0) a fim de estabelecer uma concentração

final de  $3 \times 10^8$  UFC/ml, utilizando-se como referência à escala de turbidez 0,5 da escala de McFarland. Para a lise celular foram adicionados 50 ul de lisozima (20mg/ml) e incubados por 45 minutos a 37°C. Para completar a lise celular foram adicionados 20 ul de SDS (Sodium Dodecyl Sulphate) 20 % e 5 ul de proteinase K (20mg/ml). Após incubação a 37°C por 1 hora, foram acrescentados 200 ul de NaCl 5M e agitado, manualmente, por 15 segundos. O material intracelular foi separado por centrifugação a 10.000g por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante transferido para um novo microtubo. Em seguida, foram acrescentados 100ul de fenol-clorofórmio (1:1) seguido de 100ul de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) para liberação e separação de proteínas, seguido de centrifugação a 10.000g por 15 minutos e transferência do sobrenadante para um novo microtubo.

A precipitação do DNA foi realizada com 800ul de álcool etílico absoluto, gelado. Após a precipitação foi realizada nova centrifugação a 10.000g por 15 minutos a 4°C, mantendo-se o *pellet* no fundo do tubo. Para aumentar a pureza do material extraído procedeu-se à incubação a 42°C por 40 minutos com 20ul de RNase (10mg/ml) seguido de lavagem do pellet por duas vezes com álcool etílico 70%, secando à temperatura ambiente. O *pellet* foi ressuscitado em 30ul de água milliQ. O ácido nucléico extraído foi conservado à temperatura de -20°C até o momento de ser usado para análise por PCR (*Polimerase chain reaction*) e por RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*).

#### **2.4. Amplificação do gene *mecA***

A amplificação do gene *mecA* foi realizada segundo Murakami et al. (1991). Foram utilizados 10pmol dos *primers* 5' AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC 3' e 5' AGTTCTGCAGTACCGGATTTGCC 3' (Invitrogen), 50ng do DNA extraído, 1U de Taq polimerase, 10mM de dNTP, 2,5mM MgCl<sub>2</sub>, Tampão 10X da Taq, completando-se o volume para 20ul com água ultra pura. A reação de PCR foi processada em 40 ciclos constituídos de ciclos de desnaturação a 94°C por 30s; anelamento a 55°C por 30s; extensão a 72°C por 1 minuto; um ciclo de extensão final a 72°C por 5 minutos e 4°C por tempo indeterminado. Um volume de 10ul do produto da reação foi aplicado, para separação do fragmento do gene *mecA* por eletroforese em gel de agarose 1%, 100ml de tampão TBE 0,5 X (0,1M Tris; 0,1M

ácido bórico; 1mM EDTA; pH: 8,4) mais 1g de agarose, corado com 2,0 µl de Brometo de Etídeo (puro) para visualização do fragmento sob UV. Foi utilizado o marcador de DNA de 100pb (Ludwig) para comparação. Como controle negativo foi utilizado *S. aureus* ATCC 25923. A visualização das bandas foi realizada sob luz ultra-violeta (UV) e o gel fotografado em VDS Pharmacia .

## **2.5. Determinação da concentração de DNA genômico**

O DNA extraído das cepas de *S. aureus* foi diluído 500 vezes e a concentração do DNA genômico determinada através de leitura em espectrofotômetro Hitachi U-200 nos comprimentos de onda  $\lambda=260$  nm.

## **2.6. Amplificação do DNA genômico de cepas de *Staphylococcus aureus* por “Random Amplification of Polymorphic DNA” (RAPD).**

O método RAPD para este estudo foi realizado por PCR utilizando primers curtos aleatórios da Empresa Operon Tecnologic (OPA 01, OPA 04, OPA 07, OPA 08, OPA 09, OPA 10, OPA11 e OPA 20) (Tabela 1). Foram utilizados para cada reação 5ng de DNA extraído, 1U de Taq polimerase, 10mM de dNTP, 2,5mM MgCl<sub>2</sub>, tampão 10X da Taq e o volume completado com água ultra pura para 20ul. A reação foi processada em termociclador MJ Research PTC – 100, programado nas seguintes condições de amplificação: 3 ciclos iniciais de 94°C (1 minuto) desnaturação, 35°C (1 minuto) anelamento do *primer*, 72°C (2 minutos) extensão pela Taq polimerase e incorporação de nucleotídeos seguidos de 34 ciclos de 94°C (1 minuto), 35°C (1 minuto), 72°C (2 minutos); 1 ciclo de 72°C (2 minutos) para extensão final e 4°C por tempo indeterminado. Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% e 100ml de tampão TBE 0,5 X (0,1M Tris; 0,1M ácido bórico; 1mM EDTA; pH: 8,4) corado com 2,0 µl de Brometo de Etídeo e separados durante 11h30, a 90V.

Foram aplicados 10 µl do produto da reação de RAPD na canaleta juntamente com 2µl do tampão de carregamento 6X (sacarose 50%; azul de bromofenol 0,25%; xileno cianol FF 0,25%). Foi utilizado o marcador de DNA de 100 pb (Ludwig) para comparação. A visualização das bandas foi realizada sob

luz ultra-violeta (UV) e o gel fotografado em VDS Pharmacia .

**Tabela 1:** *Primers* utilizados para as reações de RAPD em *Staphylococcus aureus* e suas respectivas seqüências de nucleotídeos.

<b>Prímer</b>	<b>Seqüência</b>
OPA-01	5' CAGGCCCTTC 3'
OPA-04	5' AATCGGGCTG 3'
OPA-07	5' GAAACGGGTG 3'
OPA-08	5' GTGACGTAGG 3'
OPA-09	5' GGGTAACGCC 3'
OPA-10	5' GTGATCGCAG 3'
OPA-11	5' CAATCGCCGT 3'
OPA-20	5' GTTGCGATCC 3'

## 2.7. Análise estatística

Para as análises dos dados foi utilizado o programa Systat, versão 10.1 (2004) para análise das bandas polimórficas e formação de *clusters* como, também, a Tabela de Contingência e o Teste de  $X^2$  com correção de Yates para a associação dos dados obtidos (Callegari-Jacques 2006).

## 3.0. Resultados e Discussão

A Tabela 2 mostra que, entre as 49 cepas de *Staphylococcus aureus* submetidas ao teste de sensibilidade, *in vitro*, frente aos 5 antimicrobianos, 11 (22,5%) revelaram-se sensíveis aos princípios ativos testados. As 38 cepas restantes foram agrupadas em 10 grupos de resistência distintos, sendo o grupo 1 (OXA / PEN / AMP / APS) predominante. Os resultados confirmam a prevalência de cepas multirresistentes no Hospital Escola da UFTM e demonstram o amplo espectro de resistência frente aos antimicrobianos usualmente empregados na prática clínica (Almeida 2004). Foi observado uma cepa resistentes a todos os antimicrobianos, inclusive a vancomicina.

**Tabela 2:** Grupos de resistência aos antimicrobianos nas cepas de *S. aureus* isolados dos CVC de pacientes do CTI do Hospital Escola da UFTM, Uberaba/MG, 2007.

Grupo	Fenótipo de resistência aos antimicrobianos*	Cepas isoladas com a característica de resistência	
		Nº	%
1	OXA / PEN / AMP / APS	13	26,6
2	OXA / PEN / AMP	05	10,2
3	OXA / PEN	02	4,1
4	OXA / APS	01	2,0
5	PEN / AMP / APS	02	4,1
6	PEN / AMP	11	22,5
7	PEN / APS	01	2,0
8	OXA / PEN / AMP / APS / VAN	01	2,0
9	OXA / AMP	01	2,0
10	PEN	01	2,0
11	**	11	22,5
<b>Total de amostras</b>		<b>49</b>	<b>100,0</b>

\* Oxacilina (OXA), Penicilina (PEN), Ampicilina (AMP), Ampicilina/Sulbactam (APS), Vancomicina (VAN).

\*\* Sensíveis a todos os antimicrobianos testados.

A distribuição da resistência das amostras está apresentada na Tabela 3, onde se constata um elevado índice de resistência à penicilina (94,7%) e à ampicilina (86,8%), considerando somente as cepas resistentes. Os resultados corroboram os trabalhos desenvolvidos por Booth et al. (2001), Tahnkiwale et al. (2002) e Kaszanyitzky et al. (2004). O índice de resistência à vancomicina foi de (2,6%), resultados similares, foram encontrados por Linden (1998) nos EUA, Andrade et al. (2003) no Brasil e Bernardes, et al. (2004) no Brasil. O tratamento rotineiro e prolongado com este antimicrobiano pode ser um dos fatores que contribui para a seleção desse tipo de resistência, no local de estudo (Mello et al. 2005). A diminuição da sensibilidade à vancomicina está associada a uma ativação da síntese da parede celular, havendo hiperprodução das proteínas ligadoras de penicilinas, PBP2 e PBP2a, resultando no espessamento da parede bacteriana de *S. aureus*, dificultando assim, a entrada do glicopeptídeo para o

interior da célula bacteriana. O outro mecanismo de resistência à vancomicina pelo *S. aureus* atualmente descrito é o da aquisição de um gene de resistência classicamente descrito em *Enterococcus spp*, o gene *vanA* (CDC 2002).

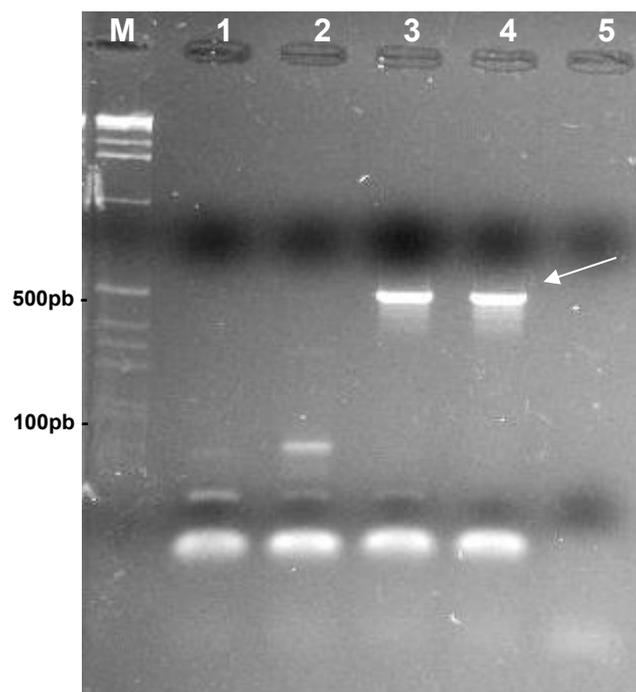
**Tabela 3:** Porcentagem e perfil de resistência das cepas de *S. aureus* isolados dos CVC de pacientes do CTI do Hospital Escola da UFTM, Uberaba/MG, 2007.

<b>Antimicrobiano</b>	<b>% de resistência*</b>	<b>gene <i>mecA</i>-positivo</b>	<b>gene <i>mecA</i>-negativo</b>
Oxacilina	60,5	91,3%	8,7%
Penicilina	94,7	66,7%	33,3%
Ampicilina	86,8	66,7%	33,3%
Vancomicina	2,6	100%	0%
Ampicilina/Sulbactam	47,4	77,7%	22,3%

\* foram consideradas somente as amostras que possuíam resistência.

O uso incorreto de antibióticos associado à seleção natural dos microrganismos, provavelmente, resultou no fenômeno da multirresistência. Segundo Meng et al. (1998) a resistência às drogas está relacionada, principalmente, com o uso excessivo de antibióticos e às aplicações sub-terapêuticas de antimicrobianos para a prevenção de doenças (Schentag et al. 1998; Herwaldt 1999).

Do total de 49 cepas incluídas no estudo, 33 foram *mecA*-positivas (67,3%) e 16 *mecA*-negativas (32,7%) (Figura 2 e Tabela 4). Considerando apenas as cepas que possuem resistência a algum antimicrobiano, 86,8% delas apresentaram o gene *mecA*. O método de detecção genotípica por PCR apresentou sensibilidade e especificidade de 91,3% para as amostras fenotipicamente classificadas como resistentes à oxacilina (Tabela 3). Resultados similares foram encontrados por Grisold et al. (2002). As cepas classificadas como resistentes á oxacilina e negativas para o gene *mecA* (8,7%), podem ter sido selecionadas para resistência através de outro mecanismo, como o da hiperprodução de betalactamase ou alteração em outra PBP que não a PBP2 (Geha et al. 1994; Alcaráz 2003).



**Figura 2** – Fragmentos de 513 pb do gene *mecA* (seta), de cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas dos CVC de pacientes do CTI do Hospital Escola da UFTM, Uberaba/MG, 2007. Gel de agarose 1,5% corado com Brometo de Etídeo.

M = marcador de peso molecular (100 pb);

1 e 2 = cepas *mecA*-negativas;

3 e 4 = cepas *mecA*-positivas;

5 = controle negativo.

**Tabela 4:** Tabela de Contingência de resistência à oxacilina e presença do gene *mecA* em cepas de *S. aureus* isolados dos CVC de pacientes do CTI do Hospital Escola da UFTM, Uberaba/MG, 2007.

<i>Staphylococcus aureus</i> (linhagens)	<u>Presença do gene <i>mecA</i></u>		Total
	Sim	Não	
Resistentes à oxacilina	21	2	23
Suscetíveis à oxacilina	12	14	26
<b>Total</b>	<b>33</b>	<b>16</b>	<b>49</b>

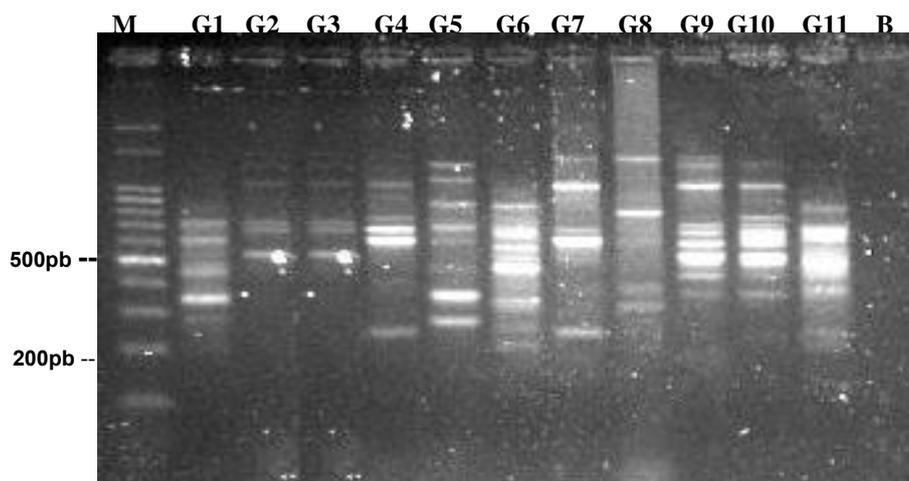
Para melhor visualização dos resultados os dados foram dispostos em uma Tabela de Contingência (Tabela 4) segundo Callegari-Jacques (2006), com as

variáveis presença da resistência fenotípica ao antimicrobiano oxacilina e presença do gene *mecA*. Os dados indicam que a frequência de cepas de *S. aureus* resistentes à oxacilina é consideravelmente alta (46,9% ou 23 em 49). Verifica-se também que a presença do gene *mecA* está relacionado a presença de resistência à oxacilina (91,3% ou 21 em 23). Para validar estes resultados foi aplicado o teste estatístico  $X^2$  com correção de Yates (Callegari-Jacques 2006). O  $X^2_{Yates} = 9,35$  excede o valor crítico para  $gl = 1$  e  $\alpha = 0,01$  (6,63) rejeitando-se, assim, a independência entre presença do gene *mecA* e a resistência à oxacilina.

Detectou-se, ainda, a presença do gene *mecA* em 12 cepas (46,1%) de todas as amostras que haviam sido classificadas como negativas para resistência fenotípica à oxacilina, valores superiores aos encontrados por outros autores, como Marshall (1998) e Pfaller (1999), que mostraram valores de 12% e 18%, respectivamente. O índice elevado encontrado (46,1%) pode ser explicado, por o fenótipo de resistência à oxacilina ser extremamente variável e depende da expressão do gene *mecA*. Esta variabilidade é conhecida como heterorresistência fenotípica, onde em toda população bacteriana heterogeneamente resistente, todas as células carregam o gene *mecA*, marcador genotípico da resistência, porém, nem todas o expressam fenotipicamente, a resistência de forma semelhante (Maranan et al. 1997). Os resultados comprovam a ampla distribuição do gene de resistência nos leitos de CTI do Hospital Escola da UFTM, uma tendência no ambiente hospitalar (Grisold et al. 2002).

Cada cepa de *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina (MRSA) tem um perfil característico da proporção de células que crescem em presença de concentrações específicas de oxacilina e de diferentes condições ambientais (Maranan et al. 1997; Lowy 2003). A expressão da resistência à oxacilina no *S. aureus* é regulada por genes homólogos aos reguladores do gene *blaZ*, gene que codifica a produção de  $\beta$ -lactamases. Os genes *mecI* e *mecR1* regulam a resposta do *mecA* aos beta-lactâmicos de uma maneira similar à regulação do *blaZ* pelos genes *blaR1* e *blaI*, frente à exposição à penicilina (Chambers 1997; Lowy 2003). Diversos métodos têm sido utilizados para a detecção da resistência à oxacilina no *Staphylococcus aureus*, mas segundo Chambers (1997), o método molecular por PCR é o único método tido como “padrão ouro” (*gold standard*) para a detecção da resistência. (Hiramatsu et al. 1992).

As reações de amplificação ao acaso de DNA (RAPD), por meio de 8 *primers* curtos entre os 11 genótipos (11 grupos) definidos pela mesma característica fenotípica, encontrada no teste do antibiograma, resultaram em 76 bandas amplificadas, das quais 18% eram polimórficas, porcentagem normal, considerando as diferenças entre populações.



**Figura 3** – Produtos de RAPD obtidos com o *primer* OPA-09, para os grupos fenotípicos de *Staphylococcus aureus* isolados dos CVC de pacientes do CTI do Hospital Escola da UFTM, Uberaba/MG, 2007. Gel de agarose 1,5%, corado com Brometo de Etídeo.

M = marcador de peso molecular (100 pb);

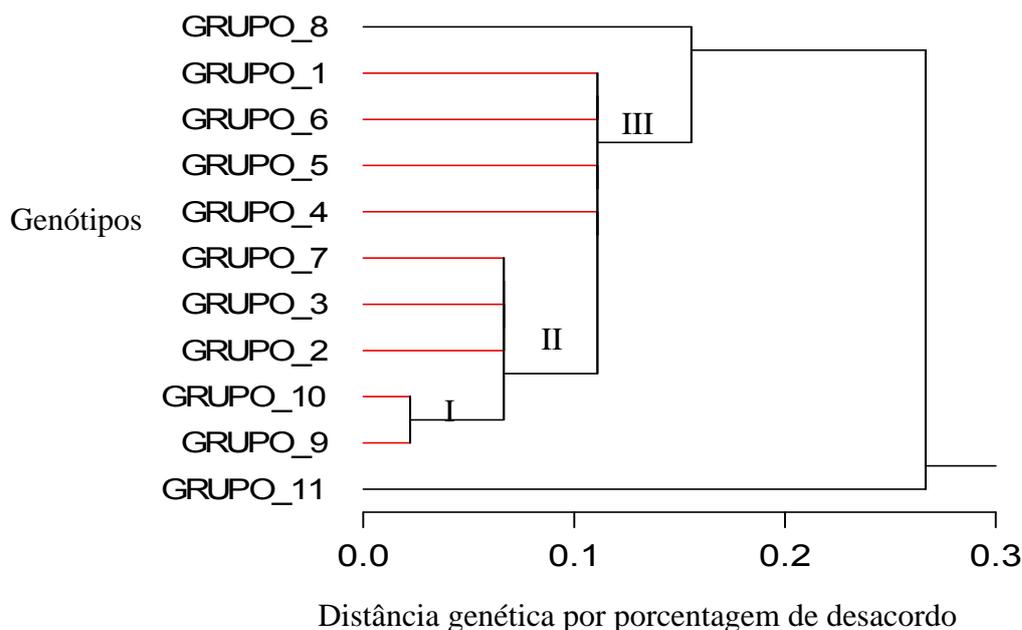
G1 a G11 = grupos fenotípicos de resistência – Tabela 2;

B = controle negativo.

A Figura 3 mostra o resultado dos fragmentos amplificados ao acaso, utilizando o *primer* OPA-09. Com os resultados obtidos de todas as amplificações ao acaso, foi construído um dendrograma (Figura 4) de porcentagem de desacordo, que permitiu o agrupamento das cepas em 2 padrões diferentes de agrupamento, os que possuíam resistência e os sensíveis aos antimicrobianos, com uma dissimilaridade de 73,3%. A distância genética limite foi encontrada para os grupos 8 e 11, resistentes a todos os antimicrobianos testados, inclusive à vancomicina e sensível a todos os antimicrobianos, respectivamente. O mecanismo de resistência à vancomicina (classe dos glicopeptídeos) dá-se por substituição da terminação D-ala-D-ala (sítio de ligação do antimicrobiano) por D-

ala-D-lac, que impede a ligação da vancomicina; essas alterações são codificadas pelo gene *vanA* (Leclercq & Courvalin 1998).

Dentro do padrão resistência, houve três padrões de agrupamentos (Figura 4) que apresentaram um elevado grau de relacionamento genético.



**Figura 4** – Dendrograma representativo da distância genética por porcentagem de desacordo e agrupamento pelo método de UPGMA entre 11 genótipos utilizando 8 *primers*. Os grupos estão separados por resistência: Grupo 8 (OXA/PEN/AMP/APS/VAN); Grupo 1 (OXA/PEN/AMP/APS); Grupo 6 (PEN/AMP); Grupo 5 (PEN/AMP/APS); Grupo 4 (OXA/APS); Grupo 7 (PEN/APS); Grupo 3 (OXA/PEN); Grupo 2 (OXA/PEN/AMP); Grupo 10 (PEN); Grupo 9 (OXA/AMP) e o Grupo 11 – sensível (OXA/PEN/AMP/APS/VAN). I, II e III agrupamentos de maior similaridade genética.

O agrupamento I foi o mais similar entre os genótipos estudados, possuindo uma distância genética de apenas 0,022 (2,2%). Nesse agrupamento foram reunidos 2 grupos fenotípicos de resistência, Grupo 10 à penicilina e o Grupo 9 à oxacilina e ampicilina, demonstrando a similaridade de grupos que não possuíam multirresistência. Além disso, o mecanismo de resistência destes grupos ( $\beta$ -lactâmicos) é análogo, ou seja, ambos inibem as “PBP”s (“*Protein Binding Penicillins*”) que atuam na formação da parede celular e ao inibirem as

“PBP”s, impedem a formação da camada de peptidoglicano da parede celular, desencadeando a morte bacteriana (Waxman & Strominger 1983). Já no agrupamento II, onde todos os grupos apresentam resistência à penicilina, obteve-se semelhança genética de 93,3%. O agrupamento III, com semelhança genética de 88,9%, apresenta grupos com resistência a pelo menos dois antimicrobianos, sendo um deles à ampicilina. Outra característica em comum entre os grupos 1, 4, 5 e 8 é a resistência ao antimicrobiano sulbactam, um inibidor de beta-lactamases (Oplustil et al. 2000).

Os dados mostram uma distância genética de desacordo pequena entre as amostras analisadas, caracterizadas por serem amostras da mesma espécie e todas terem sido isoladas de um mesmo tipo de material infectado. Há uma maior similaridade genética entre grupos que apresentam o mesmo tipo de resistência, confirmando assim as análises fenotípicas.

A tipagem molecular por RAPD é mais rápida, menos onerosa e detecta minuciosamente regiões com pequenas diferenças no material genético (Welsh & McClelland, 1990; Tambic et al. 1997).

A caracterização molecular de genótipos de *S. aureus* tem se tornado uma ferramenta de grande importância para o entendimento dos mecanismos de resistência dessa espécie e, conseqüentemente, fornecer subsídios para o uso adequado e eficiente dos antimicrobianos (Wang et al. 2002).

#### 4.0 Conclusões

- As cepas de *Staphylococcus aureus* que apresentam o gene *mecA* possuem maior frequência de resistentes à oxacilina (21/33 ou 63,6%) do que suscetíveis à oxacilina (12/33 ou 36,4%). O valor-*P* associado a esta conclusão é de  $0,001 < P < 0,01$ .
- Marcadores moleculares para detecção de resistência à oxacilina, como a PCR para o gene *mecA*, são mais sensíveis que os marcadores fenotípicos.
- Um método com boa acurácia, como o método molecular por PCR, é indicado para um diagnóstico correto da resistência à oxacilina nos *S. aureus*. O uso de antimicrobianos e de medidas de controle de infecção hospitalar, são dependentes de bons métodos de diagnóstico, principalmente, em ambientes onde o gene *mecA* esteja amplamente distribuído.
- O *S. aureus* resistente a vancomicina (VRSA) detectado pelo marcador fenotípico e/ou morfológico deve ser testado para determinação de algum dos genes relacionados à resistência a vancomicina como: *vanA*, *vanB*, *vanD*, *vanE* e *vanF* e *vanG*, para a confirmação dos dados.
- O surgimento de VRSA corrobora a necessidade de estratégias para evitar/prevenir a propagação de microrganismos resistentes a antibióticos e controlar o uso de drogas antimicrobianas em ambientes de assistência à saúde.
- O RAPD-PCR por ser uma técnica de fácil execução e rápida, pode ser utilizado para tipagem de grande parte das bactérias de interesse na clínica médica.

## Referências Bibliográficas

- Alcaráz LE, Satorres SE, Lucero RM, Centorbi ONP 2003. Species identification, slime production and oxacillinsusceptibility in coagulase-negative staphylococci isolated from nosocomial specimens. *Brazilian Journal of Microbiology* 34: 45-51.
- Almeida EA 2004. Bactérias multirresistentes. In: Couto RC, Pedroso, TMG. *Guia prático de controle de infecção hospitalar: epidemiologia, controle e terapêutica*. 2ª ed., Medsi; Rio de Janeiro.
- Andrade SS, Tognim MC, Baiocchi OC, Sader HS 2003. Endocarditis due to glycopeptide-intermediate *Staphylococcus aureus*: case report and strain characterization. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 45(2): 149-52.
- Aubry-Damon H, Legrand P, Brun-Buisson C, Astier A, Soussy CJ, Leclercq R 1997. Reemergence of gentamicin-susceptible strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: roles of an infection control program and changes in aminoglycoside use. *Clin Infect Dis* 25: 647–653
- Ausubel, FM, Brent R, Kingston RE, Struhl K, Moore DD, Smith JA, Seidman JG 1987. *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Publishing Associates, Brooklyn.
- Bernardes RC, Jorge AOC, Leão MVP 2004. Sensibilidade à oxacilina, vancomicina e teicoplanina de *Staphylococcus* coagulase-positivo isolados de pacientes hospitalizados em São José dos Campos. *Revista de Biociências* 10(½): 73-8.
- Bernardo WLC, Boriollo MFG, Gonçalves RB, Höfling JF 2005. *Staphylococcus aureus* ampicillin-resistant from the odontological clinic environment. *Rev In. Med Trop* 47(1): 19-24.
- Booth MC, Pence LM, Maraheshti P, Callegan MC, Gilmore MS 2001. Clonal associations among *Staphylococcus aureus* isolates from various sites of infections. *Infect Immun* 69(1): 345-352.
- Callegari-Jacques SM 2006. *Bioestatística: Princípios e Aplicações*. Artmed, Porto Alegre, 255p.
- Centers for Disease Control and Prevention CDC 2002. Staphylococcus aureus resistance to vancomycin-United States. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 51(26):565-7.
- Chambers HF 1997. Methicillin Resistance *Staphylococci*: Molecular and Biochemical Basis and clinical Implications. *Clin Microbiol Rev* 10(4): 781-791.

- Coelho SMO, Moraes RAM, Soares LC, Pereira IA, Gomes LP, Souza MMS 2007. Mapeamento do perfil de resistência e detecção do gene *mecA* em *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus intermedius* oxacilina-resistentes isolados de espécies humanas e animais. *Rev Ciência Rural* 37(1): 195-200.
- Fagon JY, Chastre J, Domart Y, Trouillet JI, Pierre J, Darne C 1989. Nosocomial pneumonia in patients receiving continuous mechanical ventilation. Prospective analysis of 52 episodes with use of a protected specimen brush and quantitative culture techniques. *Am Rev Respir Dis* 139: 877-84.
- Geha DJ, Uhl JR, Gustaferrero CA, Persing DH 1994. Multiplex PCR for identification of methicillin-resistant staphylococci in the clinical laboratory. *Journal of Clinical Microbiology* 32: 1768-1772.
- Grisold AJ, Leitner E, Mühlbauer G, Marth E, Kessler HH 2002. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and simultaneous confirmation by automated nucleic acid extraction and Real-Time PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 40(7): 2392-2397.
- Herwaldt LA, Perl TM, Pottinger JM 1999. Basics of surveillance: an overview. *Infect Control Hosp Epidemiol* 18:513-527.
- Hiramatsu K, Kihara H, Yokota T 1992. Analysis of borderline resistant strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Immunol* 36:445-453.
- Hiramatsu K 1998. Vancomycin resistance in staphylococci. *Drug Resist Updat* 1:135-50.
- Kapur V, Sischo WM, Greer RS, Whittam TS, Musser JM 1995. Molecular population genetic analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. *J Clin Microbiol* 33: 376-380.
- Kaszanyitzky EJ, Egyed Z, Janosi S, Keserü J, Gál Z, Szabó I, Veres Z, Somogyi P 2004. Staphylococci isolated from animals and food with phenotypically reduced susceptibility to beta-lactamase-resistant beta-lactam antibiotics. *Acta Veterinaria Hungarica*.52(1): 7-17.
- Lange C, Cardoso M, Senczek D, Schwarz S 1999. Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* isolates from cases of bovine mastitis in Brazil. *Vet Microbiol* 67: 127-141.
- Leclercq R, Courvalin P 1998. Streptogramins: an answer to antibiotic resistance in gram-positive bacteria. *Lancet* 352:591-592.
- Linden PK 1998. Clinical Implications of Nosocomial Gram-Positive Bacteremia and Superimposed Antimicrobial Resistance. *The American Journal of the Medical Sciences* 104: 24-33.

- Lowy FD 2003. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest* 111: 1265-1273.
- Maranam MC, Moreira B, Boyle-Vavra S, Daum RS 1997. Antimicrobial resistance in staphylococci. Epidemiology, molecular mechanisms, and clinical relevance. *Infect Dis Clin North Am* 11:813-849
- Marshall SA, Wilke WW, Pfaller MA, Jones RN 1998. *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci from blood stream infections: frequency of occurrence, antimicrobial susceptibility, and molecular (*mecA*) characterization in the SCOPE program. *Diagn Microbiol Infect Dis* 30: 205-214.
- Melo, GB, Gama AP, Bonetti AM, Carvalho KS, Melo MC, Jesus TC, Gontijo Filho PP 2005. Analysis of the genetic diversity of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Brazilian Journal of Microbiology* 36(2): 126-130.
- Meng J, Zhao S, Doyle MP, Joseph SW 1998. Antibiotic resistance of *Escherichia coli* O157:H7 and O157:NM isolated from animals, food and humans. *Journal of Food Protection* 61(11): 1511- 1514.
- Mundim GJ, Dezena RA, Oliveira ACSO, Silva PRS, Cardoso M, Pereira GA, Morais CA, Terra APS 2003. Avaliação da presença de *Staphylococcus aureus* nos leitos do Centro de Terapia Intensiva do Hospital Escola da Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro, em relação à posição no colchão antes e após a limpeza. *Rev Soc Bras Med Trop* 36(6): 685-688.
- Murakami, KW, Minamide W, Wada K, Nakamura E, Teraoka H, Watanabe S 1991. Identification of methicillin resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology* 29: 2240-2244.
- NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards 1997. *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests*. M2-A5, 5<sup>a</sup> ed., v.13, n.24.
- Oplustil CP, Zoccoli CM, Tobuti NR, Sinto SI 2000. *Procedimentos básicos em microbiologia clínica*. Sarvier São Paulo, 340p.
- Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, Sader HS, Kugler KC, Beach ML 1999. Survey of blood stream infections attributable to gram-positive cocci: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in 1997 in the United States, Canada, and Latin America from the Sentry Antimicrobial Surveillance Program *Diagn Microbiol Infect Dis* 33: 283-297.
- Schentag JJ, Hyatt JM, Carr JR, Paladino JA, Birmingham MC, Zimmer GS, Cumbo TJ 1998. Genesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), how treatment of MRSA infections has selected for vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*, and the importance of antibiotic management and infection control. *Clin Infect Dis* 26:1204-14.

- Speller DCE, Johnson AP, James D, Marples RR, Charlett A, George RC 1997. Resistance to methicillin and other antibiotics in isolates of *Staphylococcus aureus* from blood and cerebrospinal fluid, England and Wales, 1989-95. *Lancet* 350:323-325.
- Tambic A, Power EGM, Talsania H, Anthony RM, French GL 1997. Analysis of an outbreak of non phage-typeable Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* by using a randomly amplified polymorphic DNA assay. *J Clin Microbiol* 35: 3092-3097.
- Tahnkiwale SS, Roy S, Jalgaonkar SV 2002 Methicillin resistance among isolates of *Staphylococcus aureus*: antibiotic sensitivity pattern & phage typing. *Archives of International Medicine* 56(7): 330-334.
- Tenover FC, Arbeit R, Goering RV 1994. Comparison of Traditional and Molecular Methods of Typing Isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 32: 407-415.
- Wang JT, Chen-Chun Y, Yang TL, Chang CS 2002. Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in Taiwan. *Diag Microbiol Infec Dis* 42: 199-203.
- Waxman DJ. & Strominger JL 1983. Penicillin-binding protein and the mechanism of action of  $\beta$ -lactam antibiotics. *Ann Rev Biochem* 52: 825-869.
- Welsh J & McClelland M 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primer. *Nucleic Acids Res* 18: 7213-7218