

**CRISTINA FERREIRA E TEIXEIRA**

**ESTAFILOCOCOS COAGULASE-NEGATIVA – UM RISCO REAL PARA A SAÚDE  
PÚBLICA**

**PGVS/INCQS**

**FIOCRUZ**

**2009**

CRISTINA FERREIRA E TEIXEIRA

ESTAFILOCOCOS COAGULASE-NEGATIVA – UM RISCO REAL PARA A SAÚDE  
PÚBLICA

Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz

Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Maria Helena Simões Villas Bôas

Rio de Janeiro

2009

ESTAFILOCOCOS COAGULASE-NEGATIVA – UM RISCO REAL PARA A SAÚDE  
PÚBLICA

Cristina Ferreira e Teixeira

Tese submetida à Comissão Examinadora composta pelo corpo docente do programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz e por professores convidados de outras instituições, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor.

Aprovado em 30 de março de 2009

\_\_\_\_\_ (UERJ)

Prof. Dr. Alexandre Ribeiro Bello

\_\_\_\_\_ (UERJ)

Prof. Dr. José Augusto Adler Pereira

\_\_\_\_\_ (INCQS/FIOCRUZ)

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Paola Cardarelli Leite

Orientadora

\_\_\_\_\_ Dr<sup>a</sup>. Maria Helena Simões Villas Bôas

Rio de Janeiro

2009

Teixeira, Cristina Ferreira

Estafilococos coagulase-negativa – um risco real para a saúde pública./Cristina Ferreira e Teixeira. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2009.

xiii, 80f.; il.

Orientadora: Maria Helena Simões Villas Bôas.

Tese (Doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro, 2009.

1. Estafilococos coagulase-negativa 2. Resistência a biocidas 3. Resistência a drogas antimicrobianas 4. PFGE I. Título

Coagulase-negative staphylococci – a real risk for public health

“Deixem-me que lhes conte o segredo  
que me ajudou a atingir meus objetivos.  
Minha força reside apenas na minha  
tenacidade.”

Louis Pasteur

## AGRADECIMENTOS

Muitas pessoas contribuíram para a minha evolução profissional e pessoal. Não desmerecendo outras pessoas que participaram deste percurso, manifesto, carinhosamente, a minha gratidão a estas pessoas tão especiais.

- Minha família, que sempre me incentivou na busca de uma evolução profissional.
- Meus verdadeiros amigos que sempre compartilham momentos importantes como este.
- Dr<sup>a</sup>. Maria Helena Simões Villas Bôas, por quem tenho grande admiração e que me orientou com muita paciência, depositando em mim muita confiança.
- Thaciana, cuja dedicação a este trabalho foi fundamental para o seu desenvolvimento.
- Funcionários dos setores de Meio de Cultura e de Central de Esterilização do Departamento de Microbiologia do INCQS, que atendiam minhas solicitações prontamente.
- Dr<sup>a</sup>. Célia e Dr<sup>a</sup>. Neide, pela transmissão de valiosos conhecimentos.
- Dr<sup>a</sup>. Paola, Regina, Renata e Erica, pelas orientações sobre as técnicas de biologia molecular.
- Juliana e Alessandra do laboratório de Saneantes que facilitaram muito o meu trabalho.
- Dr. Ivano, Dr<sup>a</sup>. Maysa, Kátia e Claudia, pela ajuda quanto ao equipamento fotográfico.
- Adriana e Leonardo do Departamento de Química do INCQS, que gentilmente realizaram a análise de teor do produto químico utilizado neste trabalho.
- Paulo Baio (INCQS) e Rosa (IOC), pela realização do sequenciamento do DNA.
- João Mandarin, por ter selecionado e cedido os isolados hospitalares.
- Dr<sup>a</sup>. Verônica, Carmem, Mariana e João por terem me orientado sobre certas dúvidas e cedido equipamentos.
- Dr<sup>a</sup>. Manuela, pela revisão do *Abstract*.
- Prof. Rodrigo Chaves (UGF), pela revisão da metodologia científica.
- Dr. Antônio Eugênio, Leticia e Nathalia, dispostos a ajudar em diversas situações.
- Marília, pelo empréstimo de materiais necessários para a realização de alguns testes.
- Equipe da Coordenação da Secretaria Acadêmica do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, sempre muito prestativos.
- Funcionários da biblioteca do INCQS, por informações sobre as normas técnicas da dissertação.
- Dr. André Gemal na figura do Diretor do INCQS, pelo grande incentivo à Pós-Graduação e pelo auxílio financeiro concedido para realização deste trabalho.

## RESUMO

Os estafilococos coagulase-negativa (ECN) são considerados patógenos potencialmente causadores de infecções no homem, principalmente aquelas relacionadas ao uso de dispositivos médicos. O tratamento destas infecções tem se tornado cada vez mais um desafio para a saúde pública, uma vez que os ECN têm apresentado resistência a múltiplas drogas antimicrobianas. Os desinfetantes de superfícies, como os compostos quaternários de amônio, amplamente usados em ambiente hospitalar, muitas vezes também se tornam ineficientes contra estes patógenos hospitalares o que pode ser evidenciado pelo surgimento de cepas resistentes ou mesmo apresentando susceptibilidade reduzida a estes compostos. Neste estudo, tivemos como objetivos identificar isolados clínicos de ECN oriundos de um hospital público do Rio de Janeiro utilizando-se sistemas automatizados e semi-automatizados de identificação, verificar a susceptibilidade destes isolados clínicos às drogas antimicrobianas fenotipicamente ou genotipicamente e avaliar a susceptibilidade a um desinfetante à base de compostos quaternários de amônio. Como a espécie *Staphylococcus epidermidis* foi prevalente entre os 63 isolados clínicos estudados, sua diversidade genética foi analisada por PFGE. Apenas um dos isolados clínicos não foi identificado pelos métodos adotados. Dentre os isolados, 69,8% apresentaram resistência a mais de seis drogas, representando uma séria preocupação. O método automatizado Vitek detectou uma alta taxa de resistência à oxacilina, que estava associada à resistência intermediária à vancomicina em um isolado clínico. A resistência à oxacilina foi examinada também pelos testes de triagem em ágar contendo oxacilina e de difusão em disco contendo cefoxitina. Comparando estes dois métodos à detecção do gene *mecA*, considerada como padrão-ouro para indicar isolados meticilina-resistentes, o último mostrou melhor acurácia para revelar a expressão da PBP2a. O gene *mecA* foi encontrado em 88,88% dos isolados. Conforme esperado, os isolados de ECN menos resistentes às drogas antimicrobianas não apresentavam o gene *mecA*. A maior parte dos isolados apresentou o gene *qacA/B*, responsável pela resistência aos compostos quaternários de amônio. Não foi possível estabelecer uma relação entre a presença desse gene com a susceptibilidade reduzida ao desinfetante. Todos os isolados demonstraram ser sensíveis ao desinfetante utilizado no estudo através do método da Diluição de Uso. Pela análise do perfil clonal dos isolados foram identificados 24 tipos clonais. Através da análise de nossos resultados não foi possível determinar uma relação entre os perfis clonais e a presença dos genes *qacA/B* e *mecA*. É necessário que uma maior atenção seja direcionada para o controle das infecções hospitalares, buscando o uso criterioso de drogas antimicrobianas, anti-sépticos e desinfetantes, para evitar a seleção e a disseminação de microrganismos resistentes no ambiente hospitalar.

Palavras-chave: Estafilococos coagulase-negativa; resistência a biocidas; resistência a drogas antimicrobianas; PFGE.

## ABSTRACT

Coagulase-negative staphylococci (CNS) have been considered important pathogens that cause human infections, principally those related to the use of medical devices. The treatment of these infections has become a challenge for public health, since CNS have presented a multi-resistance profile to antimicrobial drugs. The surface disinfectants, like quaternary ammonium compounds, widely used in nosocomial environment, very often are inefficient against these nosocomial pathogens as highlighted by the appearance of strains presenting resistance or reduced susceptibility to these compounds. The aim of this study was to identify clinical isolates of CNS from a public hospital in Rio de Janeiro using automated and semi-automated identification systems. In order to verify the antimicrobial drug susceptibility of these clinical isolates and to evaluate their susceptibility to a quaternary ammonium compound disinfectant, phenotypic and genotypic methods were used. Since *Staphylococcus epidermidis* was the prevalent species identified among 63 clinical isolates studied, their genetic diversity was analyzed by PFGE. From all staphylococcus, only one isolate was not identified by the methods used. From the clinical isolates 69.8% showed resistance to more than six drugs, representing a serious problem. A high rate of oxacillin resistance was detected by Vitek method, which revealed an isolate with intermediate resistance to vancomycin, besides the oxacillin agar test and disk-diffusion cefoxitin test. The last test verified the best accuracy to reveal the expression of PBP2a when it was compared to the gene *mecA* detection, the gold-standard method for methicillin detection, since this gene was found in 88.88% of these isolates. As expected, the CNS less resistant to antimicrobial drugs did not present *mecA* gene. Most of the clinical isolates showed *qacA/B* responsible for resistance to quaternary ammonium compounds. It was not possible to establish a relationship between the presence of this gene and the reduced susceptibility to disinfectant. All isolates were susceptible to disinfectant by Use-Dilution method. Through clonal profile analyzes of the isolates 24 clonal types were identified. From the analyzes of these results it was not possible to determine a relationship between clonal profile and the presence of *qacA/B* and *mecA* genes. It is necessary to draw attention to nosocomial infections control and to have a criterious use of antimicrobial drugs, antiseptics and disinfectants, to avoid the selection and dissemination of microbial resistance in nosocomial environment.

Keywords: Coagulase-negative staphylococci; biocide resistance; antimicrobial drug resistance; PFGE.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
AMP – Ampicilina  
AOAC – *Association of Official Analytical Chemists* (EUA)  
ATCC – *American Type Culture Collection* (EUA)  
CDC – *Centers for Disease Control and Prevention* (EUA)  
CFZ – Cefazolina  
CIM – Concentração Inibitória Mínima  
CIP – Ciprofloxacina  
CLI – Clindamicina  
CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute* (EUA)  
DNA – Ácido desoxirribonucléico  
ECN – Estafilococos coagulase-negativa  
ERY – Eritromicina  
FDA – *Food and Drug Administration* (EUA)  
GEN – Gentamicina  
INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde  
MFS – *Major Facilitator Superfamily*  
MLST – *Multilocus Sequence Typing*  
MLVA – *Multiple-locus Variable-number Tandem Repeat Analysis*  
NCCLS – *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (EUA)  
NIT – Nitrofurantoína  
OMS – Organização Mundial da Saúde  
OPAS – Organização Pan-Americana da Saúde  
OXA – Oxacilina  
PBP2a – Proteína ligadora de penicilina de baixa afinidade  
PCR – *Polimerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)  
PEN – Penicilina G  
PFGE – *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* (Eletroforese em gel submetido a Campo Pulsado)  
PIA – Adesina polissacarídica intercelular  
PM – Peso molecular  
POP – Procedimento Operacional Padrão

QAC – Compostos quaternários de amônio

RIF – Rifampicina

SAM – Ampicilina/sulbactam

SMR – *Small Multidrug Resistance Family*

SXT – Sulfametoxazol/trimetoprim

TET – Tetraciclina

TSA – *Tripticase Soy Agar* (Ágar Tripticaseína Soja)

TSB – *Tripticase Soy Broth* (Caldo Tripticaseína Soja)

VAN – Vancomicina

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Esquema da formação de biofilme por <i>Staphylococcus epidermidis</i> .....	03
FIGURA 2: Esquema do Método da Diluição de Uso .....	26
FIGURA 3: Produtos da reação em cadeia da polimerase (PCR) para a detecção do gene <i>qacA/B</i> de alguns isolados de estafilococos coagulase-negativa .....	45
FIGURA 4: Produtos da reação em cadeia da polimerase (PCR) para a detecção do gene <i>mecA</i> de alguns isolados de estafilococos coagulase-negativa .....	46
FIGURA 5: Perfis de fragmentação do DNA dos representantes de cada tipo clonal (A1 a C4; Z) de <i>S. epidermidis</i> obtidos por PFGE .....	47
FIGURA 6: Perfis de fragmentação do DNA dos representantes de cada tipo clonal (D a J; U) de <i>S. epidermidis</i> obtidos por PFGE .....	48
FIGURA 7: Perfis de fragmentação do DNA dos representantes de cada tipo clonal (K, L, M, N, O, P, Q, R, S, T, V e X) de <i>S. epidermidis</i> obtidos por PFGE .....	49
FIGURA 8: Dendrograma dos 46 isolados clínicos de <i>Staphylococcus epidermidis</i> obtido a partir do PFGE .....	50

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1: Distribuição das diferentes espécies de estafilococos coagulase-negativa isoladas no ambiente hospitalar, de acordo com as fontes de isolamento .....	33
QUADRO 2: Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados clínicos identificados como <i>S. epidermidis</i> .....	34
QUADRO 3: Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados clínicos de <i>S. haemolyticus</i> , <i>S. simulans</i> , <i>S. capitis</i> , <i>S. xylosus</i> , <i>S. hominis</i> , <i>S. caprae</i> , <i>S. auricularis</i> e <i>S. chromogenes</i> .....	36
QUADRO 4: Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das espécies de <i>S. epidermidis</i> , <i>S. haemolyticus</i> , <i>S. simulans</i> , <i>S. capitis</i> , <i>S. xylosus</i> , <i>S. hominis</i> , <i>S. caprae</i> , <i>S. auricularis</i> , <i>S. chromogenes</i> e o número de isolados clínicos incluídos em cada perfil .....	37
QUADRO 5: Resultados do teste de difusão em disco contendo cefoxitina, teste de triagem em ágar contendo oxacilina e comparação com a presença do gene <i>mecA</i> para os isolados clínicos de <i>S. epidermidis</i> .....	38
QUADRO 6: Resultados do teste de difusão em disco contendo cefoxitina, teste de triagem em ágar contendo oxacilina e verificação da presença do gene <i>mecA</i> para os isolados clínicos de <i>S. haemolyticus</i> , <i>S. simulans</i> , <i>S. capitis</i> , <i>S. xylosus</i> , <i>S. hominis</i> , <i>S. caprae</i> , <i>S. auricularis</i> e <i>S. chromogenes</i> .....	40
QUADRO 7: Presença do gene <i>qacA/B</i> nos isolados clínicos identificados como <i>S. epidermidis</i> .....	41
QUADRO 8: Presença do gene <i>qacA/B</i> nos isolados clínicos de <i>S. haemolyticus</i> , <i>S. simulans</i> , <i>S. hominis</i> , <i>S. xylosus</i> , <i>S. caprae</i> , <i>S. capitis</i> , <i>S. auricularis</i> e <i>S. chromogenes</i> .....	42
QUADRO 9: Perfil de susceptibilidade ao composto quaternário de amônio de alguns isolados clínicos com relação ao fenol, à Concentração Inibitória Mínima (CIM) e à Diluição de Uso de acordo com o perfil de susceptibilidade às drogas antimicrobianas.....	43
QUADRO 10: Relação entre os tipos clonais de <i>S. epidermidis</i> , a presença dos genes <i>mecA</i> e <i>qacA/B</i> , e a origem dos isolados clínicos .....	44

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	01
<b>1.1 Estafilococos Coagulase-Negativa</b> .....	01
<b>1.2 Susceptibilidade às Drogas Antimicrobianas</b> .....	07
<b>1.3 Susceptibilidade aos Desinfetantes à Base de Compostos Quaternários de Amônio</b> .....	10
<b>1.4 Métodos de Avaliação da Resistência aos Antimicrobianos</b> .....	13
<b>1.5 Controle das Infecções e Vigilância Sanitária</b> .....	14
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	17
<b>2.1 Objetivos Gerais</b> .....	17
<b>2.2 Objetivos Específicos</b> .....	17
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	18
<b>3.1 Microrganismos</b> .....	18
3.1.1 Identificação dos Isolados Clínicos .....	18
3.1.2 Manutenção dos Isolados Clínicos .....	19
<b>3.2 Susceptibilidade às Drogas Antimicrobianas</b> .....	19
3.2.1 Teste de Susceptibilidade aos Antimicrobianos .....	19
3.2.2 Teste de Triagem em Ágar Contendo Oxacilina .....	19
3.2.3 Teste de Difusão em Disco Contendo Cefoxitina .....	20
<b>3.3 Verificação da Presença dos Genes <i>qacA/B</i> e <i>mecA</i></b> .....	20
3.3.1 Extração do Ácido Desoxirribonucléico Total .....	20
3.3.2 Reação em Cadeia da Polimerase .....	21
<b>3.4 Sequenciamento genético</b> .....	22
3.4.1 Purificação do produto da PCR .....	22
3.4.2 Determinação das Sequências Nucleotídicas .....	22
<b>3.5 Desinfetante</b> .....	23
<b>3.6 Atividades do Desinfetante</b> .....	23
3.6.1 Concentração Inibitória Mínima do Desinfetante .....	23
3.6.2 Técnica da Diluição de Uso .....	23
<b>3.7 Determinação do Perfil Clonal dos Isolados Clínicos</b> .....	24
3.7.1 Preparação do DNA Cromossômico .....	24
3.7.2 Tratamento Enzimático dos Discos .....	24

3.7.3 Análise do Perfil de Fragmentação pela Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE) .....	25
<b>4 RESULTADOS</b> .....	27
<b>4.1 Identificação dos Isolados Clínicos</b> .....	27
<b>4.2 Teste de Susceptibilidade aos Antimicrobianos</b> .....	27
<b>4.3 Teste de Triagem em Ágar Contendo Oxacilina</b> .....	28
<b>4.4 Teste de Difusão em Disco Contendo Cefoxitina</b> .....	28
<b>4.5 Verificação da Presença dos Genes <i>qacA/B</i> e <i>mecA</i></b> .....	29
<b>4.6 Seqüenciamento Genético</b> .....	30
<b>4.7 Concentração Inibitória Mínima do Desinfetante</b> .....	30
<b>4.8 Técnica da Diluição de Uso</b> .....	31
<b>4.9 Determinação do Perfil Clonal dos isolados clínicos por PFGE</b> .....	31
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	51
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	60
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	63

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Estafilococos Coagulase-Negativa

Os estafilococos coagulase-negativa (ECN) eram considerados bactérias não patogênicas até a sua descoberta como agentes causadores de infecções nosocomiais (KLOOS & BANNERMAN, 1994; VERMONT et al., 1998). Recentemente, a emergência da multi-resistência aos antimicrobianos em ECN exige que grande atenção seja direcionada para estes microrganismos principalmente em ambiente hospitalar (NUNES, 2000; SINGHAL et al., 2006).

As principais espécies de ECN envolvidas em infecções são: *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus lugdunensis* e *Staphylococcus xylosus*, embora outras espécies possam também causar infecções em humanos (KLOOS & BANNERMAN, 1994; CUNHA et al., 2002; CHANG et al., 2003; ROSS et al., 2005; SINGHAL et al., 2006). Entre elas, *S. epidermidis* é o agente mais associado com as infecções, especialmente com as bacteremias, inclusive no Brasil (KLOOS & BANNERMAN, 1994; CUNHA et al., 2002; CHANG et al., 2003).

Raramente os ECN causam doenças em hospedeiros saudáveis, mas são considerados microrganismos oportunistas, pois tiram vantagem de certas situações para produzir infecções graves. As condições de risco associadas à aquisição de infecções nosocomiais são: permanência prolongada no hospital, prematuridade, exposição a procedimentos de alto risco e o uso de dispositivos médicos como cateteres e próteses artificiais (KLOOS & BANNERMAN, 1994; CHANG et al., 2003; RUPP et al., 2005).

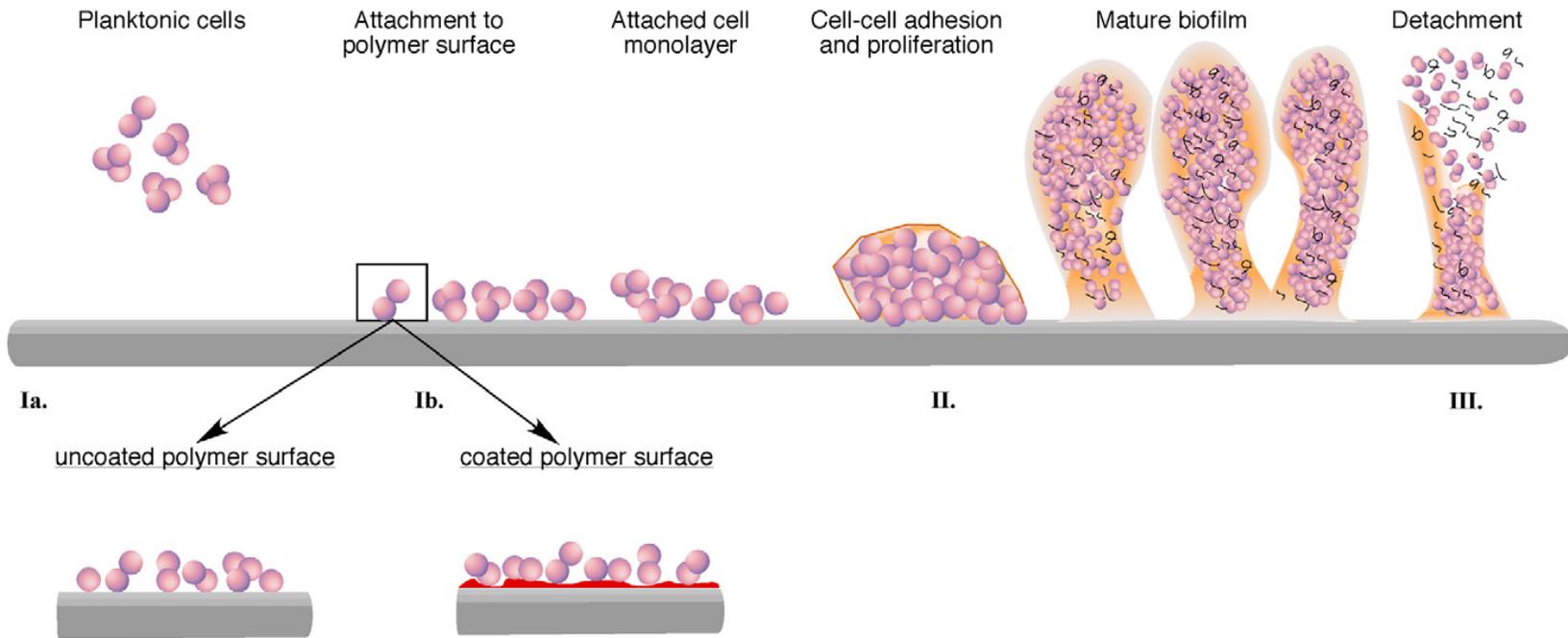
Fatores imunológicos também interferem na ocorrência de infecções causadas por ECN. Estas bactérias são importantes patógenos oportunistas isolados de culturas do sangue em unidades neonatais de cuidado intensivo (KREDIET et al., 2004; CIMIOTTI et al., 2007), estando principalmente relacionados com infecções causadas em recém-nascidos com baixo peso (FREEMAN et al., 1990; CARLOS et al., 1991), os quais são imunologicamente imaturos e frequentemente requerem procedimentos invasivos para a administração de nutrientes e drogas (FREEMAN et al., 1990). A imaturidade do sistema imunológico que consiste na deficiência de fagocitose e de opsonização por anticorpos e complemento

contribuem na gravidade das infecções (ESHALI et al., 1989). O aumento no número dessas infecções tem sido associado ao aumento da sobrevivência dos neonatos prematuros de baixo peso e sua permanência prolongada nos hospitais (KACICA et al., 1994; HO, 2001).

Os ECN constituem um dos maiores grupos componentes da flora anfibiônica de mucosas e pele humana (SILVA et al., 2000). Portanto, a pele pode constituir um reservatório para estas bactérias, inclusive àquelas resistentes aos antimicrobianos (ARCHER, 1991; ARCHER & CLIMO, 1994). Deste modo, normalmente os microrganismos são introduzidos na corrente sanguínea durante uma cirurgia ou durante a inserção de cateteres, causando infecções de início precoce como a septicemia (EYKYN, GRANSDEN & PHILLIPS, 1990; SALZMAN et al., 1993; CUNHA et al., 2002). A infecção pode também ter início tardio, semanas, meses ou anos após uma cirurgia ou após introdução do cateter ou mesmo durante ocorrência de bacteremia de outra origem (CHOO et al., 1981).

Um grande problema em pacientes sob uso prolongado de dispositivos médicos é o desenvolvimento de infecções causadas pelo biofilme (BAVEJA et al., 2004 a e b). Biofilmes são comunidades de microrganismos que crescem, embebidos principalmente em uma matriz de água e exopolissacarídeos (conhecidos como *slime* ou camada limosa), e que possuem habilidade de aderir em superfícies inertes como dispositivos médicos e sistemas de água industrial ou em tecidos vivos (DONLAN & COSTERTON, 2002; VUONG & OTTO, 2002; LASA et al., 2005). O primeiro passo da formação do biofilme envolve a interação entre a superfície plástica do material e a superfície bacteriana, devido à hidrofobicidade de ambas. Este processo, estudado *in vitro*, estaria associado às proteínas de superfície SSP-1 e SSP-2, as quais são organizadas em apêndices semelhantes a fímbrias e que parecem contribuir para a aderência de *S. epidermidis* ao poliestireno (TIMMERMAN et al., 1991; VEENSTRA et al., 1996). A autolisina AtlE, outra proteína de superfície de *S. epidermidis*, também estaria relacionada com a ligação primária à superfície dos biomateriais (VON EIFF et al., 1999; VUONG & OTTO, 2002), bem como uma adesina polissacarídica capsular (PS/A) (TOJO et al., 1988). A formação do biofilme está representada na FIGURA 1.

Entretanto, este processo parece não ter tanta importância *in vivo*, pois, quando introduzido no organismo do paciente, o material plástico torna-se rapidamente revestido por proteínas de matriz, as quais podem atuar como receptores para a colonização bacteriana (HERRMANN et al., 1991; VUONG & OTTO, 2002).



**Ia. Attachment to uncoated polymer surface by physico-chemical properties**

- Hydrophobic interactions (AtIE)
- Electrostatic interactions (teichoic acid)
- Van der Waal's forces

**Ib. Attachment to coated polymer surface by extracellular matrix proteins**

- Fibrinogen (Fbe)
- Vitronectin (AtIE)
- Coagulation products like platelets and thrombin
- Von Willebrand factor (?)

**II. Cell-cell proliferation to mature biofilm**

- Polysaccharide Intercellular Adhesin (PIA)
- Accumulation Associated Protein (AAP)

**III. Detachment**

- $\delta$ -toxin
- Degradation of extracellular macromolecules

Fonte: Young & Otto (2002)

FIGURA 1 - Esquema da formação de biofilme por *Staphylococcus epidermidis*

Uma vez aderida à superfície dos cateteres, a bactéria começa a se dividir e as células geradas se estendem ao redor de um sítio de união formando uma microcolônia. Em uma etapa posterior, a bactéria começa a secretar um exopolissacarídeo, a adesina polissacarídica intercelular (PIA) em *S. epidermidis*. Tal adesina é produzida pelo operon *ica*, sendo a responsável pela formação do biofilme, isto é, pelo acúmulo de células de *S. epidermidis* em determinada superfície (HEILMANN et al., 1996; GÖTZ, 2002). Este operon está presente apenas nos isolados invasivos, e não naqueles da flora normal da pele, indicando que é um importante fator de virulência da bactéria (FREBOURG et al., 2000; VUONG & OTTO, 2002). Além da PIA, uma proteína associada ao acúmulo (AAP) de 140 KDa foi apontada como sendo essencial para o crescimento acumulado de *S. epidermidis* na superfície dos polímeros (VON EIFF et al., 1999; VUONG & OTTO, 2002).

Finalmente, algumas bactérias da matriz do biofilme são liberadas do mesmo para colonizarem novas superfícies. Este processo poderia ter relação com a variação de fase produzida pela inserção reversível de um elemento de inserção (IS256) no interior do operon *ica* (LASA et al., 2005). Vários fatores parecem estar envolvidos na regulação da expressão desse operon, incluindo a proteína Sar A, cujo gene responsável por sua produção poderia representar um importante alvo clínico para a prevenção de infecções relacionadas aos dispositivos médicos (TORMO et al., 2005).

O biofilme formado pelos ECN pode evitar os mecanismos de defesa do hospedeiro, como a fagocitose e a ação de peptídeos antibacterianos produzidos pelas células epiteliais da pele ou pelas glândulas sudoríparas (SHIAU & WU, 1998; VUONG et al., 2004), além de dificultar a terapia antimicrobiana (MONZÓN et al., 2001).

A existência do biofilme formado por células de *S. epidermidis* interfere na ação de agentes antimicrobianos (MONZÓN et al., 2001) pela formação de uma barreira que dificulta a penetração dos mesmos. Isto foi demonstrado em biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* (SUCI et al., 1994) e de *S. epidermidis* (DONLAN & COSTERTON, 2002), em relação à ação de ciprofloxacina e tobramicina, respectivamente. Além disso, o *slime* produzido por *S. epidermidis* impede a eficiência de alguns agentes contra *Bacillus subtilis* (SOULI & GIAMARELLOU, 1998), indicando que a reação entre o agente e o *slime* pode influenciar na susceptibilidade do microrganismo ao agente. Outro fator que poderia explicar a influência do *slime* na antibioticoterapia seria a reduzida taxa de crescimento dos ECN presentes no biofilme, os quais entram na fase estacionária de crescimento, provavelmente por causa da

penetração incompleta de substratos metabólicos, tais como a glicose e o oxigênio (MONZÓN et al., 2001; DONLAN & COSTERTON, 2002; ANDERL et al., 2003).

Apesar do desenvolvimento de muitas alternativas terapêuticas para o tratamento das infecções causadas pelos microrganismos presentes no biofilme, ainda há grande dificuldade na recuperação destes pacientes. É geralmente necessária a remoção rápida dos dispositivos médicos (McGEE & GOULD, 2003), eliminando assim o foco da infecção e elevando a probabilidade de cura e sobrevivência do paciente, à medida que a imunidade e os antimicrobianos se tornam capazes de atingir os patógenos (CUNHA et al., 2002).

Entretanto, em casos de dificuldade de acesso venoso e mesmo na ausência deste problema, a melhor alternativa para evitar infecções associadas a biofilmes é impedir que se formem nos dispositivos médicos. Bloquear a aderência inicial à superfície do biomaterial através do uso de linezolida ou vancomicina antes mesmo da bactéria alcançá-lo pode levar à inibição da formação do biofilme (PAGANO et al., 2004), mas outras estratégias têm sido propostas com o mesmo objetivo. Entre elas, a administração de concentrações subinibitórias de antibióticos como o cefamandol, o cefuroxime (CARSENTI-ETESSE et al., 1992) e a dicloxacilina (CERCA et al., 2005), e biocidas como o bismuto tiol (DOMENICO et al., 2001); o uso de compostos furanona (BAVEJA et al., 2004 a e b), ferro (DEIGHTON & BORLAND, 1993), drogas antiinflamatórias (FARBER & WOLFF, 1992) e extratos bacterianos (GIRIDHAR et al., 1994); além do desenvolvimento de novas superfícies não aderentes dos dispositivos médicos (CHAPMAN et al., 2001) e a cobertura dos mesmos com diferentes compostos, incluindo a enzima dispersina B produzida pela bactéria Gram negativa *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (KAPLAN et al., 2004), antibióticos (MUNSON, HEARD & DOERN, 2004), e anti-sépticos como a prata (RAAD et al., 1996), o iodo (JANSEN et al., 1992) e a clorexidina-sulfadiazina de prata (RUPP et al., 2005) e. Entretanto, sabe-se que o uso de drogas antimicrobianas e de substâncias desinfetantes e anti-sépticas pode levar à seleção de bactérias resistentes aos mesmos, embora já tenha sido sugerido que o uso de agentes antimicrobianos em cateteres não leve diretamente ao surgimento de resistência (MUNSON, HEARD & DOERN, 2004).

*S. epidermidis* é o principal agente patogênico em infecções relacionadas a dispositivos médicos, sendo estas as principais infecções causadas pela bactéria. Entretanto, outros ECN como *S. haemolyticus*, *S. capitis*, *S. hominis* e *S. warneri* também estão envolvidos (KLOOS & BANNERMAN, 1994; CUNHA et al., 2002; VUONG & OTTO,

2002). Tais patógenos podem provocar infecções na circulação sanguínea, no trato urinário e no trato respiratório (CUNHA et al., 2002; CIMIOTTI et al., 2007).

Os ECN estão amplamente relacionados a bacteremias nosocomiais, revelando-se os principais patógenos em um estudo realizado no Brasil (CHANG et al., 2003). A taxa de morbidade dessas infecções está associada à permanência prolongada do paciente no hospital (CHANG et al., 2003). As bacteremias transitórias podem evoluir para a endocardite, osteomielite hematogênica e muitas infecções causadas por implantes de corpos estranhos (BRYAN, 1989). Apesar de *S. epidermidis* ser a espécie de ECN mais importante nestas infecções, outros ECN como *S. haemolyticus*, *S. capitis*, *S. hominis* e *S. warneri* e *S. lugdunensis* também podem causá-las (CIMIOTTI et al., 2007; NUNES et al., 2007).

Estafilococos coagulase-negativa da espécie *S. saprophyticus* usualmente são encontrados em pequenas populações transitórias em uma variedade de sítios do organismo, mas possuem propriedades de superfície que os permitem aderir facilmente às células do trato urogenital (COLLEEN et al., 1979). Bactérias desta espécie são capazes de aderir à laminina, uma proteína do tecido conectivo (WADSTRÖM, 1989). Isto as torna agentes patogênicos de trato urinário inferior em mulheres (WIDERSTRÖM et al., 2007). De modo semelhante aos *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* também produz um biofilme (HJELM & LUNDELL-EYHERDEN, 1991), o qual poderia ser uma importante fonte de infecção urinária.

Infecções no trato respiratório de crianças também podem ser causadas pelos ECN, especialmente por *S. epidermidis* (HALL et al., 1987; CUNHA et al., 2002). Os neonatos prematuros estão sob grande risco, pois muitas vezes requerem oxigenação e uso de ventilação mecânica, o que causa injúria ao órgão e torna o indivíduo mais susceptível a infecções (STOLL et al., 1996). As espécies *S. haemolyticus*, *S. lugdunensis*, *S. simulans*, *S. warneri* e *S. xyloso* já foram relacionadas a casos de pneumonia (CUNHA et al., 2002).

Espécies de ECN como *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* e *S. capitis* são também agentes causadores de meningite, principalmente aquelas que ocorrem após cirurgias neurológicas. *S. epidermidis* parece ser a espécie mais comum nessas infecções, seguida de *S. haemolyticus* (CHANG et al., 2007).

Infecções oftalmológicas como ceratite, conjuntivite ou endoftalmite têm sido causadas por *S. epidermidis*, *S. auricularis*, *S. haemolyticus*, *S. capitis*, *S. simulans*, *S. hominis*, *S. sciuris*, *S. cohnii* e *S. saprophyticus* (OLIVEIRA et al., 2007).

## 1.2 Susceptibilidade às Drogas Antimicrobianas

Embora a quantidade de antibióticos e quimioterápicos seja crescente no mercado mundial, muitas bactérias têm apresentado resistência a um ou a diversos antimicrobianos. Tal resistência poderia dever-se à formação de biofilme, dependendo da bactéria, mas também a outros fatores intrínsecos genéticos das bactérias. A falta ou a reduzida disponibilidade de programas específicos para o controle do desenvolvimento de resistência antimicrobiana também tem contribuído para a disseminação desta resistência.

Dentre os fatores que favoreceriam a resistência estão: a indicação inadequada da droga pelo médico, buscando a melhora rápida do paciente; a interrupção do tratamento pelo paciente; a indução ao consumo decorrente do *marketing* das indústrias farmacêuticas; a venda sem prescrição médica; e o uso de antimicrobianos em rações de animais.

A emergência da resistência a antimicrobianos em estafilococos é um problema sério, especialmente em hospitais, e que cresce no mundo inteiro (DE ALLORI et al., 2006; NAYAK et al., 2007), não poupando também indivíduos saudáveis na comunidade (SILVA et al., 2001; PALAZZO, ARAÚJO E DARINI, 2005).

Sabe-se que um grande número de isolados clínicos de ECN é resistente a vários agentes antimicrobianos, sendo chamados de multi-resistentes. A multi-resistência em isolados de ECN inclui resistência à penicilina, meticilina/oxacilina, eritromicina, clindamicina, gentamicina, quinolonas (AGVALD-ÖHMAN, LUND & EDLUND, 2004), tetraciclina, cloranfenicol e trimetoprim/sulfametoxazol (VILLARI, SARNATARO & IACUZIO, 2000), levando-se em consideração que neste último estudo as bactérias com susceptibilidade intermediária foram classificadas como resistentes.

A melhor opção no tratamento de infecções causadas por ECN são os beta-lactâmicos. Ainda que todos os derivados de penicilina e alguns outros beta-lactâmicos possam promover reações de hipersensibilidade (LOWY, 2005), são drogas que apresentam menor custo, boa atividade contra cocos Gram positivos e, principalmente, evitam o desenvolvimento de resistência a drogas mais potentes como a vancomicina, que é normalmente usada contra estafilococos multi-resistentes (ARCHER & POLKE, 2005; LOWY, 2005).

Os ECN resistentes a meticilina/oxacilina são microrganismos cuja importância como patógenos hospitalares aumentou em pacientes que requerem cuidados intensivos

(VILLARI, SARNATARO & IACUZIO, 2000; AGVALD-ÖHMAN, LUND & EDLUND, 2004).

Infelizmente, alta taxa de *S. epidermidis* e outras espécies de ECN meticilina-resistentes foi encontrada nos EUA, no Brasil e em outros países (MARSHALL et al., 1998; NUNES, 2000; AGVALD-ÖHMAN, LUND & EDLUND, 2004; OLIVEIRA et al., 2007; CHANG et al., 2007) e, portanto, outras opções de tratamento são necessárias para estas infecções. Recentemente, uma cefalosporina (LB 11058) foi desenvolvida e testada *in vitro*, mostrando ser bastante ativa para o tratamento de infecções causadas por ECN, especialmente aqueles resistentes à meticilina (SADER, JOHNSON & JONES, 2004). No Brasil foram encontrados 80% de ECN resistentes à oxacilina no período entre junho de 2006 e dezembro de 2007, em que dados de microrganismos isolados em diversos hospitais do país foram notificados à Rede de Resistência Microbiana (ANVISA, 2008).

Estudos indicam que os ECN apresentam um mecanismo de resistência aos beta-lactâmicos idêntico ao de *Staphylococcus aureus*, através da produção de uma proteína ligadora de penicilina de baixa afinidade para beta-lactâmicos (PBP2a), codificada pelo gene *mecA* (KLOOS & BANNERMAN, 1994; CHAMBERS, 1997). Este gene tem sido detectado freqüentemente em ECN isolados de diferentes tipos de infecções como bacteremias, meningite e infecções oftalmológicas (ANTUNES et al., 2007; CHANG et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2007).

A principal opção para o tratamento de infecções causadas por ECN meticilina-resistentes tem sido a vancomicina (ENDTZ et al., 1999). Entretanto, esses foram os primeiros organismos nos quais a aquisição de resistência aos glicopeptídeos foi reconhecida, estando principalmente relacionada com espécies de *S. haemolyticus* e *S. epidermidis* (BIAVASCO, VIGNAROLI & VARALDO, 2000). Isolados clínicos de *S. epidermidis* com reduzida susceptibilidade aos glicopeptídeos já foram detectadas no Brasil (DEL'ALAMO et al., 1999), na Europa (KRCMERY et al., 1996), nos Estados Unidos (SIERADZKI, VILLARI & TOMASZ, 1998) e no Japão (HIRAMATSU et al., 1997). Além disso, foi relatado o insucesso do uso clínico do glicopeptídeo teicoplanina no tratamento de infecções causadas pelos ECN, particularmente *S. haemolyticus* (WOODFORD et al., 1995).

A primeira ocorrência de cepas de *S. aureus* com susceptibilidade reduzida à vancomicina (CIM de 8 µg/mL) foi relatada no Japão em 1997, seguida de uma ocorrência nos EUA no mesmo ano (CDC, 1997 a e b). A susceptibilidade reduzida de ECN à

vancomicina tem sido encontrada no Brasil, de acordo com a classificação de Tenover e colaboradores (1998) e NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*, 2003), a qual determinou que os ECN, especialmente os resistentes à oxacilina, deveriam ser considerados com susceptibilidade reduzida à vancomicina se os valores das concentrações inibitórias mínimas (CIMs) fossem de 4 µg/mL até 8 µg/mL (TENOVER et al., 1998; DEL'ALAMO et al., 1999; NUNES, 2000). Esta classificação considerou bactérias com CIMs superiores ou iguais a 32 µg/mL resistentes à vancomicina e à teicoplanina. O aparecimento de bactérias com susceptibilidade reduzida aos glicopeptídeos não é completamente conhecido, mas o uso extensivo destas drogas poderia contribuir para a emergência destas bactérias (DEL'ALAMO et al., 1999). Em 2002, cepas de *S. aureus* resistentes à vancomicina foram descritas (CDC, 2002 a e b). No Brasil, o primeiro caso de ECN vancomicina-resistente foi reportado em 2005 (PALAZZO, ARAÚJO & DARINI, 2005).

Alguns estudos relacionam o aparecimento da resistência intermediária de estafilococos à vancomicina e/ou resistência à teicoplanina com isolados resistentes à oxacilina em pacientes sob tratamento prolongado com vancomicina (WOODFORD et al., 1995; HIRAMATSU et al., 1997; SIERADZKI et al., 1999; CDC, 2002 a e b). Contudo, isolados de *S. aureus* e ECN com susceptibilidade reduzida aos glicopeptídeos e sensíveis à oxacilina já foram descritos no Brasil (DEL'ALAMO et al., 1999).

Minociclina e trimetoprim/sulfametoxazol têm sido usados com frequência quando a vancomicina é contra-indicada (CHAMBERS, 1997) ou nos casos de insucesso do uso clínico dos glicopeptídeos teicoplanina e vancomicina (WOODFORD et al., 1995; HIRAMATSU et al., 1997). Quinopristin/dalfopristin, estreptograminas com boa penetração tecidual e boa atividade bactericida (RUBINSTEIN & BOMPART, 1997; LOWY, 2005), bem como a daptomicina têm sido eficazes para tratar estas infecções (LOWY, 2005). Embora já tenha sido descrita resistência ao linezolida, esta droga tem produzido bons resultados para os ECN, principalmente em casos de meningite, cujo local de infecção não permite boa penetração da vancomicina (KRUEGER et al., 2004; LOWY, 2005).

Combinações de antibióticos têm representado as opções terapêuticas contra infecções causadas por ECN, devido ao aumento do aparecimento de microrganismos resistentes a múltiplos antimicrobianos. Combinações de rifampicina ou aminoglicosídeos com outras drogas antimicrobianas têm sido utilizadas para o tratamento de infecções graves causadas por ECN, pois existe um alto risco de seleção de bactérias resistentes quando estas

drogas são usadas individualmente (HUEBNER & GOLDMANN, 1999). O uso combinado de antimicrobianos também é muito relevante porque amplifica o efeito dos mesmos, inclusive no tratamento de infecções associadas à formação de biofilmes na superfície de implantes e próteses (BRANDT et al., 1995; RAYMOND, VEDEL & BERGERET, 1996; FERRARA et al., 1997; SVENSSON, HANBERGER & NILSSON, 1997).

Os testes de susceptibilidade aos antimicrobianos descritos pelo CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*, 2008) são preocupantes, pois são métodos que apenas testam os antimicrobianos frente a células individuais. Como muitas bactérias, incluindo ECN e *S. aureus*, são capazes de formar biofilmes, análises de susceptibilidade das bactérias nos biofilmes deveriam ser realizadas, uma vez que o biofilme proporciona dificuldade no tratamento dessas infecções e, conseqüentemente, na melhora clínica do paciente (MONZÓN et al., 2002; CUNHA et al., 2002; CERCA et al., 2005).

### **1.3 Susceptibilidade aos Desinfetantes à Base de Compostos Quaternários de Amônio**

Anti-sépticos e desinfetantes baseados em compostos quaternários de amônio (QAC), como cloreto de benzalcônio, cloreto de cetilpiridinium, cetrimida, proceína e detizor, são usados freqüentemente em hospitais e em outras unidades de saúde, bem como na indústria alimentícia para prevenir a disseminação de patógenos. São agentes catiônicos de superfície com ação antimicrobiana os quais desnaturam proteínas, inativam enzimas e, conseqüentemente, causam inibição de reações metabólicas (como as de produção de energia), inibição do metabolismo devido à inibição enzimática e alteram a permeabilidade da membrana citoplasmática (MERIANOS, 2001).

Várias vantagens são encontradas nestes compostos quando comparados a outros biocidas. Dentre elas: o efeito não corrosivo, a baixa toxicidade e a alta atividade em superfícies (HUGO & RUSSEL, 1992; McDONNELL & RUSSEL, 1999). O amplo espectro de ação é outra característica marcante dos QAC, os quais são geralmente efetivos para bactérias Gram positivas, menos efetivos para bactérias Gram negativas, especialmente *P. aeruginosa*, além de serem ativos para alguns fungos e vírus sem envelope lipídico. Entretanto não possuem ação letal contra endósporos, micobactérias ou vírus hidrofílicos (ROMÃO, 1996).

Casos de resistência intrínseca e adquirida aos QAC têm sido descritos, principalmente entre espécies de bactérias Gram negativas (McDONNELL & RUSSELL, 1999). Um possível mecanismo de resistência intrínseca aos biocidas é encontrado quando a bactéria forma biofilme (McDONNELL & RUSSELL, 1999), o qual é também um determinante da resistência bacteriana às drogas antimicrobianas. A resistência adquirida aos biocidas pode ocorrer por mutação celular ou por aquisição de elementos genéticos como plasmídeos ou transposons (RUSSEL, 1998; McDONNELL & RUSSEL, 1999).

Bactérias Gram negativas, como a *P. aeruginosa*, são freqüentemente menos susceptíveis aos anti-sépticos e desinfetantes que bactérias Gram positivas. Isto parece ocorrer devido à presença de componentes na membrana externa dessas bactérias, incluindo o lipopolissacarídeo. A membrana externa está ausente nas bactérias Gram positivas (NIKAIDO & VAARA, 1985; VAARA, 1992; McDONNELL & RUSSEL, 1999; NIKAIDO, 2003). A adaptação e o crescimento da bactéria *P. aeruginosa* em QAC foram descritos no final da década de 60 (ADAIR, GEFTIC & GELZER, 1969). Atualmente, análises genéticas permitem a obtenção de informações mais precisas a respeito da resistência destas bactérias aos referidos compostos (ROMÃO et al., 2005). Em contrapartida, bactérias Gram positivas também podem apresentar resistência a diversos anti-sépticos e desinfetantes (McDONNELL & RUSSEL, 1999).

A resistência a anti-sépticos e desinfetantes codificada por plasmídeos em estafilococos resistentes a antimicrobianos tem merecido grande atenção nas últimas décadas (LITTLEJOHN et al., 1992; LEELAPORN et al., 1994; RUSSEL, 1997). Nos estafilococos e em outras bactérias, a resistência aos agentes desinfetantes pode ser causada pelo mecanismo de bomba de efluxo dependente de energia próton-motora, exercido por proteínas localizadas na membrana plasmática da bactéria, as quais promovem o efluxo da droga (LITTLEJOHN et al., 1992; VAARA, 1992; NIES & SILVER, 1995).

Os genes que codificam proteínas exportadoras de várias drogas nos estafilococos podem ser divididos em duas famílias com base na homologia e nas propriedades fenotípicas: a *Major Facilitator Superfamily* (MFS), representada pelos genes *qacA/qacB* e a *Small Multidrug Resistance Family* (SMR), representada pelos genes *qacC* ou *smr* (LITTLEJOHN et al., 1992; PAULSEN et al., 1996), *qacH* e *qacG* (HEIR, SUNDHEIM & HOLCK, 1998 e 1999b). Membros da família MFS conferem o fenótipo de resistência mais amplo que membros da família SMR (LEELAPORN et al., 1994). Os genes *qacA* e *qacB* são muito

semelhantes, havendo apenas diferença em sete pares de bases entre os dois (MAYER et al., 2001).

A resistência de *S. aureus* e ECN aos QAC foi primeiramente detectada em isolados clínicos (AL-MASAUDI, DAY & RUSSEL, 1988; LITTLEJOHN et al., 1992; LEELAPORN et al., 1994). Mais tarde, análises de isolados de indústrias alimentícias também detectaram ECN resistentes a QAC apresentando os genes *qacA*, *qacC* (HEIR, SUNDHEIM & HOLCK, 1999a), *qacG* (HEIR, SUNDHEIM & HOLCK, 1999b) e *qacH* (HEIR, SUNDHEIM & HOLCK, 1998). Em 2008, os genes *qacG*, *qacH* e *qacJ* foram detectados em isolados clínicos de *S. haemolyticus* (CORREA et al., 2008). Existem evidências de que *S. aureus* e estafilococos coagulase-negativa apresentam um conjunto comum de determinantes de resistência (LEELAPORN et al., 1994).

A correlação entre resistência a desinfetantes, anti-sépticos e drogas antimicrobianas já havia sido proposta em 1999 em um estudo que verificou uma relação entre a presença dos genes *qacA/qacB* e um alto nível de resistência a antimicrobianos tais como penicilina G e a ampicilina (HEIR, SUNDHEIM & HOLK, 1999a).

A presença dos genes de resistência em elementos genéticos móveis tais como plasmídeos e transposons pode levar à disseminação epidêmica da resistência entre espécies (ANTHONISEN et al., 2002). Isto pode ser confirmado por estudos que demonstram a presença de gene *qac* localizado no mesmo plasmídeo que genes de resistência a drogas antimicrobianas em estafilococos (ANTHONISEN et al., 2002; SIDHU et al., 2002). A emergência destes microrganismos com resistência combinada a desinfetantes e a drogas antimicrobianas tem sido motivo de grande preocupação tanto para a indústria alimentícia quanto para os hospitais, uma vez que a presença de genes *qac* em estafilococos pode levar à seleção de bactérias resistentes a drogas antimicrobianas e vice-versa durante desinfecção ou antibioticoterapia em hospitais, ou durante desinfecção em indústrias alimentícias (SIDHU et al., 2002). A co-resistência entre diferentes desinfetantes e drogas antimicrobianas foi encontrada também em bactérias Gram negativas (STICKLER & THOMAS, 1980), mas o mesmo não foi observado em um estudo mais recente sobre *P. aeruginosa* (ROMÃO et al., 2005).

O aparecimento de isolados de *S. aureus* resistentes a cloreto de benzalcônio já foi demonstrado (AL-MASAUDI, DAY & RUSSEL, 1988). Um estudo verificou que o uso de concentrações subletais deste produto poderia levar ao desenvolvimento de resistência cruzada e induziria o efluxo do desinfetante pelos estafilococos (HEIR, SUNDHEIM &

HOLCK, 1999b). Isto indica que é essencial o controle da concentração adequada do produto diluído, do tempo de contato do produto e da limpeza da superfície anterior à desinfecção, o que certamente dependeria de um excelente treinamento (ROMÃO, 1996; COZAD & JONES, 2003). Portanto, deve haver não só uma preocupação com o uso indiscriminado e impróprio das drogas antimicrobianas, mas também com o uso incorreto de anti-sépticos e de desinfetantes, já que a ausência destas atitudes impõe uma forte pressão seletiva, gerando um número cada vez maior de bactérias resistentes a tais agentes.

#### **1.4 Métodos de Avaliação da Resistência aos Antimicrobianos**

Freqüentemente, a resistência das bactérias é determinada fenotipicamente pela concentração inibitória mínima (CIM), definida como sendo a menor concentração do desinfetante que não forneça crescimento visível (HAMMOND, MORGAN & RUSSEL, 1987; BRÖZEL & CLOETE, 1991; SUNDHEIM, HAGTVEDT & DAINTRY, 1992). Apesar disso, a detecção fenotípica da resistência pelo método da Diluição de Uso também pode ser empregada com o objetivo de encontrar resultados complementares (BELOIAN, 1990). Estes procedimentos têm sido utilizados para avaliar a susceptibilidade de *S. aureus* (MIYAZAKI, 2006) e *P. aeruginosa* (ROMÃO et al., 2005) a um desinfetante quaternário de amônio.

Métodos genotípicos são hoje padrão-ouro para a detecção da resistência dos microrganismos aos antimicrobianos. A técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR, *Polimerase Chain Reaction*) consiste na detecção de um gene específico que codifica a resistência a algum agente antimicrobiano, seja ele um gene de resistência a anti-sépticos, desinfetantes ou drogas antimicrobianas (ANTUNES et al., 2007; MARTINS & CUNHA, 2007).

Podem existir variações genéticas mesmo dentro de uma única espécie, incluindo genes que codificam características de resistência a drogas antimicrobianas e a biocidas. A técnica de eletroforese em campo pulsado (PFGE, *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*) se tornou um importante método, considerado padrão-ouro, para a tipagem molecular e caracterização de clones bacterianos, principalmente para os estafilococos (MIYAZAKI, 2006; SAIDA et al., 2006). O PFGE tem sido utilizado para estudar a clonalidade de *S. epidermidis* (SILVA et al., 2001). Esta técnica envolve a introdução dos microrganismos em agarose, purificação do

DNA e tratamento com uma enzima de restrição, uma endonuclease (TENOVER et al., 1995). A endonuclease *SmaI* surgiu como a mais apropriada enzima para a técnica PFGE em estafilococos, pois gera um número adequado de fragmentos de DNA claramente separados (LINA et al., 1992). Os fragmentos de DNA são submetidos a uma eletroforese em campo pulsado em gel de agarose e, em seguida, são comparados entre si para a determinação de uma relação entre eles (TENOVER et al., 1995). Tenover e colaboradores (1995) propuseram um manual para a interpretação dos resultados do PFGE, facilitando o trabalho dos pesquisadores. Mattos e colaboradores (2003), utilizando PFGE, verificaram uma considerável diversidade genômica entre isolados de *S. epidermidis* coletados de pacientes em diálise peritoneal contínua em ambulatório.

### **1.5 Controle das Infecções e Vigilância Sanitária**

Atualmente, mais atenção tem sido dada às medidas preventivas para reduzir a exposição dos pacientes aos microrganismos (SALYERS & WHITT, 1994), uma vez que os procedimentos e técnicas praticados pelos profissionais de saúde que assistem os pacientes estão relacionados diretamente à transmissão de microrganismos causadores de infecções (EMORI & GAYNES, 1993).

Em 6 de janeiro de 1997, foi sancionada a Lei nº 9431, a qual dispõe sobre a obrigatoriedade da manutenção pelos hospitais do Brasil de um programa de controle de infecções hospitalares, que consiste em um conjunto de ações desenvolvidas deliberada e sistematicamente com vistas à redução máxima possível da incidência e da gravidade das infecções hospitalares (BRASIL, 1997). Apesar da existência da lei, nem todos os hospitais do país possuem estruturas de controle de infecções hospitalares e programas preventivos.

Em 1999 criou-se, através da Lei nº 9782, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) cuja função é monitorar o cumprimento dos direitos da população à saúde, já que vigilância sanitária constitui práticas sanitárias de promoção e proteção à saúde, além de práticas de regulação do mercado de bens e serviços de interesse da saúde (BRASIL, 1999; COSTA & ROSENFELD, 2001).

Recentemente, a ANVISA tem desenvolvido um projeto de “Monitoramento e Prevenção da Resistência Antimicrobiana em Serviços de Saúde”. Neste projeto, foram realizadas diversas atividades. Entre elas: a capacitação dos profissionais de laboratório das instituições hospitalares componentes da Rede; seminários de gerenciamento de informação sobre resistência bacteriana; curso à distância sobre “Medidas de Prevenção e Controle da Resistência Microbiana e Programa de Uso Racional de Antimicrobianos”; a notificação dos dados referentes à resistência microbiana que são divulgados por meio de um boletim eletrônico; apoio aos eventos científicos nas áreas relacionadas com o tema; cooperação internacional com a Rede de Monitoramento da Resistência da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) e da Organização Mundial da Saúde (OMS); publicação de manual técnico sobre interpretação de resultados microbiológicos para auxiliar na prescrição racional de antimicrobianos; realização de seminários nacionais com periodicidade para discussão da emergência e controle da disseminação da resistência microbiana no país; realização de estudos por meio de parcerias com as instituições (ANVISA, 2008).

A Rede de Resistência Microbiana divulgou um relatório sobre a análise do perfil de susceptibilidade dos microrganismos isolados de junho de 2006 a junho de 2007 que tinham sido notificados à Coordenação Nacional da Rede de Resistência Microbiana até dezembro de 2007. A coleta dos dados foi realizada mensalmente. Apenas 81 hospitais dentre os 114 cadastrados na Rede enviaram seus dados. Alguns deles não enviaram seus dados referentes a todos os meses incluídos no relatório. Devido a estes problemas, embora sejam dados atuais sobre a resistência microbiana no país, os dados informados não são completamente confiáveis e, por isso, cada hospital deveria monitorar e conhecer o perfil de susceptibilidade dos microrganismos identificados na própria instituição, de modo que seja possível tomar as decisões terapêuticas e medidas de controle e prevenção da resistência microbiana. Além disso, alguns hospitais não seguiram as recomendações do CLSI a respeito dos antimicrobianos que deveriam ser testados, havendo muitos casos de microrganismos que não foram testados para todos os antimicrobianos necessários (ANVISA, 2008).

Embora esta Rede ainda esteja em fase de aprimoramento, os dados por ela divulgados são valiosos para alertar os profissionais da saúde e a população sobre a necessidade de adoção de medidas de prevenção e controle da resistência dos microrganismos às drogas antimicrobianas. Entretanto, para o sucesso do projeto, os gestores dos hospitais assim como a comunidade médica precisam se conscientizar e participar ativamente deste trabalho.

Esforços para diminuir o risco de transmissão de infecções incluem programas nos quais estas infecções têm um papel crucial. As superfícies dos aparelhos médicos hospitalares, os equipamentos, os móveis e as áreas devem ser desinfetados por agentes desinfetantes apropriados. Alguns trabalhos relatam que o contato direto entre o paciente e o corpo de profissionais de um hospital é a principal via de transmissão microbiana (BAUER et al., 1990; PEARCE et al., 1998). Uma das medidas preventivas que deve ser aplicada para evitar a ocorrência de infecções hospitalares refere-se à utilização de anti-sépticos e desinfetantes. Os compostos quaternários de amônio são amplamente empregados e o seu uso indiscriminado poderia contribuir com a disseminação de microrganismos resistentes aos biocidas (LANGSRUD & SUNDHEIN, 1997).

Portanto, é necessário avaliar a susceptibilidade dos microrganismos presentes nos hospitais aos anti-sépticos e desinfetantes usados normalmente nesses ambientes. A investigação de diferenças constitucionais dos clones dentro de uma mesma espécie pode levar a esclarecimentos sobre fatores de virulência dos microrganismos como genes de resistência a drogas antimicrobianas e a desinfetantes. Assim, é possível estabelecer o biocida mais apropriado para cada situação, além da concentração necessária do biocida para impedir o aumento do número de casos de infecções hospitalares causadas principalmente por microrganismos resistentes a drogas antimicrobianas e/ou biocidas.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivos Gerais

As infecções hospitalares constituem um grave problema para a saúde pública, envolvendo diretamente os profissionais de saúde que podem tornar-se portadores de microrganismos patogênicos, inclusive aqueles que carregam genes de resistência a drogas antimicrobianas, anti-sépticos e desinfetantes. Para evitar a transmissão destes patógenos é de fundamental importância o controle destas infecções.

O Setor de Saneantes do Departamento de Microbiologia do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/Fiocruz tem desenvolvido estudos que envolvem as espécies *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. Contudo, existe a necessidade de aprofundar nossos conhecimentos referentes a um grupo de patógenos envolvidos em infecções hospitalares: os estafilococos coagulase-negativa. Nesse trabalho realizamos um amplo estudo do perfil de resistência a drogas antimicrobianas e a um biocida amplamente usado no ambiente hospitalar em isolados clínicos oriundos de um hospital público do Rio de Janeiro. Esses isolados clínicos também foram caracterizados em relação à presença de genes de resistência ao biocida e quanto ao perfil clonal apresentado por eles.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Identificar os isolados clínicos oriundos de um hospital público do Estado do Rio de Janeiro;
- Realizar testes de susceptibilidade às drogas antimicrobianas nos isolados clínicos;
- Verificar a existência de genes de resistência a um desinfetante à base de quaternário de amônio;
- Avaliar a presença do gene de resistência à meticilina nos isolados clínicos;
- Realizar um estudo comparativo entre o perfil de resistência ao desinfetante através das técnicas da Concentração Inibitória Mínima e da Diluição de Uso;
- Avaliar a diversidade genética de isolados clínicos identificados como *Staphylococcus epidermidis*, através da análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico por eletroforese em campo pulsado (PFGE).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Microrganismos

Os 63 isolados clínicos de estafilococos coagulase-negativa foram oriundos de um hospital público do Estado do Rio de Janeiro no período compreendido entre 2003 a 2005. Foram utilizadas como controles dos procedimentos realizados neste estudo as seguintes cepas de microrganismos:

- *S. aureus* INCQS n° 00381 (ATCC 29213) e *Enterococcus faecalis* INCQS n° 00234 (ATCC 29212) → controles do lote do cartão GPS-105 usado no teste de susceptibilidade aos antimicrobianos.
- *S. aureus* INCQS n° 00039 (ATCC 6538) → cepa utilizada em ensaios de avaliação da atividade antimicrobiana de desinfetantes (BELOIAN, 1990).
- *S. aureus* INCQS n° 00306 (ATCC 33591) → controle positivo nos experimentos de verificação da presença do gene *mecA* (MEHROTRA, WANG & JOHNSON, 2000).
- *S. aureus* INCQS n° 00381 (ATCC 29213) e INCQS n° 00306 (ATCC 33591) → controles nos testes de triagem em ágar contendo oxacilina (CLSI, 2006a)
- *S. aureus* INCQS n° 00015 (ATCC 25923) → controle dos ensaios de teste de difusão em disco contendo cefoxitina (CLSI, 2008).
- *S. aureus* 7644 → cepa bacteriana usada como controle positivo na PCR para o gene *qacA/B* (Gene Bank n° EF418547), gentilmente cedida pela Dr<sup>a</sup> Neide Hiromi Tokumaru Miyazaki.

##### 3.1.1 Identificação dos Isolados Clínicos

As colônias foram inicialmente submetidas à coloração de Gram e à avaliação da presença da enzima catalase. A seguir, foi realizada a prova da coagulase e as espécies foram determinadas através do método automatizado Vitek (cartão GPI; bioMérieux, France) e pelo kit APIStaph (bioMérieux). Os testes incluídos no kit APIStaph são: fermentação de açúcares (glicose, frutose, manose, maltose, lactose, trealose, manitol, xilitol, melbiose, rafinose, xilose, sacarose,  $\alpha$ -metil-D-glucosídeo, N-acetil-glucosamina), produção da arginina

dihidrolase, produção da urease, redução do nitrato a nitrito, produção da fosfatase alcalina e teste de Voges-Proskauer.

### **3.1.2 Manutenção dos Isolados Clínicos**

As culturas foram estocadas em *Trypticase Soy Broth* (TSB) acrescido de glicerol a 10% e mantidas a temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  e  $-70^{\circ}\text{C}$ .

## **3.2 Susceptibilidade às Drogas Antimicrobianas**

### **3.2.1 Teste de Susceptibilidade aos Antimicrobianos**

Os testes foram realizados através do sistema automatizado Vitek usando-se o cartão GPS-105 (bioMérieux), de acordo com as instruções do fabricante. O cartão contém os seguintes antimicrobianos: AMP-ampicilina, SAM-ampicilina/sulbactam, CFZ-cefazolina, CIP-ciprofloxacina, CLI-clindamicina, ERY-eritromicina, GEN-gentamicina, NIT-nitrofurantoína, OXA-oxacilina, PEN-penicilina G, RIF-rifampicina, TET-tetraciclina, SXT-sulfametoxazol/trimetoprim, VAN-vancomicina. O inóculo bacteriano inserido em cada cartão correspondeu à turvação de 0,5 da escala de McFarland. A produção da enzima beta-lactamase (BLA) foi verificada por teste contido no mesmo cartão do sistema Vitek de verificação de susceptibilidade. Os microrganismos usados como controles foram as cepas de *S. aureus* ATCC 29213 e de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

### **3.2.2 Teste de Triagem em Ágar Contendo Oxacilina**

Os testes foram baseados na técnica descrita pelo CLSI (2006a). O ágar Mueller-Hinton foi suplementado com 6  $\mu\text{g}$  de oxacilina/mL e 4% de NaCl. O inóculo, padronizado de acordo com a turvação da solução padrão de McFarland 0,5, foi espalhado com um *swab* sobre a superfície do meio de cultura e a placa foi incubada por 24 h a  $35^{\circ}\text{C}$ . Os estafilococos coagulase-negativa metecilina-resistentes apresentam crescimento nessas placas. A presença de mais de uma colônia ou um tênue filme de crescimento indicou a presença de resistência a oxacilina. O crescimento bacteriano foi submetido ao teste de Gram e ao teste da catalase

como forma de comprovação de que não se tratava de um microrganismo contaminante. As cepas de *S. aureus* ATCC 29213 (sensível à oxacilina) e ATCC 33591 (resistente à oxacilina) foram usadas como controles negativo e positivo, respectivamente.

### **3.2.3 Teste de Difusão em Disco Contendo Cefoxitina**

Preparou-se uma suspensão de colônias bacterianas isoladas, a partir de uma placa de *Trypticase Soy Agar* (TSA) de 18 a 24 h, em solução salina (0,85%). A suspensão foi ajustada correspondendo à solução padrão de McFarland 0,5. O teste foi realizado paralelamente para os isolados clínicos obtidos no ambiente hospitalar e para a cepa de *S. aureus* ATCC 25923. O inóculo bacteriano foi semeado em placas de Petri contendo ágar Müller-Hinton. Um disco de papel contendo 30 µg de cefoxitina foi aplicado na superfície da placa semeada com a bactéria. As placas foram incubadas a 35° C durante 16 a 18 h e os halos de inibição do crescimento microbiano foram determinados. Os microrganismos foram considerados resistentes quando os diâmetros dos halos de inibição foram menores ou iguais a 24 milímetros e sensíveis quando os diâmetros dos halos de inibição foram maiores ou iguais a 25 milímetros (CLSI, 2008). Aqueles isolados clínicos que apresentaram halos de inibição entre 24 e 25 foram classificados como tendo resistência intermediária. Quando encontramos colônias bacterianas no interior do halo de inibição, o teste foi repetido com uma cultura pura de uma colônia bacteriana, isolada a partir da placa de cultura primária.

## **3.3 Verificação da Presença dos Genes *qacA/B* e *mecA***

### **3.3.1 Extração do Ácido Desoxirribonucléico Total**

Os isolados clínicos foram semeados em caldo TSB e mantidos sob agitação a 200 rpm por 24 h a 37° C, quando 1000 µL foram transferidos para um microtubo o qual foi centrifugado. O sedimento foi suspenso no tampão de lise (20 mM de Tris, 2 mM de EDTA tetrassódico e 1,2% de Triton X 100) contendo 36 µL de lisozima (50 mg/mL) para a lise das estruturas externas bacterianas. O DNA genômico foi extraído utilizando o kit DNeasy Tissue Kit (Qiagen, Inc, Valencia, CA).

### 3.3.2 Reação em Cadeia da Polimerase

Para a técnica da PCR (*Polimerase Chain Reaction*) foram usados oligonucleotídeos (*primers*) específicos para amplificar os genes *qacA/B* e *mecA* no DNA total. O aparelho utilizado para a realização das reações foi o termociclador DNA PTC-200-Peltier Thermal Cycler (MJ Research, Massachusetts, EUA).

Os *primers* usados para evidenciar os genes *qacA/B* foram *qacA/B-R* (*reverse*) CTATGGCAATAGGAGATATGGTGT, *qacA/B-F* (*foward*) CCACTACAGATTCTTCAGCTACATG, cujo produto da PCR tem 417 pares de bases (MAYER et al., 2001). Os *primers mecA-R* ACTGCTATCCACCCTCAAAC; *mecA-F* CTGGTGAAGTTGTAATCTGG foram utilizados para a detecção do gene *mecA*, cujo produto da PCR tem 163 pares de bases (MEHROTRA, WANG & JOHNSON, 2000).

Para a detecção do gene *qacA/B*, preparou-se uma mistura de reação com 25 µL contendo 5 µL de DNA genômico purificado, 1 pmol do par de *primers qacA/B*, 0,2 mM de dNTP, 0,05 U de Taq DNA polimerase (Platinum; Invitrogen, EUA) e 2,5 µL de tampão 10X contendo 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>. A amplificação do gene *qacA/B* foi realizada de acordo com o seguinte programa: 95° C por 2 min, seguido de 35 ciclos a 94° C por 2 min, 57° C por 2 min, 72° C por 1min e 72° C por 7 min (MIYAZAKI et al., 2007).

Para o gene *mecA* preparou-se uma mistura com 25 µL de volume final contendo 5 µL de DNA genômico purificado, 1 pmol do par de *primers mecA*, 0,2 mM de dNTP, 0,02 U de Taq DNA polimerase (Platinum; Invitrogen) e 2,5 µL de tampão 10X contendo 0,8 mM de MgCl<sub>2</sub>. O programa empregado para a amplificação do gene *mecA* foi: 95° C por 2 min, seguido de 35 ciclos a 94° C por 1 min, 62° C por 1 min, 72° C por 2 min e 72° C por 10 min (MIYAZAKI et al., 2007).

O produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1,5% em TBE 1X, a 90 V por 2 h. Os fragmentos amplificados foram visualizados em transiluminador de luz ultravioleta após o tratamento do gel com brometo de etídio a 1%.

### 3.4 Seqüenciamento genético

#### 3.4.1 Purificação do produto da PCR

A técnica descrita por Baio (2007) foi aplicada aos isolados clínicos 6523/4, 2695/3 e 7249/4. Foram adicionados 4 volumes de *binding buffer* diluído com 172  $\mu$ L de etanol ao produto da PCR. Após centrifugação 11000 rpm por 1 min, o filtrado foi descartado e adicionou-se 650  $\mu$ L de *wash buffer* diluído com etanol. O material foi centrifugado novamente a 11000 rpm/1 min e o filtrado foi mais uma vez descartado. Outra centrifugação foi realizada nas mesmas condições anteriores e o material foi colocado em uma coluna de purificação em um novo tubo. Um volume de 50  $\mu$ L de água milli-Q esterilizada foi acrescentado, o material foi deixado em repouso por 50 min e colocado no *heat block* a 50° C por 3 min. Posteriormente, realizou-se uma centrifugação a 11000 rpm/1 min.

#### 3.4.2 Determinação das Seqüências Nucleotídicas

Os produtos obtidos pela PCR foram purificados (Invitrogen; PureLink PCR purification Kit) e utilizados como molde de DNA para a reação de seqüenciamento de suas duas fitas com o sistema comercial (BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit; Applied Biosystems) conforme as recomendações do fabricante. Posteriormente, os produtos desta reação foram precipitados com 80  $\mu$ L de uma solução com 75% de isopropanol, centrifugados por 45 min a 4000 rpm a 21°C e o sobrenadante desprezado pela inversão cuidadosa da placa em papel de filtro. A placa foi invertida sobre outro papel de filtro, centrifugada por 1 min a 900 rpm a 21° C e mantida em estufa a 75° C por 5 min. Os sedimentos foram ressuspensos em 10  $\mu$ L de formamida, centrifugados por 1 minuto a 900 rpm a 21° C, incubados por 5 min a 95° C e resfriados imediatamente em banho de gelo.

Após a corrida no seqüenciador (ABI PRISM 3100; Applied Biosystems DNA Sequencer), as seqüências nucleotídicas foram analisadas, editadas e comparadas à uma seqüência depositada no banco de seqüências GenBank, cujo número de acesso é X56628, correspondente ao gene *qacA/B*.

### **3.5 Desinfetante**

Foi utilizado um desinfetante hospitalar à base de quaternário de amônio contendo cloreto de dimetil benzil amônio a 50%. Foi realizada uma análise de teor do tensoativo catiônico deste produto pelos tecnologistas do Setor de Saneantes do Departamento de Química do INCQS segundo procedimento preconizado pelo POP INCQS nº 65.3110.014 (MANUAL DA QUALIDADE, 2005).

### **3.6 Atividades do Desinfetante**

#### **3.6.1 Concentração Inibitória Mínima do Desinfetante**

A determinação das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) do desinfetante à base de quaternário de amônio foi realizada segundo Al-Masaudi, Day e Russel (1991), com algumas modificações. Os isolados clínicos e a cepa de referência de *S. aureus* foram cultivados em caldo TSB e um inóculo de 2 µL (cerca de  $2 \times 10^6$  UFC/mL) foi obtido a partir de uma cultura incubada por 24 h a 37° C. As CIMs foram determinadas pela adição do desinfetante em intervalos de 1 ppm/10 mL, variando de 1 a 10 ppm/10 mL ou em intervalos de 0,1 ppm/10 mL, variando de 0,1 a 1 ppm. Após a incubação por 24 h a 37° C, encontrou-se a CIM, a qual é definida como a menor concentração do desinfetante que não forneça crescimento microbiano visível.

#### **3.6.2 Técnica da Diluição de Uso**

A atividade antimicrobiana do desinfetante foi também avaliada pelo Método da Diluição de Uso da Association of Official Analytical Chemists - AOAC (BELOIAN, 1990), conforme o POP INCQS nº 65.3210.007 (MANUAL DA QUALIDADE, 2006). Três repiques consecutivos de 24 h incubados a 37° C foram realizados sendo o 1° a partir da cultura-estoque. Um 4° repique consecutivo de 48 h incubado a 37° C foi usado para contaminar os cilindros de aço inoxidável durante 15 min. Esses cilindros foram retirados e dispostos verticalmente em placas de Petri forradas com papel de filtro em condições assépticas e incubados a 37°C por 40 min. Cada um dos cilindros foi transferido para tubos contendo 10 mL do desinfetante, na diluição recomendada pelo fabricante, a temperatura de 20° C durante

10 min. Após esse tempo de contato, foram transferidos para os tubos contendo 10 mL de caldo Lethen (caldo nutriente com lecitina e polissorbato 80). Passados 10 min, foram novamente transferidos para tubos contendo 10 mL do mesmo meio de cultura e incubados a 37° C por 48 h. Esse procedimento foi realizado utilizando-se 60 cilindros de aço inoxidável. O controle da resistência do microrganismo foi realizado frente às soluções de fenol 1:60 e 1:70, preparadas a partir de uma solução de fenol a 5%, em tempos de contato de 5, 10 e 15 min. Foram realizados também os seguintes controles: viabilidade do meio de cultura, esterilidade do meio de cultura, esterilidade da água destilada, esterilidade dos lotes de pipeta e esterilidade dos cilindros carreadores. *S. aureus* INCQS nº 00039 (ATCC 6538) foi usado como cepa de referência nestes ensaios.

### **3.7 Determinação do Perfil Clonal dos Isolados Clínicos**

#### **3.7.1 Preparação do DNA Cromossômico**

Os isolados clínicos identificados como *Staphylococcus epidermidis* foram semeados e incubados em TSB por 18 a 24 h a 37° C sob agitação a 200 rpm. Alíquotas de 250 µL foram centrifugadas a 10000 rpm durante 5 minutos a 4° C e lavadas com tampão PIV (1 M de Tris, pH 8,0; 2 M de NaCl). Os sedimentos foram ressuspensos em 200 µL de tampão PIV, sendo que posteriormente foram adicionados 200 µL de agarose de baixo ponto de geleificação a 1,5%. Alíquotas de 20 µL desta mistura foram dispostas em lâminas de vidro cobertas com parafilme e sobrepostas com uma lâmina coberta com o mesmo material. Os discos obtidos a partir deste procedimento foram submetidos a um tratamento enzimático.

#### **3.7.2 Tratamento Enzimático dos Discos**

Os microrganismos presentes nos discos de agarose foram lisados em tampão de lise contendo 6,0 mM de Tris, 0,1 M de EDTA, 1,0 M de NaCl, 0,05 mg de RNase e 0,08 mg de lisostafina durante 4 horas a 37° C. Posteriormente, a solução de lise foi retirada e os discos foram tratados com 1,0 mL de proteinase K (1,0 mg/mL) e incubados a 50° C por 18 h sob leve agitação. Após esse tempo, os discos foram exaustivamente lavados e estocados em 5 mL

de tampão TE (10 mM de Tris-HCl, pH 7,5; 10 mM de EDTA) sob refrigeração a 4° C até o momento da reação com a endonuclease de restrição (DE LENCASTRE et al., 1991).

### 3.7.3 Análise do Perfil de Fragmentação pela Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE)

Três discos de cada isolado clínico foram incubados por 20 min a temperatura ambiente em tampão *Sma* I (6,0 mM de Tris, 100 mM de KCl, 6,0 mM de MgCl<sub>2</sub> contendo 2-mercapto-etanol. Após este intervalo de tempo, o tampão foi removido. Em seguida, os discos foram tratados com 40 µL do tampão *Sma* I acrescido de soro albumina bovina e 8 U da enzima de restrição *Sma* I. A reação foi incubada a 25°C por 18 h para que a digestão enzimática do DNA ocorresse. Um disco correspondente a cada isolado clínico foi posicionado no gel de agarose a 1% e submetido à eletroforese em campo pulsado (PFGE, *Pulsed-field gel electrophoresis*), utilizando-se o aparelho CHEF-DR III (BioRad, Richmond, USA), sob as seguintes condições: pulso inicial de 1 s, pulso final de 30 s, tempo de corrida de 23 h. A voltagem foi de 6V/cm e a temperatura foi mantida constante a 11,3°C. O gel foi tratado com brometo de etídio a 1% e os fragmentos foram visualizados em transiluminador de luz ultravioleta (TEIXEIRA et al., 1995). O perfil de fragmentação foi analisado através da observação visual de acordo com o critério de Tenover e colaboradores (1995) e do *software* Bionumerics Version 2.0 (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica) com a aplicação do coeficiente de Dice, a partir do qual foi gerado um dendrograma. Para a definição dos tipos clonais foi selecionado um coeficiente de similaridade de 83%, além da análise comparativa entre os fragmentos correspondentes a cada isolado, onde foram considerados indistinguíveis os isolados que não apresentaram nenhum fragmento diferente, proximamente relacionados aqueles que tiveram diferenças de 2 a 3 fragmentos e possivelmente relacionados aqueles que apresentaram 4 a 6 fragmentos de DNA diferentes. Os isolados que apresentaram 7 ou mais fragmentos desiguais foram considerados diferentes. A cada tipo clonal foi atribuída uma letra do alfabeto e a identificação dos subtipos foi realizada pela composição da letra do alfabeto correspondente ao tipo clonal e diferentes numerais cardinais.

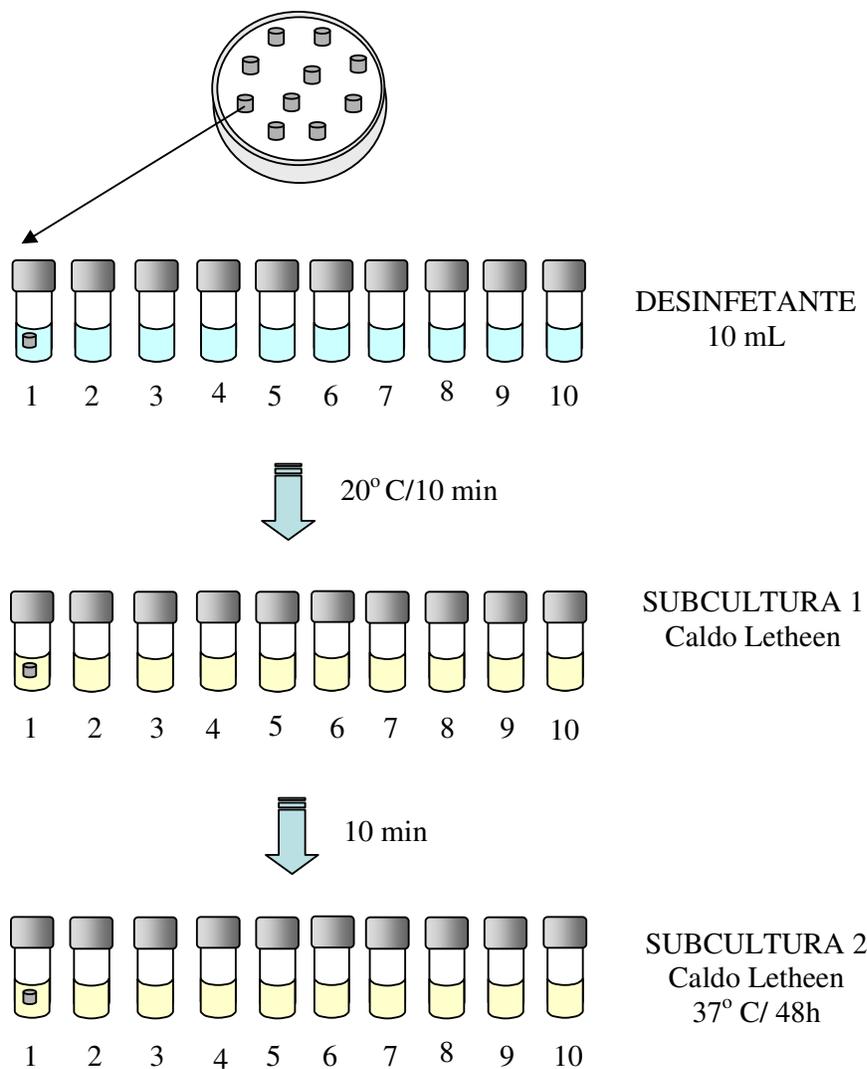


FIGURA 2 - Esquema do Método da Diluição do Uso

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Identificação dos Isolados Clínicos

Conforme mostrado no QUADRO 1, dentre os 63 isolados clínicos analisados, foram identificadas as seguintes espécies de estafilococos coagulase-negativa através dos testes de Gram, catalase, coagulase e pelo método automatizado Vitek ou pelo APIStaph: *S. epidermidis* (46; 73,01%), *S. haemolyticus* (8; 12,69%), *S. simulans* (2) *S. hominis* (1), *S. xylosus* (1), *S. caprae* (1), *S. capitis* (1), *S. auricularis* (1), *S. chromogenes* (1). Um único isolado não pôde ser identificado pelos métodos de identificação empregados (7470/5).

A maioria dos isolados clínicos, independentemente da espécie, obtidos dos espécimes clínicos foram oriundos do sangue dos pacientes (33; 52,38%). A principal espécie isolada a partir da circulação sanguínea foi *S. epidermidis* (25; 75,75%). O segundo espécime clínico mais numeroso foi a ponta de cateter intravascular (8; 12,69%). A origem dos isolados clínicos pode ser observada no QUADRO 10.

### 4.2 Teste de Susceptibilidade aos Antimicrobianos

Multi-resistência às drogas antimicrobianas foi encontrada com frequência entre os isolados clínicos de estafilococos coagulase-negativa. Somente dezenove isolados (30,15%) apresentaram resistência a seis ou a menos de seis antimicrobianos, incluindo aqueles que não apresentaram resistência a qualquer antimicrobiano, independentemente de haver resistência intermediária a outra droga. Dentre esses, 10 eram *S. epidermidis*, 5 eram *S. haemolyticus*, 1 *S. capitis*, 1 *S. hominis*, 1 *S. caprae* e 1 que não foi identificado. Apenas seis isolados clínicos apresentaram resistência a dois ou a menos de dois antimicrobianos, sendo 2 *S. epidermidis*, 2 *S. haemolyticus*, 1 *S. capitis* e 1 *S. caprae*. Todos os isolados clínicos restantes tiveram resistência à pelo menos sete antimicrobianos, sendo 35 *S. epidermidis*, 3 *S. haemolyticus*, 2 *S. simulans* e 1 *S. xylosus*, 1 *S. auricularis* e 1 *S. chromogenes* (QUADROS 2, 3 e 4). Dois *S. epidermidis* foram resistentes a seis drogas e tiveram resistência intermediária à gentamicina.

Como mostrado no QUADRO 4, um mesmo perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos foi encontrado para as espécies de *S. epidermidis* (5), *S. haemolyticus* (1), *S. simulans* (1) e *S. xylosus* (1).

Um único isolado entre os 63 avaliados exibiu susceptibilidade reduzida à vancomicina e resistência à oxacilina, com CIM de 8 µg/mL para a vancomicina, segundo os limites sugeridos por Tenover e colaboradores (1998). Todos os outros se mostraram sensíveis a esta droga.

Cerca de 84% dos isolados clínicos, incluindo todas as espécies de ECN, apresentaram a enzima beta-lactamase.

#### 4.3 Teste de Triagem em Ágar Contendo Oxacilina

O aparecimento de colônias isoladas ou confluentes representando o crescimento de microrganismos em ágar contendo oxacilina indicou a resistência dos mesmos a esta droga (CLSI, 2006a). Quarenta e três isolados (68,25%) foram considerados resistentes à oxacilina quando testados por esse método, incluindo as seguintes espécies: *S. epidermidis* (35 de 46; 76,08%), *S. haemolyticus* (4 de 8), *S. simulans* (2), *S. auricularis* (1) e *S. chromogenes* (1), conforme os dados mostrados nos QUADROS 5 e 6.

#### 4.4 Teste de Difusão em Disco Contendo Cefoxitina

A resistência à oxacilina demonstrada pelo teste de difusão em disco contendo cefoxitina mostrou 34 isolados de 46 *S. epidermidis* resistentes à droga (73,91%), além de *S. haemolyticus* (4), *S. simulans* (1), *S. xyloso* (1) e *S. auricularis* (1). Foi considerado resistente ou sensível o isolado que teve halo de inibição com diâmetro menor ou igual a 24 mm, ou maior ou igual a 25 mm (CLSI, 2008).

Embora se tenha detectado um nítido halo de inibição superior a 25 mm para os isolados 6537/4, 7271/5, 7667/4, 8601/5 (*S. epidermidis*), houve crescimento de colônias dentro destes halos. As colônias bacterianas presentes no interior desses halos foram purificadas a partir de cada uma das colônias e o teste foi repetido. Com o resultado deste segundo teste, uma população bacteriana resistente ( $R^2$ ) foi encontrada para os isolados 6537/4, 7271/5 e 8601/5. Já a população bacteriana encontrada no segundo teste para o isolado 7667/4 mostrou ainda sensibilidade à cefoxitina ( $S^2$ ) devido à presença de um halo de inibição bem definido, havendo, no entanto, uma outra população bacteriana dentro do halo de

inibição a qual foi testada pelo mesmo modo descrito anteriormente. Tal população apresentou resistência à cefoxitina e foi denominada R<sup>3</sup> (QUADRO 5).

Os isolados 7148/4, 7249/4, 7559/5 (*S. epidermidis*), 7124/4 (*S. simulans*), 7614/5 (*S. chromogenes*) apresentaram resistência intermediária (QUADROS 5 e 6). Chamou-se de resistência intermediária a presença de halos de inibição entre 24 e 25 mm de diâmetro.

Como pode ser visto no QUADRO 6, o halo de inibição para o isolado de *S. haemolyticus* 7107/5 também foi superior a 25 mm e colônias bacterianas foram visualizadas no seu interior. Tais colônias foram submetidas a novo teste após isolamento, o qual indicou resistência bacteriana (R<sup>2</sup>).

O isolado 7614/5, representante da espécie *S. chromogenes*, apesar de resistente-intermediário à cefoxitina (I<sup>1</sup>), apresentou colônias no interior do halo de inibição, que demonstraram ser também resistentes-intermediárias à cefoxitina (I<sup>2</sup>) após novo teste (QUADRO 6).

A maioria dos resultados dos testes fenotípicos (53; 84,12%), usados para detectar a resistência à oxacilina, apresentou coincidência quando cada isolado foi analisado separadamente pelos testes de triagem em ágar contendo oxacilina e de difusão em disco para a cefoxitina. Trinta e seis resultados foram compatíveis nos dois testes para *S. epidermidis* (78,26%). Dentre as demais espécies de ECN, a única espécie que não teve compatibilidade nos dois testes foi *S. xylosus*. Para esta análise, os isolados que apresentaram resistência intermediária foram quantificados juntamente àqueles que apresentaram resistência de fato.

#### 4.5 Verificação da Presença dos Genes *qacA/B* e *mecA*

Mais da metade dos isolados clínicos de ECN apresentou o gene *qacA/B* (41; 65,08%), 32 dos quais (69,56%) foram identificados como *S. epidermidis*. O gene foi também encontrado em outras espécies bacterianas como *S. haemolyticus* (5; 62,5%), *S. simulans* (1), *S. hominis* (1), *S. xylosus* (1) e *S. auricularis* (1). A correlação entre os isolados e os resultados da PCR para o gene *qacA/B* é apresentada no QUADRO 7, no QUADRO 8 e na FIGURA 3.

A maioria dos ECN apresentou o gene *mecA* (56; 88,88%), conforme o QUADROS 5, o QUADRO 6 e a FIGURA 4, envolvendo as espécies *S. epidermidis* (43; 93,48%), *S.*

*haemolyticus* (6; 75%), *S. simulans* (2), *S. capitis* (1), *S. xylosus* (1), *S. auricularis* (1), *S. chromogenes* (1) e um isolado não identificado.

Os isolados 7439/5 e 7624/4 (*S. epidermidis*), 7814/4 e 7712/5 (*S. haemolyticus*), 7769/5 (*S. capitis*) e 7470/5 (não identificado), apesar de apresentarem o gene *mecA*, não exibiram resistência fenotípica nos testes de triagem em ágar contendo oxacilina e de difusão em disco contendo cefoxitina.

Três isolados clínicos (*S. epidermidis* - 6376/4, *S. haemolyticus* - 8661/5 e *S. hominis* - 8435/5) foram resistentes à oxacilina quando testados pelo Vitek, porém não apresentaram o gene *mecA*. Tais isolados também não apresentaram resistência fenotípica quando testados pelos outros dois métodos de resistência fenotípica (QUADROS 5 e 6).

#### 4.6 Seqüenciamento Genético

O seqüenciamento genético dos produtos amplificados pela PCR para os três isolados clínicos (6523/4, 2695/3 e 7249/4) demonstrou, respectivamente, 98,52%, 99,65% e 100% de similaridade com a seqüência de nucleotídeos depositada no banco de dados do GenBank (número de acesso X56628), confirmando a presença do gene *qacA/B*.

#### 4.7 Concentração Inibitória Mínima do Desinfetante

Isolados clínicos identificados como *S. epidermidis* com resistência a 10 ou mais drogas antimicrobianas foram alguns dos escolhidos para este estudo (6143/4, 6601/4 e 7559/5), os quais apresentaram os genes *mecA* e *qacA/B*. As CIMs foram determinadas a partir da concentração declarada do QAC e corresponderam a: 3 ppm, 4 ppm e 4 ppm, respectivamente.

*S. epidermidis* resistentes a 6 drogas antimicrobianas ou menos também foram selecionados e avaliados conforme a concentração declarada do produto. Foram eles: 8601/5, que continha apenas o gene *mecA*; 6863/4, que possui apenas o gene *qacA/B* e a 6367/4 que não possui nenhum dos dois genes. As CIMs foram, respectivamente: 3 ppm, 1 ppm, 2 ppm.

O isolado 7399/5, pertencente à espécie *S. caprae* não exibiu resistência a nenhuma das drogas antimicrobianas, não apresentou o gene *mecA* ou o gene *qacA/B*. Sua CIM para o desinfetante foi 0,5 ppm, de acordo com a concentração declarada pelo fabricante.

Entretanto, a análise do teor do tensoativo catiônico do produto revelou que a concentração do desinfetante descrita pelo fabricante no rótulo da embalagem do produto não foi a real. Por isso, um novo teste foi realizado para cada um dos isolados clínicos, tendo-se encontrado os seguintes valores de CIM: 6143/4 (3 ppm); 6601/4 (3 ppm); 7559/5 (2 ppm); 8601/5 (3 ppm); 6863/4 (0,4 ppm); 6367/4 (0,6 ppm); e 7399/5 (0,4 ppm). Estes dados podem ser visualizados no QUADRO 9.

#### **4.8 Técnica da Diluição de Uso**

O método da Diluição de Uso foi realizado para os mesmos isolados clínicos avaliados nos ensaios da CIM. Na diluição recomendada pelo fabricante e utilizando como base o teor correto do tensoativo catiônico do produto, os isolados 6143/4, 6601/4, 8601/5, 7399/5 não apresentaram crescimento em nenhum dos 120 tubos utilizados por ensaio (correspondentes aos 60 cilindros). Quando os isolados 6367/4 e 6863/4 foram testados com a mesma concentração do produto, houve crescimento em um tubo para cada isolado entre os 120 utilizados, a partir dos quais os microrganismos isolados foram ECN. O isolado 7559/5 apresentou crescimento em dois tubos, e apenas em um o microrganismo não foi identificado como ECN.

Alguns isolados clínicos apresentaram resultados diversos quando testados frente ao fenol 1:60 e 1:70, soluções preparadas a partir de uma solução inicial de 5%. Os isolados 6143/4, 6863/4, 8601/5 e 7399/5 se mostraram mais sensíveis ao fenol que a cepa de referência de *S. aureus* INCQS nº 00039 (ATCC 6538), conforme mostrado no (QUADRO 9).

#### **4.9 Determinação do Perfil Clonal dos Isolados Clínicos por PFGE**

A análise do perfil clonal por PFGE dos isolados clínicos identificados como *S. epidermidis*, a espécie encontrada com maior frequência neste estudo, revelou os perfis

clonais dos isolados. O dendrograma foi gerado utilizando-se o coeficiente de Dice, usando-se uma média de correlação com o máximo de tolerância de posição de 2% e sendo selecionado um coeficiente de similaridade de 83% para definição dos tipos clonais (FIGURA 8).

Os critérios de Tenover e colaboradores (1995) foram também adotados para a interpretação dos resultados. Letras do alfabeto diferentes foram usadas para denominar os isolados clínicos que apresentaram 7 diferentes fragmentos de DNA ou mais (ex. A, B, C). Com base nesta informação, 24 diferentes perfis (tipos clonais) foram encontrados (A até Z).

O tipo clonal que englobou o maior número de isolados foi chamado de A. A letra seguida de números arábicos foi usada para classificar os subtipos proximamente relacionados ou possivelmente relacionados à cepa-surto (A1), os quais apresentam, respectivamente, diferenças em 2 a 3 ou em 4 a 6 fragmentos de DNA (TENOVER et al., 1995).

Vários isolados clínicos foram classificados como pertencendo ao mesmo subtipo clonal. Estes dados podem ser visualizados no QUADRO 10. Foram eles: A1 (8), A2 (1), A3 (1), B1 (2), B2 (2), B3 (1), B4 (1), B5 (1); C1 (1), C2 (1), C3 (1), C4 (1); D (2); E1 (1); E2 (1); F (1); G (1); H (1); I (1); J (1); K (1); L (1); M (1); N (1); O (1); P (1); Q (1); R (1); S (1); T (1); U (1); V (3); X (1); Z (1). Os isolados correspondentes ao subtipo clonal A1 mostraram ser idênticos e, portanto o mesmo clone. Entretanto, quando comparados a A1, a cepa-surto, os tipos clonais A2 e A3 apresentaram apenas 1 fragmento de DNA diferente (cada um com uma diferença específica de fragmento de DNA) e assim considerados como sendo proximamente relacionados à cepa-surto.

Dentre aqueles pertencentes ao subtipo A1, 3 foram isolados em 2003, 3 em 2004 e 2 em 2005. Já os isolados correspondentes, os subtipos A2 e A3, foram coletados em 2004 e 2005, respectivamente.

QUADRO 1 - Distribuição das diferentes espécies de estafilococos coagulase-negativa isoladas no ambiente hospitalar, de acordo com as fontes de isolamento

ESPÉCIE (nº de isolados clínicos)	FONTES DE ISOLAMENTO (nº de isolados clínicos)
<i>S. epidermidis</i> (46; 73.01%)	Sangue (25) Biópsia pericárdica (1) Lavado broncoalveolar (1) Ponta de cateter intravascular (6) Ponta de cateter umbilical (1) Secreção de cirurgia ortopédica (1) Secreção de ferida operatória (3) Secreção de dorso da mão (1) Secreção de dreno (1) Secreção de ouvido (1) Secreção de pústula (1) Secreção ocular (2) Urina (2)
<i>S. haemolyticus</i> (8; 12.69%)	Ponta de cateter intravascular (1) Sangue (3) Secreção de ferida (2) Secreção de ulcera de perna (1) Urina (1)
<i>S. simulans</i> (2)	Ponta de cateter umbilical (2)
<i>S. hominis</i> (1)	Secreção de ferida umbilical (1)
<i>S. xylosus</i> (1)	Ponta de cateter intravascular (1)
<i>S. caprae</i> (1)	Sangue (1)
<i>S. capitis</i> (1)	Sangue (1)
<i>S. auricularis</i> (1)	Sangue (1)
<i>S. chromogenes</i> (1)	Sangue (1)
NI (1)	Sangue (1)

NI, não identificado.

QUADRO 2 - Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados clínicos identificados como *S. epidermidis*

ISOLADO CLÍNICO	AMP	SAM	CFZ	CIP	CLI	ERY	GEN	NIT	OXA	PEN	RIF	TET	SXT	VAN	BLA
2596/3	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	R	S	P
2607/3	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	P
2695/3	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	P
2740/3	R	R	R	S	S	S	R	S	R	R	S	S	R	S	ND
2741/3	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	R	S	P
5550/3	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	S	P
6118/4	R	R	R	R	R	R	I	S	R	R	R	S	S	I	P
6143/4	R	R	R	R	R	R	I	S	R	R	R	S	R	S	P
6367/4	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	N
6376/4	R	R	R	S	S	I	S	S	R	R	S	S	S	S	P
6523/4	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	P
6537/4	R	R	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	P
6601/4	R	R	R	R	R	R	I	S	R	R	R	S	R	S	P
6604/4	R	R	R	S	S	R	S	S	R	R	S	R	S	S	P
6668/4	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	S	P
6863/4	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	P
7083/4	R	R	R	S	S	S	R	S	R	R	S	R	S	S	P
7095/4	R	R	R	R	S	R	S	S	R	R	S	S	R	S	P
7126/4	R	R	R	S	S	S	R	S	R	R	S	S	R	S	P
7130/4	R	R	R	R	S	S	R	S	R	R	S	S	R	S	P
7148/4	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	R	S	P
7249/4	R	R	R	R	R	R	I	S	R	R	S	S	S	S	P
7271/5	R	R	R	S	S	R	R	S	R	R	S	R	S	S	P
7287/5	R	R	R	S	S	R	I	S	R	R	S	S	S	S	P
7373/4	R	R	R	S	S	S	R	S	R	R	S	R	S	S	ND
7432/5	R	R	R	I	S	S	R	S	R	R	S	R	S	S	P
7439/5	R	R	R	R	R	R	I	S	R	R	S	S	S	S	P
7491/5	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	R	S	P
7559/5	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	I	R	R	S	P
7569/4	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	R	S	P
7578/4	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	ND
7587/5	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	R	S	P
7624/4	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	N
7637/5	R	R	R	R	S	S	R	S	R	R	S	S	S	S	P

AMP, ampicilina; SAM, ampicilina-sulbactam; CFZ, cefazolina; CIP, ciprofloxacina; CLI, clindamicina; ERY, eritromicina; GEN, gentamicina; NIT, nitrofurantoína; OXA, oxacilina; PEN, penicilina G; RIF, rifampicina; TET, tetraciclina; SXT, trimetoprim/sulfametoxazol; VAN, vancomicina; BLA, beta-lactamase; S, sensibilidade, R, resistência; I, resistência intermediária; P, positivo; N, negativo; ND, não determinado.

QUADRO 2 (continuação) - Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados clínicos identificados como *S. epidermidis*

ISOLADO CLÍNICO	AMP	SAM	CFZ	CIP	CLI	ERY	GEN	NIT	OXA	PEN	RIF	TET	SXT	VAN	BLA
7646/4	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	R	S	P
7667/4	R	R	R	S	S	R	S	S	R	R	S	R	S	S	P
7668/5	R	R	R	S	S	S	R	S	R	R	S	S	S	S	P
7676/5	R	R	R	S	S	R	R	S	R	R	S	R	S	S	P
7822/5	R	R	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	S	P
8150/4	R	R	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	S	P
8422/5	R	R	R	S	S	R	S	S	R	R	S	S	R	S	P
8461/5	R	R	R	S	S	S	S	S	R	R	S	R	S	S	P
8551/5	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	P
8601/5	R	R	R	S	S	S	I	S	R	R	S	R	S	S	P
8640/5	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	R	S	P
9032/5	R	R	R	R	S	S	R	S	R	R	S	S	R	S	P

AMP, ampicilina; SAM, ampicilina-sulbactam; CFZ, cefazolina; CIP, ciprofloxacina; CLI, clindamicina; ERY, eritromicina; GEN, gentamicina; NIT, nitrofurantoína; OXA, oxacilina; PEN, penicilina G; RIF, rifampicina; TET, tetraciclina; SXT, trimetoprim/sulfametoxazol; VAN, vancomicina; BLA, beta-lactamase; S, sensibilidade, R, resistência; I, resistência intermediária; P, positivo; N, negativo; ND, não determinado.

QUADRO 3 - Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados clínicos de *S. haemolyticus*, *S. simulans*, *S. capitis*, *S. xylosum*, *S. hominis*, *S. caprae*, *S. auricularis* e *S. chromogenes*

ESPÉCIE	ISOLADO CLÍNICO	AMP	SAM	CFZ	CIP	CLI	ERY	GEN	NIT	OXA	PEN	RIF	TET	SXT	VAN	BLA
<i>S. haemolyticus</i>	5588/3	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	S	P
	7107/4	R	R	R	S	S	S	R	S	R	R	S	R	S	S	P
	7712/5	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	N
	7814/4	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	P
	7818/5	R	S	S	R	S	R	S	S	S	R	S	R	S	S	P
	8089/4	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	P
	8603/5	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	N
	8661/5	R	R	R	S	S	S	S	S	R	R	ND	R	S	S	ND
<i>S. simulans</i>	7124/4	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	P
	7324/4	R	R	R	S	S	R	R	S	R	R	S	S	S	S	P
<i>S. capitis</i>	7769/5	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	N
<i>S. xylosum</i>	8153/4	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	P
<i>S. hominis</i>	8435/5	R	R	R	I	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	N
<i>S. caprae</i>	7399/5	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	P
<i>S. auricularis</i>	7434/5	R	R	R	S	S	R	I	S	R	R	S	R	S	S	P
<i>S. chromogenes</i>	7614/5	R	R	R	S	S	R	S	S	R	R	S	R	R	S	P
NI	7470/5	R	S	S	S	R	R	S	S	S	R	S	R	S	S	P

AMP, ampicilina; SAM, ampicilina-sulbactam; CFZ, cefazolina; CIP, ciprofloxacina; CLI, clindamicina; ERY, eritromicina; GEN, gentamicina; NIT, nitrofurantoína; OXA, oxacilina; PEN, penicilina G; RIF, rifampicina; TET, tetraciclina; SXT, trimetoprim/sulfametoxazol; VAN, vancomicina; BLA, beta-lactamase; S, sensibilidade, R, resistência; I, resistência intermediária; P, positivo; N, negativo; ND, não determinado; NI, não identificado.

QUADRO 4 - Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das espécies de *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. simulans*, *S. capitis*, *S. xylosus*, *S. hominis*, *S. caprae*, *S. auricularis*, *S. chromogenes* e o número de isolados clínicos incluídos em cada perfil

ESPÉCIE	PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS (nº de isolados clínicos resistentes)
<i>S. epidermidis</i>	AMP, SAM, CFZ, CIP, CLI, ERY, GEN, OXA, PEN, RIF (1), TET, SXT (1) AMP, SAM, CFZ, CIP, CLI, ERY, GEN (1), OXA, PEN, RIF, SXT (2) AMP, SAM, CFZ, CIP, CLI, ERY, GEN (1), OXA, PEN, RIF, VAN (1) (1) AMP, SAM, CFZ, CIP, CLI, ERY, GEN, OXA, PEN, RIF, SXT (1) AMP, SAM, CFZ, CIP, CLI, ERY, GEN, OXA, PEN, SXT (8) AMP, SAM, CFZ, CIP, CLI, ERY, GEN (1), OXA, PEN (2) AMP, SAM, CFZ, CIP, CLI, ERY, GEN, OXA, PEN (5)* AMP, SAM, CFZ, CIP (1), GEN, OXA, PEN, TET (1) AMP, SAM, CFZ, ERY, GEN, OXA, PEN, TET (2) AMP, SAM, CFZ, CIP, GEN, OXA, PEN, SXT (2) AMP, SAM, CFZ, CIP, ERY, OXA, PEN, SXT (1) AMP, SAM, CFZ, CIP, CLI, ERY, OXA, PEN (1) AMP, SAM, CFZ, ERY, GEN (1), OXA, PEN (1) AMP, SAM, CFZ, GEN (1), OXA, PEN, TET (1) AMP, SAM, CFZ, GEN, OXA, PEN, TET (2) AMP, SAM, CFZ, GEN, OXA, PEN, SXT (2) AMP, SAM, CFZ, ERY, OXA, PEN, SXT (1) AMP, SAM, CFZ, ERY, OXA, PEN, TET (2) AMP, SAM, CFZ, CIP, GEN, OXA, PEN (1) AMP, SAM, CFZ, ERY (1), OXA, PEN (1) AMP, SAM, CFZ, GEN, OXA, PEN (1) AMP, SAM, CFZ, OXA, PEN, SXT (2) AMP, SAM, CFZ, OXA, PEN, TET (1) AMP, SAM, CFZ, OXA, PEN (1) AMP, PEN, RIF (1) AMP, PEN (1) Ausência de resistência (1)
<i>S. haemolyticus</i>	AMP, SAM, CFZ, CIP, CLI, ERY, GEN, OXA, PEN, TET, SXT (1) AMP, SAM, CFZ, CIP, CLI, ERY, GEN, OXA, PEN (1)* AMP, SAM, CFZ, GEN, OXA, PEN, TET (1) AMP, SAM, CFZ, OXA, PEN, RIF (ND), TET (1) AMP, SAM, CFZ, CIP, OXA, PEN (1) AMP, CIP, ERY, PEN, TET (1) CIP (1) ERY (1)
<i>S. simulans</i>	AMP, SAM, CFZ, CIP, CLI, ERY, GEN, OXA, PEN (1)* AMP, SAM, CFZ, ERY, GEN, OXA, PEN (1)
<i>S. capitis</i>	Ausência de resistência (1)
<i>S. xylosus</i>	AMP, SAM, CFZ, CIP, CLI, ERY, GEN, OXA, PEN (1)*
<i>S. hominis</i>	AMP, SAM, CFZ, CIP (1), OXA, PEN (1)
<i>S. caprae</i>	AMP, PEN (1)
<i>S. auricularis</i>	AMP, SAM, CFZ, ERY, GEN (1), OXA, PEN, TET (1)
<i>S. chromogenes</i>	AMP, SAM, CFZ, ERY, OXA, PEN, TET, SXT (1)
Não identificado	AMP, CLI, ERY, PEN, TET (1)

\* Perfil comum para os isolados clínicos; AMP, ampicilina; SAM, ampicilina-sulbactam; CFZ, cefazolina; CIP, ciprofloxacina; CLI, clindamicina; ERY, eritromicina; GEN, gentamicina; NIT, nitrofurantoína; OXA, oxacilina; PEN, penicilina G; RIF, rifampicina; TET, tetraciclina; SXT, trimetoprim/sulfametoxazol; VAN, vancomicina; I, resistência intermediária; ND, não determinado; NI, não identificado.

QUADRO 5 - Resultados do teste de difusão em disco contendo cefoxitina, teste de triagem em ágar contendo oxacilina e comparação com a presença do gene *mecA* para os isolados clínicos de *S. epidermidis*

GENE <i>mecA</i>	ISOLADO CLÍNICO/ANO	VITEK	OXACILINA	CEFOXITINA
PRESENTE (43; 93,48%)	2596/3	R	R	R
	2607/3	R	R	R
	2695/3	R	S	R
	2740/3	R	R	S
	2741/3	R	R	R
	5550/3	R	R	R
	6118/4	R	S	R
	6143/4	R	R	R
	6523/4	R	R	R
	6537/4	R	S	S <sup>1</sup> /R <sup>2</sup>
	6601/4	R	R	R
	6604/4	R	R	R
	6668/4	R	R	R
	7083/4	R	R	R
	7095/4	R	R	R
	7126/4	R	R	R
	7130/4	R	R	R
	7148/4	R	R	I
	7249/4	R	R	I
	7271/5	R	R	S <sup>1</sup> /R <sup>2</sup>
	7287/5	R	R	R
	7373/4	R	R	R
	7432/5	R	S	R
	7439/5	R	S	S
	7491/5	R	S	R
	7559/5	R	R	I
	7569/5	R	R	S

R, resistente; S, sensível; I, resistência intermediária (halo de inibição maior que 24 mm e menor que 25 mm); S<sup>1</sup>, população bacteriana 1 sensível; S<sup>2</sup>, população bacteriana 2 sensível; R<sup>2</sup>, população bacteriana 2 resistente; R<sup>3</sup>, população bacteriana 3 resistente; S<sup>1</sup>/S<sup>2</sup>/R<sup>2</sup>, populações bacterianas sensíveis ou resistentes conforme os resultados dos testes realizados com as colônias bacterianas presentes no interior do halo de inibição do crescimento bacteriano.

QUADRO 5 (continuação) - Resultados do teste de difusão em disco contendo cefoxitina, teste de triagem em ágar contendo oxacilina e comparação com a presença do gene *mecA* para os isolados clínicos de *S. epidermidis*

GENE <i>mecA</i>	ISOLADO CLÍNICO/ANO	VITEK	OXACILINA	CEFOXITINA
PRESENTE (43; 93,48%)	7578/4	R	R	R
	7587/5	R	R	R
	7624/4	S	S	S
	7637/5	R	R	R
	7646/4	R	R	R
	7667/4	R	S	S <sup>1</sup> /S <sup>2</sup> /R <sup>3</sup>
	7668/5	R	R	R
	7676/5	R	R	R
	7822/5	R	R	S
	8150/4	R	R	R
	8422/5	R	R	S
	8461/5	R	R	R
	8551/5	R	R	R
	8601/5	R	R	S <sup>1</sup> /R <sup>2</sup>
	8640/5	R	R	R
	9032/5	R	R	R
	AUSENTE (3; 6,52%)	6367/4	S	S
6376/4		R	S	S
6863/4		S	S	S

R, resistente; S, sensível; I- resistência intermediária (halo de inibição maior que 24 mm e menor que 25 mm); S<sup>1</sup>, população bacteriana 1 sensível; S<sup>2</sup>, população bacteriana 2 sensível; R<sup>2</sup>, população bacteriana 2 resistente; R<sup>3</sup>, população bacteriana 3 resistente. S<sup>1</sup>/S<sup>2</sup>/R<sup>2</sup>/R<sup>3</sup>, populações bacterianas sensíveis ou resistentes conforme os resultados dos testes realizados com as colônias bacterianas presentes no interior do halo de inibição do crescimento bacteriano.

QUADRO 6 - Resultados do teste de difusão em disco contendo cefoxitina, teste de triagem em ágar contendo oxacilina e verificação da presença do gene *mecA* para os isolados clínicos de *S. haemolyticus*, *S. simulans*, *S. capitis*, *S. xylosum*, *S. hominis*, *S. caprae*, *S. auricularis* e *S. chromogenes*

ESPÉCIE	GENE <i>mecA</i>	ISOLADO CLÍNICO/ANO	VITEK	OXACILINA	CEFOXITINA
<i>S. haemolyticus</i>	PRESENTE (6; 75%)	5588/3	R	R	R
		7107/4	R	R	S <sup>1</sup> /R <sup>2</sup>
		7712/5	S	S	S
		7814/4	R	S	S
		8089/4	R	R	R
		8603/5	S	R	R
	AUSENTE (2; 25%)	7818/5	S	S	S
		8661/5	R	S	S
<i>S. simulans</i>	PRESENTE	7124/4	R	R	I
		7324/4	R	R	R
<i>S. capitis</i>	PRESENTE	7769/5	S	S	S
<i>S. xylosum</i>	PRESENTE	8153/4	R	S	R
<i>S. hominis</i>	AUSENTE	8435/5	R	S	S
<i>S. caprae</i>	AUSENTE	7399/5	S	S	S
<i>S. auricularis</i>	PRESENTE	7434/5	R	R	R
<i>S. chromogenes</i>	PRESENTE	7614/5	R	R	I <sup>1</sup> /I <sup>2</sup>
NI	PRESENTE	7470/5	S	S	S

R, resistente; S, sensível; I, resistência intermediária (halo de inibição maior que 24 mm e menor que 25 mm); S<sup>1</sup>, população bacteriana 1 sensível; R<sup>2</sup>, população bacteriana 2 resistente; I<sup>1</sup>, população bacteriana 1 com resistência intermediária; I<sup>2</sup>, população bacteriana 2 com resistência intermediária. I<sup>1</sup>/I<sup>2</sup>/R<sup>2</sup>/S<sup>1</sup>, populações bacterianas sensíveis ou resistentes conforme os resultados dos testes realizados com as colônias bacterianas presentes no interior do halo de inibição do crescimento bacteriano.

QUADRO 7 - Presença do gene *qacA/B* nos isolados clínicos identificados como *S. epidermidis*

ESPÉCIE BACTERIANA	GENE <i>qacA</i> (número; porcentagem)	ISOLADO CLÍNICO
<i>S. epidermidis</i>	PRESENTE (32; 69,56%)	2596/3 2695/3 2740/3 2741/3 5550/3 6143/4 6376/4 6523/4 6537/4 6601/4 6668/4 6863/4 7083/4 7130/4 7148/4 7249/4 7271/5 7287/5 7439/5 7491/5 7559/5 7569/5 7578/4 7587/5 7624/4 7667/4 7668/5 7676/5 7822/5 8461/5 8551/5 9032/5
	AUSENTE (14; 30,43%)	2607/3 6118/4 6367/4 6604/4 7095/4 7126/4 7373/4 7432/5 7637/5 7646/4 8150/4 8422/5 8601/5 8640/5

QUADRO 8 - Presença do gene *qacA/B* nos isolados clínicos de *S. haemolyticus*, *S. simulans*, *S. hominis*, *S. xylosum*, *S. caprae*, *S. capitis*, *S. auricularis* e *S. chromogenes*

ESPÉCIE BACTERIANA	PRESENÇA DE <i>qacA</i>	ISOLADO CLÍNICO
<i>S. haemolyticus</i>	Positivas (5; 62,5%)	7107/4 7712/5 7814/4 7818/5 8089/4
	Negativas (37,5%)	5588/3 8603/5 8661/5
<i>S. simulans</i>	Positiva	7124/4
	Negativa	7324/4
<i>S. hominis</i>	Positiva	8435/5
<i>S. xylosum</i>	Positiva	8153/4
<i>S. caprae</i>	Negativa	7399/5
<i>S. capitis</i>	Negativa	7769/5
<i>S. auricularis</i>	Positiva	7434/5
<i>S. chromogenes</i>	Negativa	7614/5
NI	Negativa	7470/5

NI, não identificado.

QUADRO 9 - Perfil de susceptibilidade ao composto quaternário de amônio de alguns isolados clínicos com relação ao fenol, à Concentração Inibitória Mínima (CIM) e à Diluição de Uso de acordo com o perfil de susceptibilidade às drogas antimicrobianas

Microrganismos			CIM (ppm)		Diluição de Uso	Teste de Susceptibilidade ao Fenol						
						Fenol 1:60			Fenol 1:70			
Isolado	<i>mecA</i>	<i>qacA/B</i>	AA	PA		5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min	
<b>R≥10</b>	6143/4	POS	POS	3	3	A	P	P	A	P	P	A
	6601/4	POS	POS	4	3	A	P	A	A	P	P	P
	7559/5	POS	POS	4	2	P15R P51R	P	A	A	P	P	P
<b>R≤6</b>	6367/4	NEG	NEG	2	0,6	P26R	P	A	A	P	P	P
	8601/5	POS	NEG	3	3	A	P	A	A	A	A	A
	6863/4	NEG	POS	1	0,4	P52R	A	A	A	A	A	A
	7399/5	NEG	NEG	0,5	0,4	A	P	A	A	P	A	A
<b>Referência <i>S. aureus</i></b>	ATCC 6538	----	----	----	----	----	P ou A	P ou A	A	P	P	P

A, ausência de crescimento bacteriano; P, presença de crescimento bacteriano; P15R, presença de crescimento bacteriano no tubo contendo meio de cultura 15R; P51R, presença de crescimento bacteriano no tubo contendo meio de cultura 51R; P26R, presença de crescimento bacteriano no tubo contendo meio de cultura 26R; P52R, presença de crescimento bacteriano no tubo contendo meio de cultura 52R; POS, positivo; NEG, negativo; AA, antes da análise do teor do tensoativo catiônico; PA, posterior à análise de teor do tensoativo catiônico; R≥10, resistência a 10 ou mais drogas antimicrobianas; R≤6, resistência a seis ou menos drogas antimicrobianas; ATCC 6538 (INCQS nº 00039).

QUADRO 10 - Relação entre os tipos clonais de *S. epidermidis*, a presença dos genes *mecA* e *qacA/B*, e a origem dos isolados clínicos

TIPOS CLONAIS	ISOLADO/ANO	ORIGEM	<i>mecA</i>	Cefoxitina	<i>qacA/B</i>	
A	A1	2596/3	Enfermaria/Berçário	P	R	P
		2607/3	Enfermaria/CTI pediátrico	P	R	A
		2741/3	Enfermaria/Pneumologia	P	R	P
		7130/4	ND	P	R	P
		7148/4	Enfermaria/Hemodiálise	P	I	P
		7637/5	Enfermaria/Clínica Médica	P	R	A
		7646/4	Enfermaria/Clínica Cirúrgica	P	R	A
		8551/5	Enfermaria/Clínica Cirúrgica	P	R	P
	A2	7249/4	Enfermaria/Berçário	P	I	P
A3	8640/5	Enfermaria/CTI Adulto	P	R	A	
B	B1	7287/5	Enfermaria/CTI Adulto	P	R	P
		7676/5	Enfermaria/CTI Pediátrico	P	R	P
	B2	6537/4	Enfermaria/CTI Pediátrico	P	S <sup>1</sup> /R <sup>2</sup>	P
		8601/5	Enfermaria/Clínica Cirúrgica	P	S <sup>1</sup> /R <sup>2</sup>	A
	B3	7271/5	Enfermaria/CTI Pediátrico	P	S <sup>1</sup> /R <sup>2</sup>	P
B4	7083/4	Enfermaria/Pediatria	P	R	P	
B5	7373/4	Ambulatório/Pediatria	P	R	A	
C	C1	7569/5	Enfermaria/Clínica Cirúrgica	P	S	P
	C2	7491/5	Enfermaria/CTI Adulto	P	R	P
	C3	7667/4	Enfermaria/Berçário	P	S <sup>1</sup> /S <sup>2</sup> /R <sup>3</sup>	P
	C4	2695/3	Enfermaria/Pneumologia	P	R	P
D	D	6601/4	Enfermaria/CTI Adulto	P	R	P
		6668/4	Enfermaria/ND	P	R	P
E	E1	5550/3	Enfermaria/Ortopedia	P	R	P
	E2	6604/4	Enfermaria/Clínica Médica	P	R	A
F	F	6143/4	Enfermaria/Clínica Médica	P	R	P
G	G	7126/4	Enfermaria/CTI Pediátrico	P	R	A
H	H	7439/5	Enfermaria/Clínica Médica	P	S	P
I	I	2740/3	Ambulatório/Dermatologia	P	S	P
J	J	7095/4	Enfermaria/CTI Adulto	P	R	A
K	K	7624/4	Enfermaria/Clínica Médica	P	S	P
L	L	7559/5	Enfermaria/Clínica Médica	P	I	P
M	M	7587/5	Enfermaria/CTI Adulto	P	R	P
N	N	8422/5	Enfermaria/Pediatria	P	S	A
O	O	7578/4	Enfermaria/CTI Pediátrico	P	R	P
P	P	7822/5	Enfermaria/Berçário	P	S	P
Q	Q	7668/5	Enfermaria/Berçário	P	R	P
R	R	6367/4	Enfermaria/Pneumologia	A	S	A
S	S	8150/4	Enfermaria/Clínica Cirúrgica	P	R	A
T	T	9032/5	Enfermaria/CTI Pediátrico	P	R	P
U	U	6863/4	Enfermaria/Clínica Cirúrgica	A	S	P
V	V	6118/4	Enfermaria/Ortopedia	P	R	A
		6523/4	Enfermaria/CTI Pediátrico	P	R	P
		7432/5	Enfermaria/CTI Adulto	P	R	A
X	X	8461/5	Enfermaria/Berçário	P	R	P
Z	Z	6376/4	Enfermaria/Berçário	A	S	P

A, ausente; P, presente; R, resistente; S, sensível; I, resistência intermediária; S<sup>1</sup>, população bacteriana 1 sensível; S<sup>2</sup>, população bacteriana 2 sensível; R<sup>2</sup>, população bacteriana 2 resistente; R<sup>3</sup>, população bacteriana 3 resistente; S<sup>2</sup>/R<sup>2</sup>/R<sup>3</sup>, populações bacterianas dentro do halo de inibição; ND, não determinado.

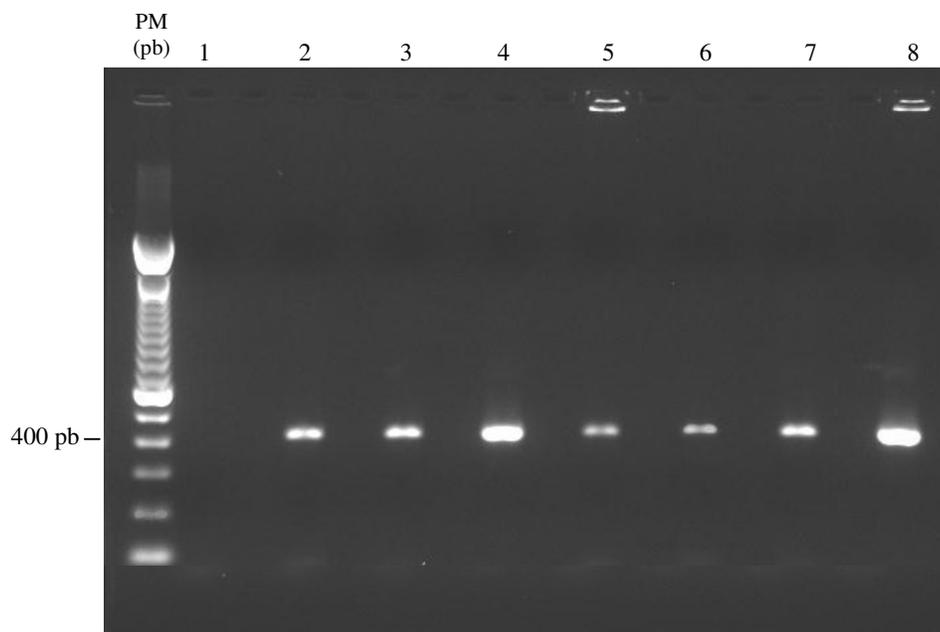


FIGURA 3 - Produtos da reação em cadeia da polimerase (PCR) para a detecção do gene *qacA/B* de alguns isolados de estafilococos coagulase-negativa. PM (pb), peso molecular de 100 pares de base; 1- controle negativo, 2- 2695/3, 3- 7130/4, 4- 7569/5, 5- 8461/5, 6- 8089/4, 7- 7124/4, 8- controle positivo (*S. aureus* 7644, Gene Bank n° EF418547).

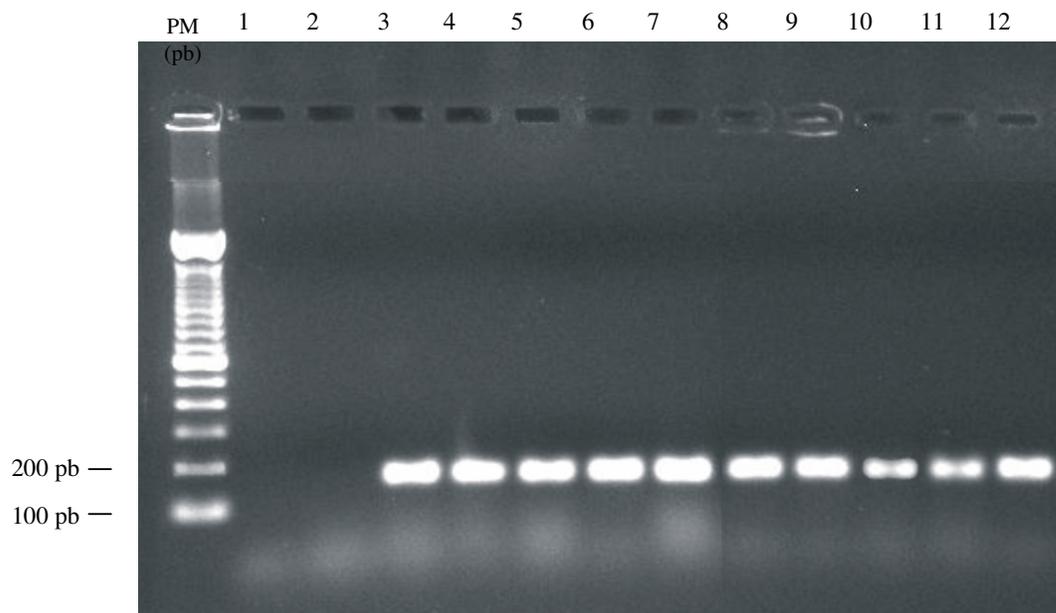


FIGURA 4 - Produtos da reação em cadeia da polimerase (PCR) para a detecção do gene *mecA* de alguns isolados de estafilococos coagulase-negativa. PM (pb), peso molecular de 100 pares de base; 1- controle negativo, 2- 5588/3, 3- 7083/4, 4- 7130/4, 5- 7439/5, 6- 7559/5, 7- 7578/4, 8- 7668/5, 9- 7614/5, 10- 7676/5, 11- 7667/4, 12- controle positivo (*S. aureus* ATCC 33591, INCQS nº 00306).

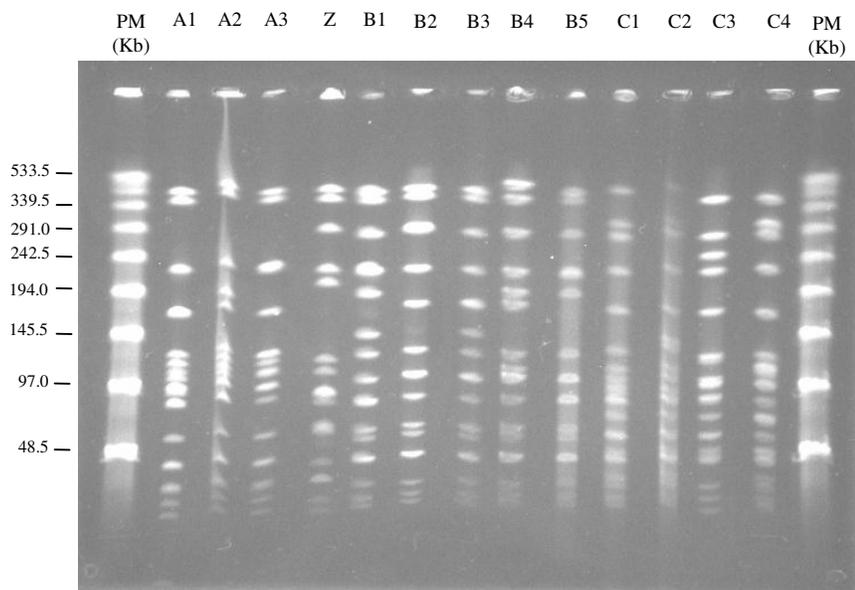


FIGURA 5 - Perfis de fragmentação do DNA dos representantes de cada tipo clonal (A1 a C4; Z) de *S. epidermidis* obtidos por PFGE. PM (Kb) - Peso molecular lambda PFGE marker (New England Biolabs).

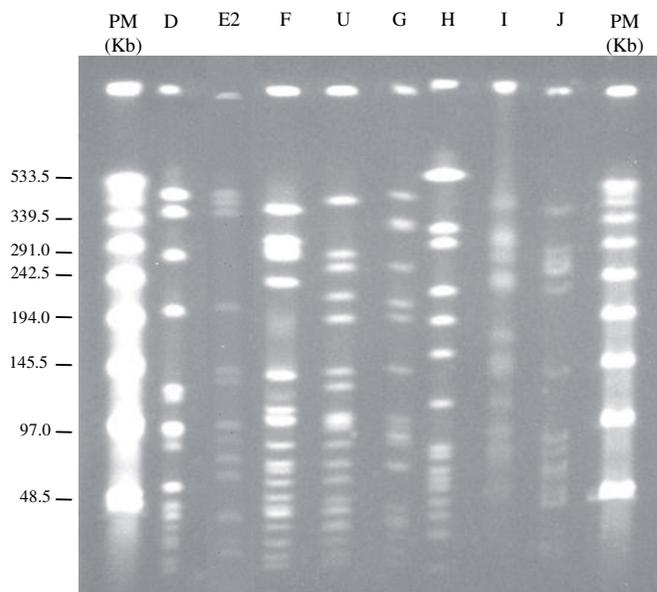


FIGURA 6 - Perfis de fragmentação do DNA dos representantes de cada tipo clonal (D a J; U) de *S. epidermidis* obtidos por PFGE. PM (Kb) - Peso molecular lambda PFGE marker (New England Biolabs).

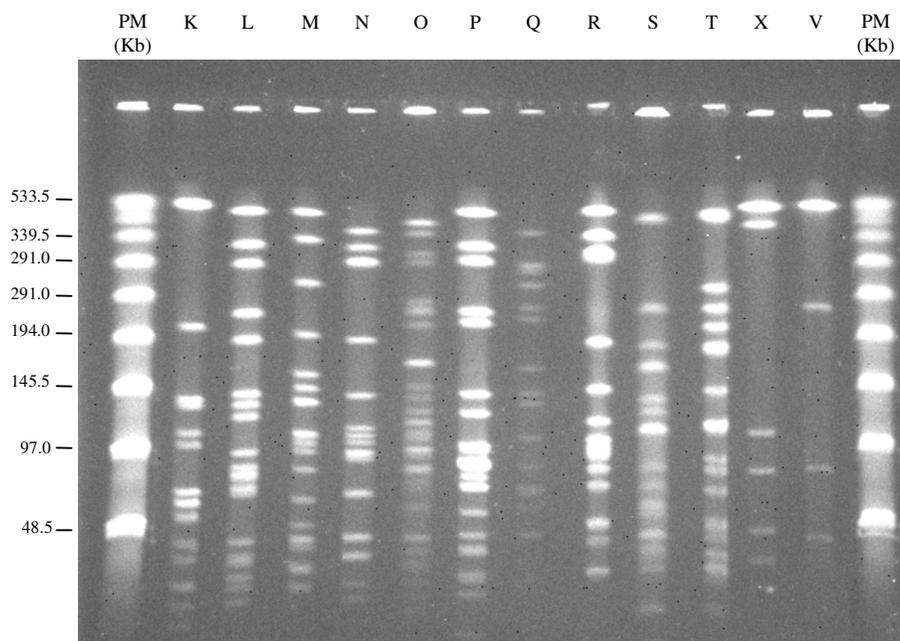


FIGURA 7 - Perfis de fragmentação do DNA dos representantes de cada tipo clonal (K, L, M, N, O, P, Q, R, S, T, V e X) de *S. epidermidis* obtidos por PFGE. PM (Kb) - Peso molecular lambda PFGE marker (New England Biolabs).

Dice (Tol 2.0%-2.0%) (H&gt;0.0% S&gt;0.0%) [0.0%-100.0%]

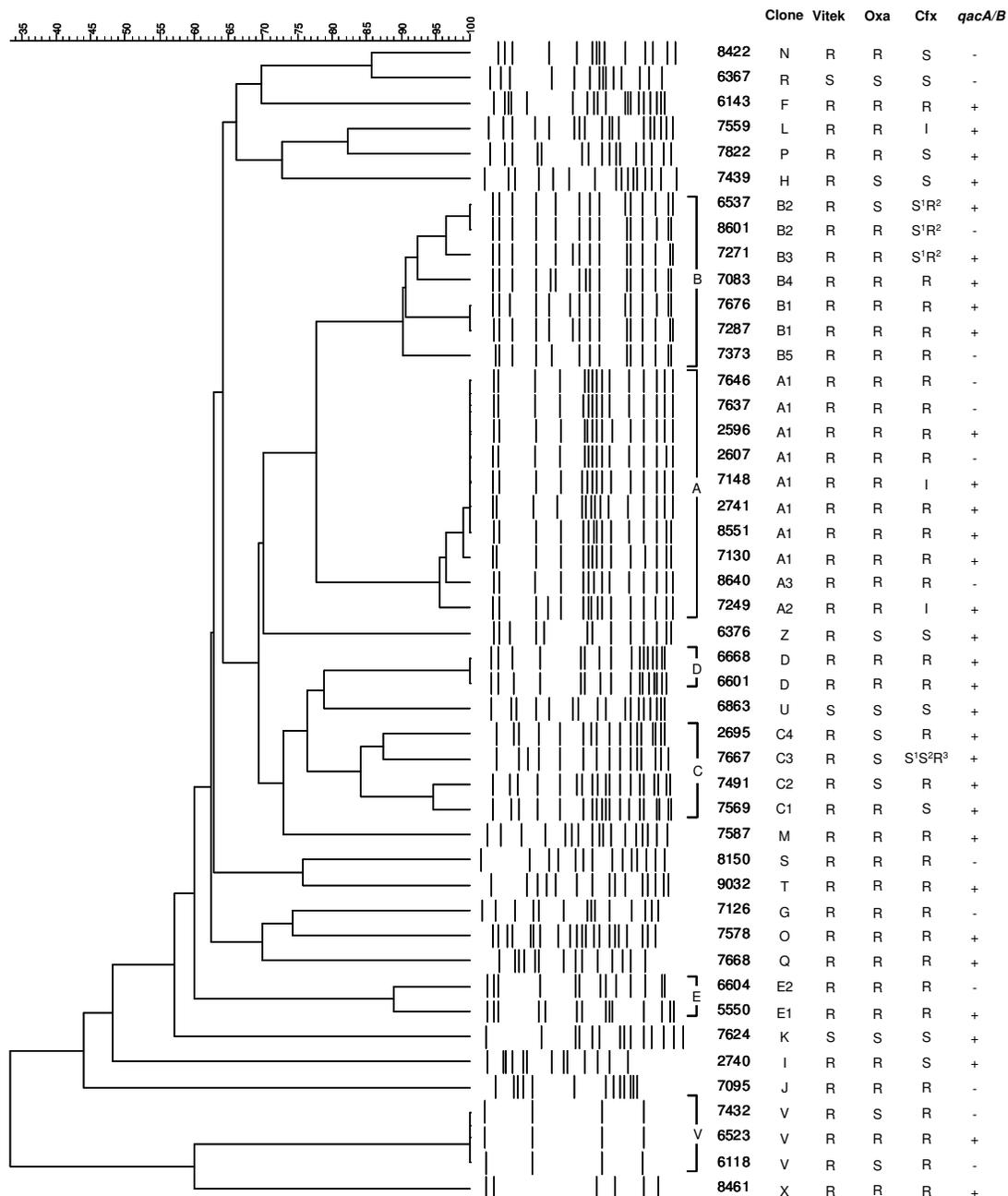
**S. epidermidis**

FIGURA 8 - Dendrograma dos 46 isolados clínicos de *Staphylococcus epidermidis* obtido a partir do PFGE. Oxa, Teste de triagem em ágar contendo oxacilina; Cfx, Teste de difusão em disco contendo cefoxitina; -, ausência; +, presença; R, resistente; S, sensível; I, resistência intermediária; S<sup>1</sup>, população bacteriana 1 sensível; S<sup>2</sup>, população bacteriana 2 sensível; R<sup>2</sup>, população bacteriana 2 resistente; R<sup>3</sup>, população bacteriana 3 resistente; S<sup>2</sup>/R<sup>2</sup>/R<sup>3</sup>, populações bacterianas no interior do halo de inibição do crescimento bacteriano.

## 5. DISCUSSÃO

Os estafilococos coagulase-negativa se tornaram importantes patógenos nosocomiais causadores de diversas infecções no organismo humano, sendo possível isolá-los a partir de diferentes espécimes clínicos. Até pouco tempo atrás, muitos laboratórios clínicos não realizavam a identificação dos ECN até o nível de espécie, porém devido ao crescente envolvimento dessas espécies com bacteremias, especialmente em neonatos, indivíduos imunocomprometidos e pacientes com fatores predisponentes como a utilização de cateteres e próteses, alterou essa realidade (VUONG & OTTO, 2002; CAIERÃO et al., 2006).

Nesse estudo foi realizada a identificação de 63 isolados clínicos oriundos de um hospital público do Rio de Janeiro através do método automatizado Vitek ou pelo APIStaph. *S. epidermidis* (73,01%) foi a espécie mais comumente isolada, seguida por *S. haemolyticus* (12,69%). Este comportamento tem sido observado por outros autores, apesar de outras espécies de ECN também estarem envolvidas (DE PAULIS et al., 2003; SINGHAL et al., 2006; NUNES et al., 2007). Quanto aos outros ECN não-epidermidis que foram identificados, podem ser citados *S. simulans*, *S. hominis*, *S. xylosum*, *S. caprae*, *S. capitis*, *S. auricularis* e *S. chromogenes*. Todas essas espécies de ECN encontradas estão relacionadas com frequência a infecções hospitalares (SINGHAL et al., 2006; NUNES et al., 2007).

Quase todos os espécimes clínicos, a partir dos quais os ECN foram obtidos corresponderam ao sangue. *S. epidermidis* foi a espécie mais numerosa, entre todas aquelas isoladas do sangue, fato esse já relatado por Singhal e colaboradores (2006).

A identificação da espécie envolvida numa infecção é aspecto importante para a seleção da terapêutica adequada (YAMAZUMI et al., 2001). Contudo, a identificação dos ECN continua muito limitada, pois este grupo de microrganismos é composto por espécies que apresentam características fisiológicas muito semelhantes (NUNES, 2000; MACHADO et al., 2007). Um dos isolados clínicos desse estudo não foi identificado até o nível de espécie por nenhum dos métodos de identificação adotados, esse mesmo problema já havia sido observado anteriormente (DE PAULIS et al., 2003; MACHADO et al., 2007).

A resistência às drogas antimicrobianas é uma preocupação crescente em todos os países do mundo e aqui também revelada por diferentes métodos. Multi-resistência foi exibida pela maioria dos isolados deste estudo. Cerca de 69,8% dos isolados apresentaram resistência à mais de seis drogas antimicrobianas de acordo com o sistema Vitek.

A resistência a dois ou a mais de dois antimicrobianos tem sido geralmente detectada nos ECN (DE ALLORI et al., 2006; NAYAK et al., 2007). Segundo o QUADRO 4, as espécies de *S. epidermidis* (5), *S. haemolyticus* (1), *S. simulans* (1) e *S. xylosus* (1) expressaram o mesmo perfil de susceptibilidade às drogas antimicrobianas, o que poderia sugerir a possibilidade da disseminação da resistência no ambiente hospitalar entre os isolados clínicos estudados.

Isolados de estafilococos com susceptibilidade reduzida (CDC, 1997 a e b; HOPE et al., 2008) ou resistência à vancomicina têm sido descritos (CDC, 2002 a e b), não sendo assustadora a existência na presente pesquisa de um isolado de *S. epidermidis* com susceptibilidade reduzida a esta droga. Até pouco tempo atrás, eram considerados resistentes à vancomicina os estafilococos que apresentavam CIM igual ou superior a 32 µg/mL, resistentes-intermediários aqueles com CIM de 8 a 16 µg/mL e sensíveis aqueles que apresentavam CIM menor ou igual a 4 µg/mL (TENOVER et al., 1998).

Em 2006, os limites da CIM para *S. aureus* diminuíram, sendo susceptíveis, resistentes-intermediários e resistentes os estafilococos com CIM correspondentes, respectivamente, aos seguintes valores: menor ou igual a 2 µg/mL, de 4 a 8 µg/mL e maior ou igual a 16 µg/mL. Esta medida foi tomada para aumentar a detecção de *S. aureus* heterogeneamente resistentes. Não houve alteração nos limites de CIM para os ECN (CLSI, 2006b; TENOVER & MOELLERING, 2007).

O mesmo isolado com susceptibilidade reduzida à vancomicina, exibiu resistência à oxacilina, o que tem sido relatado por outros autores, os quais observaram resultados semelhantes em relação ao aparecimento de cepas possuindo susceptibilidade reduzida à vancomicina e resistência à oxacilina (WOODFORD et al., 1995; HIRAMATSU et al., 1997; SIERADZKI et al., 1999; CDC, 2002 a e b). Porém, a resistência à vancomicina em ECN não é restrita apenas a cepas resistentes à oxacilina (PALAZZO, ARAÚJO & DARINI, 2005).

Em 2002 foram relatadas duas cepas de *S. aureus* resistentes à vancomicina de acordo com suas CIMs, uma delas apresentando CIM superior a 128 µg/mL e a outra com CIM igual a 32 µg/mL. Ambas as cepas continham o gene *vanA* (CDC, 2002 a e b). O gene *vanA*, bem como, *vanB* e *vanC*, envolvidos com a resistência de enterococos à vancomicina, também seriam responsáveis pela resistência de estafilococos à droga. Seria possível sugerir que pelo menos o gene *vanA* poderia ter sido adquirido pela bactéria através da transferência de elementos genéticos como plasmídeos ou transposons. Aproximadamente três anos depois, a ausência destes genes nos primeiros ECN vancomicina-resistentes encontrados no Brasil,

deixou dúvida sobre esta possível relação (PALLAZZO, ARAÚJO & DARINI, 2005). A resistência à vancomicina em estafilococos poderia então estar associada a outros fatores além da presença dos genes *vanA*, *vanB* e *vanC*.

Apesar do amplo perfil de resistência das bactérias às drogas antimicrobianas, as drogas vancomicina, linezolida, quinupristin-dalfopristin e daptomicina, continuam representando importantes opções para o tratamento de cepas de ECN meticilina-resistentes devido à susceptibilidade ainda apresentada por estes microrganismos (LOZA et al., 2008).

A resistência de estafilococos à meticilina está associada à presença do gene *mecA*, responsável pela síntese de uma proteína de ligação à penicilina com afinidade menor às drogas beta-lactâmicas (STAPLETON & TAYLOR, 2002). O gene está inserido em um cassete cromossômico estafilocócico chamado SCCmec. O SCCmec é um elemento genético móvel e pode representar uma fonte para o gene de resistência à meticilina para outros estafilococos (ITO et al., 2003; MARTINS & CUNHA, 2007). Recentemente, Berglund e Söderquist (2008) indicaram evidências de transferência horizontal de SCCmec entre *S. haemolyticus* meticilina-resistente e *S. aureus* meticilina-resistente.

Avaliando a distribuição dos tipos de SCCmec em ECN obtidos de pacientes em um hospital no Brasil entre 2004 e 2005, encontrou-se que dos 129 isolados de sangue, 36 (27,9%) faziam parte do SCCmec tipo I, 4 (3,0%) do SCCmec tipo II, 67 (52%) do SCCmec tipo III, 1 (0,8%) do SCCmec tipo IV e 4 (3,0%) do SCCmec tipos I e III, e 17 não foram tipáveis. O tipo mais prevalente em *S. epidermidis* e *S. capitis* foi SCCmec tipo III e o predominante em *S. haemolyticus* foi o SCCmec tipo I (MACHADO et al., 2007). Embora não se tenha abordado a tipagem de acordo com o SCCmec neste estudo, este assunto é um valioso objeto de estudo para pesquisas futuras visando a melhor compreensão da epidemiologia molecular dos estafilococos meticilina-resistentes.

Neste trabalho, a investigação de microrganismos resistentes à oxacilina foi realizada por quatro métodos. A detecção do gene *mecA* tem sido considerada como padrão-ouro para a verificação da resistência à oxacilina (ANTUNES et al., 2007; MARTINS & CUNHA, 2007; CLSI, 2008), já que é o teste que tem maior acurácia para predizer a resistência a esta droga. É também o método usado para confirmar os resultados dos testes fenotípicos de isolados causadores de infecções graves (CLSI, 2008).

O gene *mecA* foi encontrado em 56 isolados clínicos de ECN (88,88%). Hira e colaboradores (2007) também encontraram uma taxa próxima (87%) de ECN apresentando o

gene *mecA*. Houve coincidência entre os resultados dos três métodos fenotípicos de 73,01%, sendo que 34 dos isolados foram *S. epidermidis*. A presença/ausência do gene *mecA* nos isolados clínicos foi compatível com a resistência/sensibilidade no teste de triagem em ágar contendo oxacilina em 82,6% de *S. epidermidis* e em 70,58% para as outras espécies de ECN. A mesma comparação realizada entre a presença do gene *mecA* e os resultados do teste de difusão em disco contendo cefoxitina indicou 86,95% de compatibilidade para *S. epidermidis* e 76,47% para as demais espécies. A pesquisa de Secchi e colaboradores (2008) a respeito da resistência à meticilina em ECN não-epidermidis apontou sensibilidade e especificidade de 100% do método de difusão em disco contendo cefoxitina. Machado e colaboradores (2007) também encontraram resultados semelhantes no Brasil analisando 129 isolados de ECN oriundos da circulação sanguínea de pacientes, sendo que todos os resultados dos testes de cefoxitina foram compatíveis com a PCR para o gene *mecA*.

O CSLI (2008) recomenda que o teste de difusão em disco contendo cefoxitina seja utilizado para reportar os casos de resistência a esta droga, uma vez que as bactérias resistentes a elas são também resistentes aos demais antimicrobianos do grupo dos beta-lactâmicos e cefemas. Nosso trabalho revelou uma maior relação entre a presença do gene *mecA* e o teste de difusão em disco contendo cefoxitina, do que quando comparou-se à presença do gene *mecA* e o teste de triagem em ágar contendo oxacilina.

O teste de difusão em disco contendo cefoxitina mostrou a resistência de 34 *S. epidermidis* e a resistência intermediária de 3 *S. epidermidis*, além da resistência de 4 *S. haemolyticus*, 1 *S. simulans*, 1 *S. xylosum* e 1 *S. auricularis*. O CLSI (2008) estabelece que são resistentes neste teste os ECN com halos de inibição menores ou iguais a 24 mm de diâmetro e sensíveis aqueles com halos de inibição superiores ou iguais a 25 mm de diâmetro. No entanto, não há uma determinação de valores para a resistência intermediária. Como existe uma diferença sutil entre estes dois valores, pensamos ser conveniente determinar que os ECN com resistência intermediária seriam aqueles com os diâmetros dos halos de inibição superiores a 24 mm e menores que 25 mm.

Em alguns casos (2 *S. epidermidis* e 4 não-epidermidis) foi possível constatar que, apesar de a bactéria possuir o gene *mecA*, provavelmente não houve expressão deste gene, ou seja, a PBP2a não foi produzida, já que os testes fenotípicos de ágar contendo oxacilina e de difusão em disco contendo cefoxitina não indicaram resistência à oxacilina. Tem sido observado que embora o gene *mecA* esteja presente nos estafilococos, alguns fatores podem interferir na expressão do gene, não sendo possível a detecção fenotípica da resistência à

oxacilina mediada pela PBP2a (STAPLETON & TAYLOR, 2002). Estafilococos que possuem a resistência clássica devido ao gene *mecA* são também heterogêneas ou homogêneas na expressão da resistência. A presença de resistência em *S. aureus* no teste de triagem em ágar contendo oxacilina geralmente significa que o isolado é *mecA*-positivo. Ocasionalmente, a cepa *mecA*-positiva heterorresistente não é detectada pelo teste de triagem em ágar contendo oxacilina devido à baixa expressão de sua resistência (ANAND et al., 2009).

Devido à rara ocorrência de mecanismos de resistência à oxacilina diferentes do gene *mecA*, isolados negativos para o gene *mecA* ou os que não produzem a PBP2a, mas para os quais a CIM é maior ou igual a 4 µg/mL, devem ser reportados como oxacilina-resistentes (CLSI, 2008). Apesar de haver a possibilidade dos microrganismos expressarem a resistência à oxacilina a partir de outros mecanismos genéticos (STAPLETON & TAYLOR, 2002), isto parece não ter acontecido com os nossos isolados. Somente em três casos o gene *mecA* não foi detectado enquanto que o sistema automatizado Vitek, mas não os outros métodos fenotípicos, reconheceu a resistência à oxacilina. Provavelmente, isto poderia representar a necessidade de adaptações do *software* do aparelho Vitek, como sugerido por outros autores visando a correção dessa falta de correlação (FELTEN et al., 2002; CAEIRÃO et al., 2006).

Os estafilococos sensíveis à penicilina também são sensíveis a outras penicilinas, cefemas e carbapenenas aprovados para uso pelo FDA (*Food and Drug Administration*, EUA). Bactérias resistentes à penicilina e sensíveis à oxacilina são sensíveis a penicilinas termoestáveis, a combinações beta-lactâmico-inibidor de beta-lactamase, carbapenenas e cefemas relevantes. Os estafilococos resistentes à oxacilina são também resistentes às outras drogas beta-lactâmicas (CLSI, 2008), além de também serem resistentes a várias classes de agentes antimicrobianos, incluindo aminoglicosídeos, clindamicina, macrolídeos, fenicóis, quinolonas, sulfonamidas e tetraciclina (CLSI, 2008).

Os isolados de *S. epidermidis* que não apresentaram o gene *mecA* estavam entre os mais susceptíveis da espécie (QUADROS 2 e 5). Os isolados 6537/4, 7624/4 (*S. epidermidis*), 7712/5, 8603/5 (*S. haemolyticus*), 7769/5 (*S. capitis*) e 7470/5 (não identificado), embora susceptíveis à maioria das drogas antimicrobianas (QUADROS 2 e 3), apresentaram o gene *mecA*. Todos os isolados resistentes a pelo menos nove drogas possuíam o gene *mecA*, devendo-se concluir que a presença deste gene nos microrganismos pode representar grande risco à saúde, principalmente nos hospitais, mesmo que este gene seja apresentado apenas por portadores saudáveis.

Palazzo, Araújo e Darini (2005) verificaram no Brasil que o gene *mecA* estava presente em todos os 68 isolados examinados pela técnica da PCR. Faziam parte deste grupo de microrganismos oriundos de portadores sãos (funcionários de uma escola privada) e de parte da equipe médica em um hospital. Isto mostra que estes genes já estão também sendo disseminados para a comunidade, tendendo a uma disseminação mundial.

Sob o ponto de vista clínico, é importante diferenciar os isolados clínicos meticilina-resistentes e meticilina-sensíveis, pois isto irá influenciar diretamente na eficácia da antibioticoterapia.

As informações epidemiológicas sobre a susceptibilidade dos microrganismos aos biocidas, e sobre a distribuição dos genes de resistência podem ser úteis para o controle de infecções nosocomiais (NOGUCHI et al., 2005), visto que vários desinfetantes e anti-sépticos são usados para prevenir a disseminação destes microrganismos no ambiente hospitalar. O uso indiscriminado destes agentes tem favorecido a disseminação de cepas com susceptibilidade reduzida a estes agentes. Portanto, a pesquisa dos genes *qacA/B* tem sido usada para avaliar o potencial genético dos isolados clínicos envolvidos em casos de infecções nosocomiais. Vários trabalhos na literatura relatam altas porcentagens do gene *qacA/B* presente em isolados de *S. aureus* de origem hospitalar oriundos da Europa (42%) (MAYER et al., 2001), do Japão (45,9%) (NOGUCHI et al., 2006), do Brasil (80%) (MIYAZAKI et al., 2007), de Taiwan (35,4%) (SHENG et al., 2009) e da China (61,1%) (WANG et al., 2008).

Neste estudo a maioria dos isolados clínicos apresentou o gene *qacA/B* (65,08%), sendo este o primeiro relato envolvendo ECN no Brasil. As análises das seqüências dos genes *qacA* e *qacB* mostraram que existem apenas sete pares de bases diferentes, distribuídos ao longo dos genes, e que somente a alteração de um resíduo de aminoácido 323: Asp na proteína QacA e Ala na proteína QacB leva a mudanças no espectro de atividade da proteína QacB, que passa a apresentar reduzida ou mesmo inexistente resistência aos cátions divalentes. Essas alterações não podem ser visualizadas apenas pelas reações da PCR (MAYER et al., 2001).

Após a análise da presença dos genes *qacA/B* e *mecA*, alguns isolados clínicos foram selecionados para serem submetidos aos testes de susceptibilidade dos isolados clínicos ao composto quaternário de amônio. A concentração inibitória mínima (CIM) foi uma das técnicas usadas com esta finalidade. Os isolados clínicos resistentes a 10 ou mais drogas antimicrobianas e que possuíam os genes *mecA* e *qacA/B* mostraram uma baixa susceptibilidade ao desinfetante de acordo com os valores de CIM. Talvez fosse possível

sugerir uma relação entre estes fatores que determinariam a susceptibilidade dos microrganismos ao produto.

Existe uma associação entre a presença de genes de resistência à anti-sépticos e desinfetantes e a presença de genes de resistência a drogas antimicrobianas no mesmo microrganismo. *S. aureus* que apresentam o gene de resistência à gentamicina são menos susceptíveis aos anti-sépticos e desinfetantes, tendo como base a CIM (McDONNEL & RUSSEL, 1999). Experimentos de hibridização com os produtos da reação da PCR em *S. haemolyticus* mostraram que o gene *qacA* estava localizado no mesmo plasmídeo que os genes responsáveis pela produção das beta-lactamases, *blaZ* e *blaR* (ANTHONISEN et al., 2002). Essa relação também foi encontrada em isolados clínicos de *S. epidermidis* (SIDHU et al., 2002). Miyazaki e colaboradores (2007), embora não tenham se aprofundado em suas pesquisas genéticas para a avaliação da localização dos genes investigados, observaram que 80% dos *S. aureus* meticilina-resistentes, detectados através da PCR para o gene *mecA*, continham o gene *qacA/B*.

O isolado clínico que exibiu a segunda menor CIM e, portanto, seria considerado muito susceptível, foi o 6863/4. Porém, tal isolado continha o gene *qacA/B*. Neste caso não foi possível estabelecer uma relação entre a presença do gene *qacA/B* e a susceptibilidade reduzida ao desinfetante das bactérias isoladas no ambiente hospitalar. Já, outro isolado que não continha o gene *qacA/B*, o 6367/4, mostrou uma CIM de 2 ppm, valor este que não está entre as maiores CIM, mostrando a susceptibilidade do microrganismo ao desinfetante. Miyazaki (2006) não observou relação direta entre a presença do gene *qacA/B* e os valores de CIM em *S. aureus*, pois os isolados contendo ou não o gene não exibiram variações concretas da CIM.

Além disso, o isolado 7399/5, o único pertencente a uma espécie diferente de *S. epidermidis*, o qual não apresentou o gene *qacA/B* e o gene *mecA*, mostrou a menor CIM, correspondente a 0,5 ppm, significando que é realmente o isolado mais susceptível ao QAC, pois concentrações pequenas do produto são capazes de inibir o seu crescimento.

Todavia, após uma análise do teor do tensoativo catiônico do produto, pôde-se comprovar que a concentração informada na embalagem do produto não era verdadeira, mostrando a necessidade da realização do teste de CIM com base na concentração real do produto. A partir destes novos resultados, foi possível constatar, como esperado, que a CIM referente a alguns isolados clínicos (6601/4, 7559/5, 6863/4, 6367/4, 7399/5) reduziu (QUADRO 9), permanecendo a mesma para os demais.

A susceptibilidade dos microrganismos foi avaliada também pelo método da Diluição de Uso (BELOIAN, 1990) oficialmente adotado no Brasil (BRASIL, 1988). Este método foi aplicado aos mesmos isolados clínicos, para os quais a CIM havia sido determinada. Nenhum dos sete isolados clínicos apresentou susceptibilidade reduzida ao desinfetante, o que pode ser observado pela ausência de crescimento ou mesmo pela presença de crescimento de ECN em apenas um dos 60 cilindros utilizados como carreadores. Esta técnica é utilizada para verificação da qualidade dos desinfetantes dispostos à venda no Brasil, frente a cepas de referência. Nela a concentração do produto é a mesma a ser aplicada durante o uso deste produto nas rotinas de desinfecção hospitalares, sendo significativamente maior do que aquela utilizada nos experimentos da CIM. Todos os ensaios referentes à Diluição de Uso foram realizados aplicando-se a diluição corrigida do produto em estudo, porém, alertamos para o risco sanitário relacionado à venda deste produto, que mesmo não se enquadrando dentro dos padrões de qualidade exigidos pela legislação brasileira, está disposto à venda e pode estar levando à seleção de isolados clínicos menos susceptíveis ao desinfetante, principalmente no ambiente hospitalar.

Ultimamente, o desenvolvimento e o uso de métodos de tipagem molecular baseados na análise direta do polimorfismo genômico têm enriquecido o entendimento da história evolucionária, e dos padrões de disseminação dos microrganismos (MIRAGAIA et al., 2008), já que durante a história evolucionária dos mesmos, os isolados pertencentes a uma determinada espécie se diversificam através de mutações pontuais, recombinação ou aquisição/deleção de elementos genéticos móveis, resultando em uma grande diversidade genômica e fenotípica.

O PFGE, método considerado padrão-ouro para caracterização de *S. epidermidis*, foi utilizado nesse estudo para a realização da investigação do perfil molecular dos isolados clínicos identificados como *S. epidermidis* objetivando verificar a clonalidade entre os mesmos. Nessa análise foi utilizado o critério de interpretação estabelecido por Tenover e colaboradores (1995), o que revelou uma considerável diversidade genética dentro da população estudada, onde foram encontrados 24 perfis clonais diferentes de *S. epidermidis* entre os 46 investigados. Destes, 21,74% pertenceram ao mesmo tipo clonal (A1, A2 e A3). O subtipo A1 foi considerado como sendo a cepa-surto.

Neste trabalho, os únicos perfis clonais que continham isolados meticilina-sensíveis, baseado na ausência do gene *mecA* foram R, U e Z, portanto não foi possível inferir correlação entre a resistência à meticilina/oxacilina e os demais tipos clonais encontrados. Os

isolados clínicos resistentes a menos de seis drogas antimicrobianas pertenceram aos tipos clonais K, U e Z. Dentre estes, apenas o tipo clonal K apresentou o gene *mecA*.

Vários estudos têm sido conduzidos com o objetivo de determinar a clonalidade entre cepas de *S. epidermidis* (JOHANSSON et al., 2006; SAIDA et al., 2006; IBRAHEM et al., 2008; MIRAGAIA et al., 2008), principalmente associando a técnica de PFGE com outras técnicas de tipagem molecular, como *multilocus sequence typing* (MLST), *multiple-locus variable-number tandem repeat analysis* (MLVA) e tipagem pelo cassete cromossomal de estafilococos (SCCmec). A maioria dos resultados obtidos foi congruente com aqueles apresentados pelo PFGE, mas outros trabalhos não recomendam a utilização de algumas técnicas. Porém, as principais críticas ao PFGE se referem ao seu alto custo, e a dificuldade de interpretação e da troca de dados obtidos pela tipagem, porque de acordo com os autores, essa interpretação depende de um modelo de bandas, que apesar de possuir alto poder de discriminação, possui interpretação trabalhosa e muitas vezes subjetiva diante da existência de bandas pouco definidas presente no gel, além da difícil execução para a maioria dos laboratórios clínicos (JOHANSSON et al., 2006; SAIDA et al., 2006; IBRAHEM et al., 2008; MIRAGAIA et al., 2008).

Embora a técnica de PFGE possa permitir uma melhor compreensão sobre a transferência de patógenos e seus genes de resistência aos antimicrobianos e a desinfetantes entre pacientes do mesmo hospital, não foi possível estabelecer uma relação entre os perfis clonais e a presença dos genes *qacA/B*, que confere resistência aos compostos quaternários de amônio, e *mecA*, que confere resistência à meticilina.

A resistência cruzada entre patógenos no ambiente hospitalar é um problema sério, pois representa uma transferência de microrganismos presentes nestes ambientes entre pacientes através de instrumentos hospitalares ou através de um intermediário, o profissional da saúde. O CDC enfatiza que medidas simples como a lavagem das mãos e o uso de anti-sépticos devam ser utilizadas visando reduzir a disseminação de microrganismos hospitalares, diminuindo assim, a ocorrência das infecções hospitalares (CDC, 2002c). É também necessário controlar o uso de desinfetantes e drogas antimicrobianas para evitar a seleção e a disseminação de microrganismos resistentes no ambiente hospitalar.

Alertamos para o risco da disseminação de microrganismos potencialmente patogênicos ou não, em pacientes imunodeprimidos ou portadores sãos, em hospitais ou na comunidade, representando sem dúvida um perigo para a saúde pública.

## 6. CONCLUSÕES

1. Espécies de estafilococos coagulase-negativa frequentemente relacionadas a infecções hospitalares foram encontradas, prevalecendo *S. epidermidis*, e, em seguida *S. haemolyticus*.
2. Os ECN foram, em sua maioria, isolados do sangue dos pacientes, envolvendo, principalmente *S. epidermidis*, espécie isolada com maior frequência destes espécimes clínicos.
3. Mesmo utilizando mais de um método de identificação, um isolado clínico não pôde ser identificado, o que poderia ser explicado pela deficiência de detecção pelos métodos empregados.
4. Multi-resistência foi encontrada e o mesmo perfil de susceptibilidade foi observado para isolados clínicos de *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. simulans*, *S. xylosus* e o isolado não identificado, o que poderia estar relacionado com a transferência de genes de resistência no ambiente hospitalar.
5. Um isolado de *S. epidermidis* apresentou susceptibilidade reduzida à vancomicina, alertando para o perigo da redução de opções de tratamento de infecções causadas por ECN, já que hoje a vancomicina representa uma das poucas alternativas terapêuticas para infecções causadas por ECN meticilina-resistentes.
6. Verificou-se no isolado que apresentou susceptibilidade reduzida à vancomicina uma associação entre a resistência à oxacilina e a susceptibilidade reduzida à vancomicina, conforme tem sido descrito.
7. A PCR para o gene *mecA*, considerada como padrão-ouro para a detecção da resistência à oxacilina/meticilina, revelou uma alta porcentagem de ECN meticilina-resistentes (88,88%).
8. Comparando os métodos fenotípicos e o método genotípico, empregados para a detecção de resistência à meticilina, o teste da difusão em disco contendo cefoxitina indicou maior compatibilidade com os resultados apresentados pelo método genotípico, que o teste de triagem em ágar contendo oxacilina, confirmando as orientações do CLSI (2008).

9. A resistência à oxacilina, comprovada pela presença do gene *mecA*, não foi verificada em todos os isolados de ECN pelos testes fenotípicos, o que poderia estar sendo influenciado por fatores que interferem com a expressão do gene ou devido à baixa expressão da resistência em isolados heterorresistentes.
10. O sistema Vitek apresentou resultados positivos em três isolados que não continham o gene *mecA*, indicando uma necessidade de aprimoramento dos testes deste sistema.
11. Constatou-se uma correlação entre a presença do gene *mecA* e a multi-resistência, uma vez que todos os isolados que apresentaram o gene *mecA* eram resistentes a nove ou mais drogas antimicrobianas.
12. O gene *qacA/B*, gene responsável pela resistência aos compostos quaternários de amônio, esteve presente em uma alta taxa dos ECN obtidos no ambiente hospitalar (65,08%), fato este verificado ultimamente para *S. aureus* em alguns países.
13. Isolados que possuíam os genes *mecA* e *qacA/B*, resistentes a 10 drogas antimicrobianas ou mais, apresentaram os maiores valores de CIM, mostrando uma menor susceptibilidade ao composto quaternário de amônio.
14. Conforme descrito na literatura, não foi possível estabelecer uma relação entre a presença ou a ausência do gene *qacA/B* e os valores de CIM para o desinfetante neste trabalho, pois o isolado 6863/4, embora portador do gene *qacA/B*, exibiu a menor CIM.
15. Em contrapartida, o isolado 7399/5, cuja CIM foi uma das maiores apresentou o gene *qacA/B* e, neste caso, foi possível estabelecer uma relação.
16. A análise do teor do tensoativo catiônico do produto revelou que sua concentração era inferior à declarada, não sendo compatível com as exigências da legislação brasileira, e essa alteração do teor do princípio ativo poderá colaborar para a seleção de microrganismos menos susceptíveis a eles nos hospitais.
17. Pela aplicação do Método da Diluição de Uso, o qual testa o produto na concentração recomendada pelo fabricante, os resultados foram satisfatórios usando-se a correção da concentração do princípio ativo, mas é fundamental que se pense que a diluição incorreta do produto ou mesmo a venda de produtos apresentando alteração do teor em relação ao declarado, assim como o tempo de contato reduzido poderiam levar à

seleção de microrganismos menos susceptíveis aos desinfetantes, anti-sépticos ou drogas antimicrobianas.

18. A análise dos fragmentos de DNA por PFGE detectou 24 tipos clonais diferentes dentre os 46 isolados de *S. epidermidis*, uma considerável diversidade genômica dentro do mesmo hospital.
19. Não foi possível inferir relação entre a resistência à metilina/oxacilina e os tipos clonais de *S. epidermidis* encontrados.
20. Apesar da técnica do PFGE ser a de maior poder de discriminação entre os clones, e ser capaz de gerar informações sobre a possível transferência de genes de resistência a drogas antimicrobianas e a biocidas, em nosso estudo não foi possível estabelecer uma relação entre os perfis clonais e a presença dos genes *qacA/B* e *mecA*.

**REFERÊNCIAS**

ADAIR, F.W.; GEFTIC, S.G.; GELZER, J. Resistance of *Pseudomonas* to quaternary ammonium compounds. **Appl. Microbiol.**, v. 18, n. 3, p. 299-302, 1969.

AGVALD-ÖLMAN, C.; LUND, B.; EDLUND, C. Multiresistant coagulase-negative staphylococci disseminate frequently between intubated patients in a multidisciplinary intensive care unit. **Crit. Care**, v. 8, n. 1, p. R42-R47, 2004.

AL-MASAUDI, S.B.; DAY, M.J.; RUSSEL, A.D. Sensitivity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains to some antibiotics, antiseptics and disinfectants. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 65, n. 4, p. 329-337, 1988.

AL-MASAUDI, S.B.; DAY, M.J.; RUSSELL, A.D. Antimicrobial resistance and gene transfer in *Staphylococcus aureus*. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 70, n. 4, p. 279 – 290, 1991.

ANAND, K.B. et al. Comparison of cefoxitin disc diffusion teste, oxacillin screen agar, and PCR for *mecA* gene for detection of MRSA. **Indian J. Med. Microbiol.**, v. 27, n. 1, p. 27-29, 2009.

ANDERL, J.N. et al. Role of nutrient limitation and stationary-phase existence in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 47, n. 4, p. 1251-1256, 2003.

ANTHONISEN, -L.I. et al. Organization of the antiseptic resistance gene *qacA* and Tn552-related  $\beta$ -lactamase genes in multidrug-resistant *Staphylococcus haemolyticus* strains of animal and human origins. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 46, n. 11, p. 3606-3612, 2002.

ANTUNES, A.N.S. et al. Evaluation of oxacillin and cefoxitin disks for detection of resistance in coagulase negative staphylococci. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 6, p. 719-723, 2007.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Rede Nacional de Monitoramento e Controle da Resistência Microbiana em serviços de saúde. Rede RM. Perfil de suscetibilidade dos microrganismos: Análise de dados de 2006 e 2007. 2008. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/rede\\_rm/2008/agosto/relatorio\\_editorial.pdf](http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/rede_rm/2008/agosto/relatorio_editorial.pdf)>. Acesso em: 6 jan. 2009.

ARCHER, G.L. Alteration of cutaneous staphylococcal flora as a consequence of antimicrobial prophylaxis. **Rev. Infect. Dis.**, v. 13, suppl. 10, p. S805-S809, 1991.

ARCHER, G.L.; CLIMO, M.W. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 38, n. 10, p. 2231-2237, 1994.

ARCHER, G.L.; POLKE, R.E. Approach to therapy for bacterial diseases. In: KASPER, D. L.; FAUCI, A.S.; LONGO, D.L.; BRAUNWALD, E.; HAUSER, S.L.; JAMESON, J.L. (Org.). **Harrison's Principals of Internal Medicine**, 16. ed. New York: McGraw-Hill, 2005. p. 789-806.

BAIO, Paulo Victor Pereira. **Identificação bioquímica e caracterização molecular de bactérias Corineformes e Nocardioformes de origem ambiental**. Rio de Janeiro, RJ. Apresentada como tese de mestrado, Programa de Pós-graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, 2007.

BAUER, T.M. et al. An epidemiological study assessing the relative importance of airborne and direct contact transmission of microorganisms in a medical intensive care unit. **J. Hosp. Infect.**, v. 15, n. 4, p. 301-309, 1990.

BAVEJA, J.K. et al. Biological performance of a novel synthetic furanone-based antimicrobial. **Biomaterials**, v. 25, n. 20, p. 5013-5021, 2004a.

BAVEJA, J.K. et al. Furanones as potential anti-bacterial coatings on biomaterials. **Biomaterials**, v. 25, n. 20, p. 5003-5012, 2004b.

BELOIAN, A. Disinfectants. In: **Association of Official Analytical Chemists (AOAC)**. Official Methods of Analysis, 15. ed. Washington: Arlington, 1990. cap. 6, p. 133-146.

BERGLUND, C.; SÖDERQUIST, B. The origin of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate at a neonatal ward in Sweden-possible horizontal transfer of a staphylococcal cassette chromosome *mec* between methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus aureus*. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 14, n. 11, p. 1048-1056, 2008.

BIAVASCO, F.; VIGNAROLI, C.; VARALDO, P.E. Glycopeptide resistance in coagulase-negative staphylococci. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 19, n. 6, p. 403-417, 2000.

BRANDT, C.M. et al. Effective treatment of cephalosporin-rifampin combinations against cryptic methicillin-resistant  $\beta$ -lactamase-producing coagulase-negative staphylococcal experimental endocarditis. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 39, n. 8, p. 1815-1819, 1995.

BRASIL. Lei nº 9.431, de 6 de janeiro de 1997. Dispõe sobre a obrigatoriedade de manutenção de programa de controle de infecções hospitalares pelos hospitais do país. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 7 jan. 1997. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=587>>. Acesso em: 20 jan. 2009.

BRASIL. Lei nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 27 jan. 1999. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=182>>. Acesso em: 19 jan. 2009.

BRASIL. Portaria nº15, de 23 de agosto de 1988. Determina que o registro de produtos saneantes domissanitários com finalidade antimicrobiana seja procedido de acordo com as normas regulamentares. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 05 set. 1988. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/search.php>>. Acesso em: 28 fev. 2009.

BRÖZEL, V.S.; CLOETE, T.E. Resistance of bacteria from cooling waters to bactericides. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 8, n. 4, p. 273-276, 1991.

BRYAN, C.S. Clinical implications of positive blood cultures. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 2, n. 4, p. 329-353, 1989.

CAIERÃO, J. et al. Automated systems in the identification and determination of methicillin resistance among coagulase negative staphylococci. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 3, p. 277-280, 2006.

CARLOS, C.C. et al. Nosocomial *Staphylococcus epidermidis* septicemia among very low birth weight neonates in an intensive care unit. **J. Hosp. Infect.**, v. 19, n. 3, p. 201-207, 1991.

CARSENTI-ETESSE, H. et al. Effect of subinhibitory concentrations of cefamandole and cefuroxime on adherence of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* to polystyrene culture plates. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 11, n. 8, p. 732-737, 1992.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Reduced susceptibility of *Staphylococcus aureus* to vancomycin - Japan, 1996. **MMWR**, v. 46, n. 27, p. 624-626, 1997a.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Update: *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin - United States. **MMWR**, v. 46, n. 35, p. 813-815, 1997b.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Public health dispatch: vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. **MMWR**, v. 51, n. 40, p. 902, 2002a.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin. **MMWR**, v. 51, n. 26, p. 565-567, 2002b.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Guideline for hand hygiene in health-care settings: Recommendations of the healthcare infection control practices advisory committee and the HICPAC/SHEA/APIC/IDSA/Hand Hygiene Task Force. 2002c. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/handhygiene>>. Acesso em: 29 dec. 2008.

CERCA, N. et al. The relationship between inhibition of bacterial adhesion to a solid surface by sub-MICs of antibiotics and subsequent development of a biofilm. **Res. Microbiol.**, v. 156, n. 5-6, p. 650-655, 2005.

CHAMBERS, H.F. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 10, n. 4, p. 781-791, 1997.

CHANG, M.R. et al. Surveillance of pediatric infections in a teaching hospital in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 7, n. 2, p. 149-160, 2003.

CHANG, W.N. et al. Epidemiology of adult staphylococcal meningitis in southern Taiwan: a clinical comparison of *Staphylococcus aureus* infection and coagulase-negative staphylococcal infection. **Jpn. J. Infect. Dis.**, v. 60, n. 5, p. 262-266, 2007.

CHAPMAN, R.G et al. Polymeric thin films that resist the adsorption of proteins and the adhesion of bacteria. **Langmuir**, v. 17, n. 4, p. 1225-1233, 2001.

CHOO, M.H. et al. Permanent pacemaker infections: characterization and management. **Am. J. Cardiol.**, v. 48, n. 3, p. 559-564, 1981.

CIMIOTTI, J.P. et al. Prevalence and clinical relevance of *Staphylococcus warneri* in the neonatal intensive care unit. **Infect. Control. Hosp. Epidemiol.**, v. 28, n.3, p. 326-330, 2007.

CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard – seventh edition. M7-A7.** Wayne, Pennsylvania: CLSI, 2006a.

CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI approved standard M100-S16.** Wayne, Pennsylvania: CLSI, 2006b.

CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; eighteenth edition information supplement. M100-S18.** Wayne, Pennsylvania: CLSI, 2008.

COLLEEN, S. et al. Surface properties of *Staphylococcus saprophyticus* and *Staphylococcus epidermidis* as studied by adherence tests and two-polymer, aqueous phase systems. **Acta Pathol. Microbiol. Scand. [B]**, v. 87, n. 6, p. 321-328, 1979.

CORREA, J.E. et al. First report of qacG, qacH and qacJ gene in *Staphylococcus haemolyticus* humans clinical isolates. **J. antimicrob. Chemother.**, v. 61, n. 5, p. 956-960, 2008.

COSTA, E.A.; ROSENFELD, S. Constituição da Vigilância Sanitária no Brasil. In: ROSENFELD, S. (Org). **Fundamentos da vigilância sanitária.** 1. ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2001. p. 15-48.

COZAD, A.; JONES, R.D. Disinfection and the prevention of infectious disease. **Am. J. Infect. Control.**, v. 31, n. 4, p. 243-254, 2003.

CUNHA, M.L.R.S. et al. Clinical significance of coagulase-negative staphylococci isolated from neonates. **J. Pediatr.**, v. 78, n. 8, p. 279-288, 2002.

DE ALLORI, M.C.G. et al. Antimicrobial resistance and production of biofilms in clinical isolates of coagulase-negative *Staphylococcus* strains. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 29, n. 8, p. 1592-1596, 2006.

DEIGHTON, M.; BORLAND, R. Regulation of slime production in *Staphylococcus epidermidis* by iron limitation. **Infect. Immunity**, v. 61, n. 10, p. 4473-4479, 1993.

DEL'ALAMO, L. et al. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci and characterization of isolates with reduced susceptibility to glycopeptides. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 34, n. 3, p. 185-191, 1999.

DE LENCASTRE, H. et al. Multiple mechanisms of methicillin resistance and improved methods for detection in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 35, n. 4, p. 632-639, 1991.

DE PAULIS, A.N. et al.. Five-test simple scheme for species-level identification of clinically significant coagulase-negative staphylococci. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, n. 3, p. 1219-1224, 2003.

DOMENICO, P. et al. Activities of bismuth thiols against staphylococci and staphylococcal biofilms. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 45, n. 5, p. 1417-1421, 2001.

DONLAN, R.M.; COSTERTON, J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 15, n. 2, p. 167-193, 2002.

EMORI, T.G.; GAYNES, R.P. An overview of nosocomial infections, including the role of microbiology laboratory. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 6, n. 4, p. 428-442, 1993.

ENDTZ, H.P. et al. Vancomycin resistance: status quo and quo vadis. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 18, n. 10, p. 683-690, 1999.

ESHALI, H. et. Septicaemia with coagulase negative staphylococci in a neonatal intensive care unit. Risk factors for infection and antimicrobial susceptibility of the bacterial strains. **Acta Paediatr. Scand. Suppl.**, v. 360, suppl., p. 127-134, 1989.

EYKYN, S.J.; GRANSDEN, W.R.; PHILLIPS, I. The causative organisms of septicaemia and their epidemiology. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 25, suppl. C, p. 41-58, 1990.

FARBER, B.F.; WOLFF, A.G. The use of nonsteroidal antiinflammatory drugs to prevent adherence of *Staphylococcus epidermidis* to medical polymers. **J. Infect. Dis.**, v. 166, n. 4, 861-865, 1992.

FELTEN, A. et al. Evaluation of three techniques for detection of low-level methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a risk diffusion method with cefoxitin and moxalactam, the Vitek 2 system, and the MRSA-screen latex agglutination test. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, n. 8, p. 2766-2771, 2002.

FERRARA, A. et al. Effect of different combinations of sparfloxacin, oxacilin and fosfomycin against methicillin-resistant staphylococci. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 16, n. 7, p. 535-537, 1997.

FREBOURG, N.B. et al. PCR-based assay for discrimination between invasive and contaminating *Staphylococcus epidermidis* strains. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, n. 2, p. 877-880, 2000.

FREEMAN, J. et al. Birth weight and length of stay as determinants of nosocomial coagulase-negative staphylococcal bacteremia in neonatal intensive care unit populations: potential for confounding. **Am. J. Epidemiol.**, v. 132, n. 6, p. 1130-1140, 1990.

GIRIDHAR, G. et al. Inhibition of staphylococcus adherence to biomaterials by extracellular slime of *S. epidermidis* RP12. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 28, n. 11, p. 1289-1294, 1994.

GÖTZ, F. *Staphylococcus* and Biofilms. **Mol. Microbiol.**, v. 43, n. 6, p. 1367-1378, 2002.

HALL, R.T. et al. Characteristics of coagulase-negative staphylococci from infants with bacteremia. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 6, n. 4, p. 377-383, 1987.

HAMMOND, S.A.; MORGAN, J.R.; RUSSEL, A.D. Comparative susceptibility of hospital isolates of Gram-negative bacteria to antiseptics and disinfectants. **J. Hosp. Infect.**, v. 9, n. 3, p. 255-264, 1987.

HEILMANN, C. et al. Molecular basis of intracellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. **Mol. Microbiol.**, v. 20, n. 5, p. 1083-1091, 1996.

HEIR, E.; SUNDHEIM, G.; HOLCK, A.L. The staphylococcus *qacH* gene product: a new member of the SMR family encoding multidrug resistance. **FEMS Microbiol. Lett.**, n. 163, n. 1, p. 49-56, 1998.

HEIR, E.; SUNDHEIM, G.; HOLCK, A.L. Identification and characterization of quaternary ammonium compound resistant staphylococci from the food industry. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 48, n. 3, p. 211-219, 1999a.

HEIR, E.; SUNDHEIM, G.; HOLCK, A.L. The *qacG* gene on plasmid pST94 confers resistance to quaternary ammonium compounds in staphylococci isolated from the food industry. **J. Appl. Microbiol.**, v. 86, n. 3, p. 378-388, 1999b.

HERRMANN, M. et al. Thrombospondin binds to *Staphylococcus aureus* and promotes staphylococcal adherence to surfaces. **Infect. Immun.**, v. 59, n. 1, p. 279-288, 1991.

HIRA, V. et al. Clinical and molecular epidemiology characteristics of coagulase-negative staphylococcal bloodstream infections in intensive care neonates. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 26, n. 7, p. 607-612, 2007.

HIRAMATSU, K. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 40, n. 1, p. 135-136, 1997.

HJELM, E.; LUNDELL-ETHERDEN, I. Slime production by *Staphylococcus saprophyticus*. **Infect. Immun.**, v. 59, n. 1, p. 445-448, 1991.

HO, J.J. Late onset infection in very low birth weight infants in Malaysian level 3 neonatal nurseries. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 20, n. 6, p. 557-560, 2001.

HOPE, R. et al. BSAC Working Parties on Resistance Surveillance. Non-susceptibility trends among staphylococci from bacteremias in the UK and Ireland, 2001-06. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 62, suppl. 2, p. 65-74, 2008.

HUEBNER, J.; GOLDMANN, D.A. Coagulase-negative staphylococci: role as pathogens. **Annu. Rev. Med.**, v. 50, p. 223-236, 1999.

HUGO, W.B.; RUSSEL, A.D. Types of antimicrobial agents. In: RUSSEL, A.D.; HUGO, W.B.; AYLIFFE, G.A.L. (Org). **Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization**. 2. ed. Oxford, United Kingdom: Blackwell Science, 1992. cap. 2, p. 7-88.

IBRAHEM, S. et al. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strains from bacteraemic patients. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 14, n. 11, p. 1020-1027, 2008.

ITO, T. et al. Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. **Drug Resist. Updat.**, v. 6, n. 1, p. 41-52, 2003.

JANSEN, B. et al. In-vitro efficacy of a central venous catheter complexed with iodine to prevent bacterial colonization. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 30, n. 2, p. 135-139, 1992.

JOHANSSON, A. et al. Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeated Analysis for typing of *Staphylococcus epidermidis*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, n. 1, p. 260-265, 2006.

KACICA, M.A. et al. Prevention of gram-positive sepsis in neonates weighing less than 1500 grams. **J. Pediatr.**, v. 125, n. 2, p. 253-258, 1994.

KAPLAN, J.B. et al. Enzymatic detachment of *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 48, n. 7, p. 2633-2636, 2004.

KLOOS, W.E.; BANNERMAN, T.L. Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 7, n., p. 117-40, 1994.

KRCMERY, V. et al. Nosocomial bacteremia due to vancomycin-resistant *Staphylococcus epidermidis* in four patients with cancer, neutropenia, and previous treatment with vancomycin. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 15, n. 3, p. 259-261, 1996.

KREDIET, T.G. et al. Molecular epidemiology of coagulase-negative staphylococci causing sepsis in neonatal intensive care unit over a 11-year period. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, n. 5, p. 992-995, 2004.

KRUEGER, W.A. et al. Treatment of meningitis due to methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* with linezolid. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, n. 2, p. 929-932, 2004.

LANGSRUD, S.; SUNDHEIM, G. Factors contributing to the survival of poultry associated *Pseudomonas* spp. exposed to a quaternary ammonium compound. **J. Appl. Microbiol.**, v. 82, n. 6, p. 705-712, 1997.

LASA, I. et al. Bacterial biofilms and Infection. **An. Sist. Sanit. Navar.**, v. 28, n. 2, p. 163-175, 2005.

LEELAPORN, A. et al. Multidrug resistance to antiseptics and disinfectants in coagulase-negative staphylococci. **J. Med. Microbiol.**, v. 40, n. 3, p. 214-220, 1994.

LINA, B. et al. Comparison of coagulase-negative staphylococci by pulsed-field electrophoresis. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 71, n. 2, p. 133-138, 1992.

LITTLEJOHN, T.G. et al. Substrate specificity and energetics of antiseptic and disinfectant resistance in *Staphylococcus aureus*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 74, n. 2-3, p. 259-265, 1992.

LOZA, E. et al. Comparative in vitro activity of daptomycin against Gram-positive microorganisms: SENTRY surveillance program, Spain (2002-2006). **Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.**, v. 26, n. 8, p.489-494, 2008.

LOWY, F.D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. **J. Clin. Invest.**, v. 111, n. 9, p. 1265-1273, 2003.

LOWY, F.D. Staphylococcal infections. In: KASPER, D.L., FAUCI, A.S., LONGO, D.L., BRAUNWALD, E., HAUSER, S.L.; JAMESON, J.L. (Org.). **Harrison's Principals of Internal Medicine**. 16. ed. New York: McGraw-Hill, 2005. p. 814-823.

MACHADO, A.B.M.P. et al. Distribution of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) types I, II, III and IV in coagulase-negative staphylococci from patients attending a tertiary hospital in southern Brazil. **J. Med. Microbiol.**, v. 56, p. 1328-1333, 2007.

MANUAL DA QUALIDADE. Método da Diluição de Uso. Rev. 08. In: MANUAL da Qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2006. Seção 10. 21 p. (65.3210.007).

MANUAL DA QUALIDADE. Determinação do Teor de Tensoativos Aniônicos e Catiônicos. In: MANUAL da Qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/ FIOCRUZ, 2005. Seção 10. 6p. (65.3110.014).

MARSHALL, S.A. et al. *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci from blood stream infections: frequency of occurrence, antimicrobial susceptibility, and molecular (*mecA*) characterization of oxacillin resistance in the SCOPE program. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 30, n. 3, p. 205-214, 1998.

MARTINS, A.; CUNHA, M.L. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci: epidemiological and molecular aspects. **Microbiol. Immunol.**, v. 51, n. 9, p. 787-795, 2007.

MATTOS, E.M. et al. Isolation of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from patients undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD) and comparison of different molecular techniques for discriminating isolates of *Staphylococcus epidermidis*. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 45, n. 1, p. 13-22, 2003.

MAYER, S. et al. Distribution of the antiseptic resistance genes *qacA*, *qacB* and *qacC* in 497 methicillin-resistant and -susceptible European isolates of *Staphylococcus aureus*. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 47, n. 6, p. 896-897, 2001.

McDONNELL, G.; RUSSEL, A.D. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 12, n. 1, p. 147-179, 1999.

McGEE, D.C.; GOULD, M.K. Preventing complications of central venous catheterization. **N. Engl. J. Med.**, v. 348, n. 12, p. 1123-1133, 2003.

MEHROTRA, M; WANG, G.B.; JOHNSON, W.M. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, n. 3, p. 1032-1035, 2000.

MERIANOS, J.J. Surface-active agents. In: BLOCK, S.S. (Org.). **Desinfection, Sterilization and Preservation**. 5. ed. Phyladelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. p. 283-320.

MIRAGAIA, M. et al. Comparison of molecular typing methods for characterization of *Staphylococcus epidermidis*: proposal for clone definition. **J. Clin. Microbiol.**, v. 46, n. 1, p. 118-129, 2008.

MIYAZAKI, Neide Hiromi Tokumaru. **Análise molecular associada ao estudo dos genes de resistência em *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina.** Rio de Janeiro, RJ. Apresentada como tese de doutorado, Programa de Pós-graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, 2006.

MIYAZAKI, N.H.T. et al. The presence of *qacA/B* gene in Brazilian methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 4, p. 539-540, 2007.

MONZÓN, M. et al. Synergy of different antibiotic combinations in biofilms of *Staphylococcus epidermidis*. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 48, n. 6, p. 793-801, 2001.

MONZÓN, M. et al. Biofilm testing of *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates: low performance of vancomycin in relation to other antibiotics. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 44, n. 4, p. 319-324, 2002.

MUNSON, E.L.; HEARD, S.O.; DOERN, G.V. In vitro exposure of bacteria to antimicrobial impregnated-central venous catheters does not directly lead to the emergence of antimicrobial resistance. **Chest**, v. 126, n. 5, p. 1628-1635, 2004.

NAYAK, N. et al. Phenotypic and plasmid pattern analysis of *Staphylococcus epidermidis* in bacterial keratitis. **Indian J. Ophthalmol.**, v. 55, n. 1, p. 9-13, 2007.

NCCLS - NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbico; norma aprovada M7-A6.** 6. ed. Wayne, Pennsylvania: NCCLS, 2003.

NIES, D.H.; SILVER, S. Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances. **J. Indust. Microbiol.**, v. 14, n. 2, p. 186-199, 1995.

NIKAIIDO, H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 67 n. 4, p. 593-656, 2003.

NIKAIDO, H.; VAARA, M. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. **Microbiol. Rev.**, v. 49, n. 1, p. 1-32, 1985.

NOGUCHI, N. et al. Antimicrobial agent of susceptibilities and antiseptic resistance gene distribution among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from patients with impetigo and staphylococcal scalded skin syndrome. **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, n. 6, p. 2119-2125, 2006.

NOGUCHI, N. et al. Susceptibilities to antiseptic agents and distribution of antiseptic-resistance genes *qacA/B* and *smr* of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated in Ásia during 1998 and 1999. **J. Med. Microbiol.**, v. 54, n. 6, p. 557-565, 2005.

NUNES, Ana Paula Ferreira. ***Staphylococcus* coagulase-negativos: diferenciação em espécies, diversidade genômica de espécies resistentes à oxacilina e determinação da susceptibilidade a glicopeptídeos.** Rio de Janeiro, RJ. Apresentada como dissertação de mestrado, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2000.

NUNES, A.P.F. et al. Heterogeneous resistance to vancomycin and teicoplanin among *Staphylococcus* spp. isolated from bacteremia. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 11, n. 3, p. 345-350, 2007.

OLIVEIRA, A.D.D. et al. Laboratory detection methods for methicillin resistance in coagulase negative *Staphylococcus* isolated from ophthalmic infections. **Arq. Bras. Oftalmol.**, v. 70, n. 2, p. 667-675, 2007.

PAGANO, P.J. et al. Effects of linezolid on staphylococcal adherence versus time of treatment. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 23, n. 3, p. 226-234, 2004.

PALAZZO, I.C.V.; ARAÚJO, M.L.C.; DARINI, A.L.C. First report of vancomycin-resistant staphylococci isolated from health carriers in Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, n. 1, p.179-185, 2005.

PAULSEN, I.T. et al. Multidrug resistance proteins QacA and QacB from *Staphylococcus aureus*: membrane topology and identification of residues involved in substrate specificity. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 93, n. 8, p. 3630-3635, 1996.

PEARCE, C.L. et al. Clonal diversity of vancomycin-resistant enterococci from an outbreak in a tertiary care university hospital. **Am. J. Infect. Control**, v. 26, n. 6, p. 563-568, 1998.

RAAD, I. et al. *In vitro* antimicrobial efficacy of silver iontophoretic catheter. **Biomaterials**, v. 17, n. 11, p. 1055-1059, 1996.

RAYMOND, J.; VEDEL, G.; BERGERET, M. In-vitro bactericidal activity of ceftiofime in combination with vancomycin against *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 38, n. 6, p. 1067-1071, 1996.

ROMÃO, C.M.A. Desinfecção e esterilização química. In: TEIXEIRA, P., VALE, S. (Org.). **Biossegurança - Uma Abordagem Multidisciplinar**. 1. ed., Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 1996. p. 133-162.

ROMÃO, C.M.C.P.A. et al. Susceptibility of clinical isolates of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* to a hospital disinfectant and molecular typing. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 5, p. 541-548, 2005.

ROSS, T.L. et al. Methicillin-Resistant *Staphylococcus caprae* in a neonatal intensive care unit. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, n. 1, p. 363-367, 2005.

RUBINSTEIN, E.; BOMPART, F. Activity of quinupristin/dalfopristin against Gram-positive bacteria: clinical applications and therapeutic potential. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 39, suppl. A, p. 139-143, 1997.

RUPP, M.E. et al. Effect of a second-generation venous catheter impregnated with chlorhexidine and silver sulfadiazine on central catheter-related infections: A randomized, controlled trial. **Ann. Intern. Med.**, v. 143, n. 8, p. 570-580, 2005.

RUSSELL, A.D. Plasmids and bacterial resistance to biocides. **J. Appl. Microbiol.**, v. 83, n. 2, p. 155-165, 1997.

RUSSELL, A.D. Bacterial resistance to disinfectants: present knowledge and future problems. **J. Hosp. Infect.**, v. 43, suppl. 1, p. S57-S58, 1998.

SADER, H.S.; JOHNSON, D.M.; JONES, R.N. In vitro activities of the novel cephalosporin LB 11058 against multidrug-resistant staphylococci and streptococci. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 48, n. 1, p. 53-62, 2004.

SAIDA, N.B. et al. Clonality of clinical methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* isolates in a neonatal intensive care unit. **Pathol. Biol.**, v. 54, n. 6, p. 337-342, 2006.

SALZMAN, M.B. et al. A prospective study of the catheter hub as portal of entry for microorganisms causing catheter-related sepsis in neonates. **J. Infect. Dis.**, v. 167, n. 2, p. 487-490, 1993.

SALYERS, A.A.; WHITT, D.D. **Bacterial Pathogenesis - a molecular approach**. 1. ed. Washington: ASM Press, 1994. cap. 21, p. 260-270.

SECCHI, C. et al. Identification and detection of methicillin resistance in non-epidermidis coagulase-negative staphylococci. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 12, n. 4, p. 316-320, 2008.

SHENG, W.H. et al. Epidemiology and susceptibilities of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Taiwan: emphasis on chlorhexidine susceptibility. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 63, n. 3, p. 309-313, 2009.

SHIAU, A.-L.; WU, C.-L. The inhibitory effect of *Staphylococcus epidermidis* slime on the phagocytosis of murine peritoneal macrophages is interferon-independent. **Microbiol. Immunol.**, v. 42, n. 1, p. 33-40, 1998.

SIDHU, M.S. et al. Frequency of disinfectant resistance genes and genetic linkage with  $\beta$ -lactamase transposon Tn552 among clinical staphylococci. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 46, n. 9, p. 2797-2803, 2002.

SIERADZKI, K. et al. Heterogeneously vancomycin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain causing recurrent peritonitis in a dialysis patient during vancomycin therapy. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, n. 1, p. 39-44, 1999.

SIERADZKI, K.; VILLARI, P.; TOMASZ, A. Decreased susceptibilities to teicoplanin and vancomycin among coagulase-negative methicillin-resistant clinical isolates of staphylococci. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 42, n. 1, p. 100-107, 1998.

SILVA, F.R. et al. Isolation and molecular characterization of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from nasal flora of health humans at three community institutions in Rio de Janeiro City. **Epidemiol. Infect.**, v. 127, n. 1, p. 57-62, 2001.

SILVA, H.L. et al. Nosocomial coagulase negative staphylococci bacteremia: five year prospective data collection. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 4, n. 6, p. 271-274, 2000.

SINGHAL, R. et al. Species distribution & antimicrobial susceptibility of coagulase negative *Staphylococci* in a tertiary care hospital. **Indian J. Med Res.**, v. 123, 569-570, 2006.

SOULI, M.; GIAMARELLOU, H. Effects of slime produced by clinical isolates of coagulase-negative staphylococci on activities of various antimicrobial agents. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 42, n. 4, p. 939-941, 1998.

STAPLETON, P.D.; TAYLOR, P.W. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: mechanisms and modulation. **Sci. Prog.**, v. 85, n. 1, p. 57-72, 2002.

STICKLER, D.J.; THOMAS, B. Antiseptic and antibiotic resistance in Gram-negative bacteria causing urinary tract infection. **J. Clin. Pathol.**, v. 33, n. 3, p. 288-296, 1980.

STOLL, B.J. et al. Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: a report from the National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research network. **J. Pediatr.**, v. 129, n. 1, p. 63-71, 1996.

SUCI, P.A. et al. Investigation of ciprofloxacin penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 38, n. 9, p. 2125-2133, 1994.

SUNDHEIM, G.; HAGTVEDT, T.; DAINTRY, R. Resistance of meat associated staphylococci to a quaternary ammonium compound. **Food Microbiol.**, v. 9, n. 2, p. 161-167, 1992.

SVENSSON, E.; HANBERGER, H.; NILSSON, L.E. Pharmacodynamic effects of antibiotics and antibiotic combinations on growing and nongrowing *Staphylococcus epidermidis* cells. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 41, n. 1, p. 107-111, 1997.

TEIXEIRA, L.A. et al. Geographic spread of epidemic multiresistant *Staphylococcus aureus* clone in Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, n. 9, p. 2400-2404, 1995.

TENOVER, F.C.; MOELLERING, RC. The rationale for revising the clinical and laboratory standards institute vancomycin minimal inhibitory concentration interpretive criteria for *Staphylococcus aureus*. **Clin. Infect. Dis.**, v. 44, n. 9, p. 1208-1215, 2007.

TENOVER, F.C. et al. Characterization of staphylococci with reduced susceptibilities to vancomycin and other glycopeptides. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, n. 4, p. 1020-1027, 1998.

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

TIMMERMAN, C.P. et al. Characterization of a proteinaceous adhesin of *Staphylococcus epidermidis* which mediates attachment to polystyrene. **Infect. Immun.**, v. 59, n. 11, p. 4187-4192, 1991.

TOJO, M. et al. Isolation and characterization of a capsular polysaccharide adhesin from *Staphylococcus epidermidis*. **J. Infect. Dis.**, v. 157, n. 4, p. 713-730, 1988.

TORMO, M.A. et al. *SarA* is an essential positive regulator of *Staphylococcus epidermidis* biofilm development. **J. Bacteriol.**, v. 187, n. 7, p. 2348-2356, 2005.

VAARA, M. Agents that increase the permeability of the outer membrane. **Microbiol. Rev.**, v. 56, n. 3, p. 395-411, 1992.

VEENSTRA, G.J.C. et al. Ultrastructural organization and regulation of a biomaterial adhesin of *Staphylococcus epidermidis*. **J. Bacteriol.**, v. 178, n. 2, p. 537-541, 1996.

VERMONT, C. et al. Persistence of clones of coagulase-negative staphylococci among premature neonates in neonatal intensive care units: two-center study of bacterial genotyping and patient risk factors. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, n. 9, p. 2485-2490, 1998.

VILLARI, P.; SARNATARO, C.; IACUZIO, L. Molecular Epidemiology of *Staphylococcus epidermidis* in a neonatal intensive care unit over a three-year period. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, n. 5, p. 1740-1746, 2000.

VON EIFF, C. et al. Basic aspects of the pathogenesis of staphylococcal polymer-associated infections. **Infection**, v. 27, suppl. 1, p. S7-S10, 1999.

VUONG, C.; OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis* infections. **Microbes Infect.**, v. 4, n. 4, p. 481-489, 2002.

WADSTRÖM, T. Molecular aspects of bacterial adhesion, colonization, and development of infections associated with biomaterials. **J. Invest. Surg.**, v. 2, n. 4, p. 353-360, 1989.

WANG, C. et al. Distribution of anti-septic-resistance genes *qacA/B* in clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in China. **J. Hosp. Infect.**, v. 69, n. 4, p. 393-409, 2008.

WIDERSTRÖM, M. et al. Molecular epidemiology of *Staphylococcus saprophyticus* isolated from women with uncomplicated community-acquired urinary tract infection. **J. Clin. Microbiol.**, v. 45, n. 5, p. 1562-1564, 2007.

WOODFORD, N. et al. Current perspectives on glycopeptide resistance. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 8, n. 4, p. 585-615, 1995.

YAMAZUMI, T. et al. Comparison of the Vitek Gram-positive susceptibility 106 card, the MRSA-screen latex agglutination test, and *mecA* analysis for detecting oxacillin resistance in a geographically diverse collection of clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, n. 10, p. 3633-3636, 2001.