

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES  
Mestrado Acadêmico em Saúde Pública

Eduarda Vanessa Cavalcante Mangueira

Avaliação da resistência a antibióticos  $\beta$ -lactâmicos em isolados de  
*Staphylococcus* spp.

Recife  
2012

**EDUARDA VANESSA CAVALCANTE MANGUEIRA**

**AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS  $\beta$ -LACTÂMICOS EM  
ISOLADOS DE *STAPHYLOCOCCUS* SPP.**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado Acadêmico em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientadora: Dr<sup>a</sup> Nilma Cintra Leal

Recife

2012

**Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães**

---

M277a Manguiera, Eduarda Vanessa Cavalcante.  
Avaliação da resistência a antibióticos beta-lactâmicos em isolados de Staphylococcus spp / Eduarda Vanessa Cavalcante Manguiera. - Recife: s.n, 2012.  
55 p.: ilus., tab., graf.

Dissertação (Mestrado acadêmico em saúde pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2012  
Orientadora: Nilma Cintra Leal.

1. Staphylococcus – efeito de drogas. 2. Staphylococcus - imunologia. 3. Resistência Microbiana a Medicamentos - genética. 4. Western Blotting - métodos. 5. Western Blotting – utilização. 6. Imunofluorescência - métodos. 7. Imunofluorescência - utilização. I. Leal, Nilma Cintra. II. Título.

---

CDU 616.98:579.869

**EDUARDA VANESSA CAVALCANTE MANGUEIRA**

**AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS  $\beta$ -LACTÂMICOS EM  
ISOLADOS DE *STAPHYLOCOCCUS* SPP.**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado Acadêmico em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Aprovado em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Dr<sup>a</sup> Nilma Cintra Leal  
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – Departamento de Microbiologia

---

Membro Externo / Titular: Dr<sup>a</sup> Marinalda Anselmo Vilela  
Universidade de Pernambuco –

---

Membro Interno / Titular: Dr<sup>a</sup> Sheilla Andrade Oliveira  
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – Departamento de Imunologia

Às mulheres da minha vida;  
minha mãe, Vanétia e irmã Edyellem.

## **Agradecimentos**

Grande é minha lista de agradecimentos (o que me torna uma pessoa de sorte).

À Dr<sup>a</sup> Nilma Leal, pela orientação, carinho e confiança no meu trabalho.

Ao meu companheiro de bancada Wagner Oliveira pela amizade e constante incentivo e apoio, por ser um grande exemplo de dedicação e bravura.

Ao nosso grupo de pesquisa: Ana Paula Costa, Carina Mendes, Lívia Alves, Mariana Nunes, Natália, Katharina e principalmente ao “eterno I.C” Ewerton Lucena pela oportunidade de trocas de conhecimento e experiências e pelo apoio de sempre.

A todos que fazem o Departamento de Microbiologia, em especial a Fabiana Laura, Silvana Santos e Niedja Azevedo pela parceria e por tornar o meu dia-a-dia mais prazeroso.

Às valiosas amigas que construí nessa jornada: Silvia Cabral, Isabella Martins, Shirley Araújo, Elaine Bomfim, Gabriela Brito, Emmile Margate, Thiago Matos e toda a turma do mestrado acadêmico 2010-2012.

Aos mestres do programa de Saúde Pública, que me permitiram usufruir de seus conhecimentos e convívio, e à secretaria acadêmica pelo apoio.

À Dr<sup>a</sup> Virgínia Lorena pela colaboração e ao grupo de biologia celular e molecular do CPqAM pela acolhimento no laboratório, em especial ao Dr<sup>o</sup> Fábio Brayner, Dr<sup>o</sup> Luis Alves, Dyana Leal e Ana Paula Feitosa.

Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães pela infra-estrutura e disponibilidade de recursos e aos órgãos financiadores, CNPq e Facepe, pelo suporte financeiro para realização dos experimentos.

À minha grande amiga Larissa por ser muito mais do que colega de faculdade e laboratório, mas uma amiga para vida inteira.

Ao meu amado Gustavo pela paciência e dedicação.

E principalmente a Deus e aos meus pais, Eduardo e Vanétia, por serem meu grande exemplo de amor. E aos meus irmãos, Edyellem e Ewerton, pelo companheirismo, torcida e amor incondicional.

A todos que abraçaram o meu sonho e estiveram ao meu lado e que de alguma forma contribuíram em mais essa etapa da minha jornada e que serão fundamentais para tantas outras que ainda estão por vir.

MANGUEIRA, Eduarda Vanessa Cavalcante. **Avaliação da resistência a antibióticos  $\beta$ -lactâmicos em isolados de *Staphylococcus* spp.** 2012. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2012.

## RESUMO

O uso indiscriminado de antibiótico favorece o surgimento de cepas de *Staphylococcus* spp. resistentes à oxacilina. O mecanismo dessa resistência é devido à produção da proteína PBP2a, codificada pelo gene *mecA*. Alguns isolados clínicos apresentam o gene *mecA*, porém são sensíveis a concentrações de oxacilina e cefoxitina, ou seja, nesses isolados, denominados pré-MRS ou OS-MRS, a presença do *mecA* não está associada à sua expressão. Acredita-se que, ao sofrerem pressão seletiva pelo uso indiscriminado de antibióticos, isolados pré-MRS podem tornar-se resistentes. O objetivo desse trabalho foi determinar se o surgimento de cepas de *Staphylococcus* resistentes à oxacilina e cefoxitina ocorre devido ao estímulo da expressão da PBP2a (indução) ou por seleção antibiótica de linhagens resistentes. Para isso, foram analisadas 42 isolados de *Staphylococcus* spp., vinte e cinco *Staphylococcus aureus* e 17 *Staphylococcus* Coagulase Negativa (SCN) de um Hospital Universitário de Recife-PE. Antes da exposição ao antibiótico a Concentração Inibitória Mínima (MIC) dos isolados foi determinada, o reconhecimento da PBP2a foi avaliado pelos testes de *Western blot* e Imunofluorescência Indireta (IFI) e realizadas provas de indução de resistência e de seleção por uso de antibiótico. O *Western blot* e a IFI mostraram que em algumas amostras havia expressão da PBP2a mesmo na ausência do antibiótico. No teste de indução com oxacilina houve uma estabilização do MIC e os isolados não alcançaram o MIC de resistência sugerindo um mecanismo de seleção. No teste para confirmação do processo de seleção, foi observada variabilidade entre as colônias de um mesmo isolado caracterizando um perfil de heteroresistência, enquanto alguns isolados se mostraram homogêneos, com alto nível de resistência. Esses achados reforçam a importância da detecção do gene *mecA* e da proteína PBP2a para conduta de prescrição de antibióticos na prática clínica.

Palavras-chave: *Staphylococcus*, Resistência microbiana a medicamentos, *Western blot*, Imunofluorescência.

MANGUEIRA, Eduarda Vanessa Cavalcante. **Evaluation of  $\beta$ -lactam antibiotic resistance in isolates of *Staphylococcus* spp.** 2012. Dissertation (master's degree of Public Health) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2012.

## ABSTRACT

The indiscriminate use of antibiotics promotes the emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus* strains. The mechanism of this resistance is the production of PBP2a protein, encoded by *mecA*. Some clinical isolates have the gene *mecA* but are sensitive to concentrations of oxacillin and cefoxitina. In these isolates, termed pre-MRS or OS-MRS, the presence of *mecA* is not associated with its expression. It is believed that due to selective pressure by the use of antibiotics, pre-MRS isolates become resistant. The aim of this study was to determine whether MRS strains emergence is due to stimulation PBP2a expression (induction) or by antibiotic selection of resistant strains. We analyzed 42 isolates of *Staphylococcus* spp, 25 *Staphylococcus aureus* and 17 *Staphylococcus* coagulase negative (SCN) isolated from a University Hospital of Recife-PE. Prior to antibiotic exposure the minimum inhibitory concentration (MIC) was determined and the Western blot and indirect immunofluorescence (IFI) immunological tests for PBP2a detection and tests of induction and selection by use of antibiotics were performed. The Western blot and IFI showed that some samples expressed PBP2a in the absence of antibiotics. In the induction test with oxacillin the isolates did not reach the resistance MIC suggesting selection mechanism. In the selection test, variation was observed among colonies of the same strain, revealing a heteroresistance profile, and some isolates were homogeneous, with a high level of resistance. These findings reinforce the importance of *mecA* gene and PBP2a protein detection for antibiotic prescription management in clinical practice.

Words-Key: *Staphylococcus*, drug resistance, blotting, fluorescent antibody technique.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Microscopia eletrônica de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	14
Figura 2	Diagrama da estrutura do peptidoglicano de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	16
Figura 3	Diagrama da biossíntese do peptidoglicano.....	17
Figura 4	Mecanismo de ação da PBP2 nativa e PBP2a.....	19
Figura 5	Imunofluorescência indireta.....	36
Gráfico 1	Teste de Indução com oxacilina; variação da MIC pela exposição ao antibiótico.....	38
Gráfico 2	Teste de Indução com cefoxitina; variação da MIC pela exposição ao antibiótico.....	39
Figura 6	Produto da amplificação do gene <i>mecA</i> e IFI da PBP2a de colônias dos isolados 525 para avaliação do perfil de heteroresistência no teste de Seleção.....	40
Figura 7	Produto da amplificação do gene <i>mecA</i> e IFI da PBP2a de colônias dos isolados 666 para avaliação do perfil de heteroresistência no teste de Seleção.....	41
Figura 8	Produto da amplificação do gene <i>mecA</i> de colônias do isolado 236, filme de auto-radiografia revelando o reconhecimento da PBP2a nas colônias e imunofluorescência indireta com reconhecimento da proteína de resistência.....	42

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Taxa anual de mortes por doenças infecciosas.....	22
Tabela 2	Padrão de susceptibilidade para os antibióticos oxacilina e cefoxitina para <i>Staphylococcus aureus</i> e coagulase negativos.....	28
Tabela 3	Caracterização dos isolados investigados neste estudo.....	35
Tabela 4	Primeiro teste de Indução com Oxacilina; variação da MIC pela exposição ao antibiótico.....	37
Tabela 5	Novo teste de Indução com Oxacilina; variação da MIC pela exposição ao antibiótico.....	38
Tabela 6	Teste de Indução com Cefoxitina; variação da MIC pela exposição ao antibiótico.....	39
Tabela 7	Perfil das amostras frente ao teste de susceptibilidade à combinação de $\beta$ -lactâmico com inibidor de $\beta$ -lactamase.....	43

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHI	<i>Brain Heart Infusion</i> - Infusão cérebro coração
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CPqAM	Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
D.O.	Densidade óptica
IFI	Imunofluorescência Indireta
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
GlcNAc	$\beta$ -1- <i>N</i> -acetilglicosamina
HMW	<i>High-Molecular-Weight</i> - Alto peso molecular
HUOC	Hospital Universitário Oswaldo Cruz
MIC	<i>Minimum Inhibitory Concentration</i> – Concentração inibitória mínima
MRS	<i>Methicillin Resistant Staphylococcus</i> - <i>Staphylococcus</i> meticilina resistente
MRSA	<i>Methicillin Resistant Staphylococcus Aureus</i> – <i>Staphylococcus aureus</i> meticilina resistente
MSSA	<i>Methicillin Sensitive Staphylococcus Aureus</i> – <i>Staphylococcus aureus</i> meticilina sensível
MurNac	<i>N</i> -acetilmurâmico
PBP	<i>Penicillin-Binding Protein</i> - Proteína de Ligação à Penicilina
PBP2a	<i>Penicillin-Binding Protein 2a</i> - Proteína de Ligação à Penicilina alternativa
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> - Reação em Cadeia da Polimerase
rpm	Rotações por minuto
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl Sulfate</i> – <i>polyacrylamide Gel electrophoresis</i> - Eletroforese em gel de poliacrilamida – Dodecil sulfato de sódio
SCCmec	Staphylococcal cassette chromosome mec
SCN	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativo
TGase	Domínio transglicosilase
TPase	Domínio transpeptidase
UFC	Unidades formadoras de colônias
UV	Ultra Violeta

## SUMÁRIO

<b>1 Introdução</b> .....	13
<b>2 Revisão de Literatura</b> .....	14
2.1 <i>Staphylococcus</i> : características gerais.....	14
2.2 Parede celular .....	15
2.3 Proteínas de ligação à penicilina.....	17
2.4 Base molecular da PBP2a.....	19
2.5 Mecanismos de Resistência.....	20
2.6 Epidemiologia das infecções por <i>Staphylococcus</i> resistentes à meticilina.....	20
2.7 Métodos para detecção de resistência.....	22
2.8 Heterorresistência e Homorresistência .....	24
<b>3 Justificativa</b> .....	25
<b>4 Objetivos</b> .....	26
4.1 Geral.....	26
4.2 Específicos.....	26
<b>5 Material e Método</b> .....	27
5.1 Local de estudo.....	27
5.2 Amostras – Cultura de bactérias e caracterização fenotípica .....	27
5.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC).....	27
5.4 Padronização da técnica de Imunofluorescência Indireta.....	28
5.5 Reconhecimento da PBP2a por Imunofluorescência indireta.....	29
5.6 Extração de proteína total de parede celular .....	29
5.7 Reconhecimento da PBP2a por <i>Western blot</i> .....	30
5.8 Testes de indução da Resistência .....	30
5.9 Teste de seleção de linhagens resistentes .....	31
5.10 Testes de disco de ampicilina com ácido clavulânico.....	31
<b>6 Considerações Éticas</b> .....	33
<b>7 Resultados</b> .....	34
7.1 Concentração Inibitória Mínima (MIC).....	34
7.2 Padronização da técnica de Imunofluorescência Indireta .....	36
7.3 Reconhecimento de PBP2a por <i>Western blot</i> e Imunofluorescência Indireta.....	36
7.4 Teste de Indução da Resistência.....	37
7.5 Teste de seleção de linhagens resistentes.....	40

7.6 Teste de disco Ampicilina com Ácido clavulânico.....	43
<b>8 Discussão.....</b>	<b>44</b>
<b>9 Conclusões.....</b>	<b>48</b>
<b>Referências.....</b>	<b>49</b>
<b>Anexo A Parecer do comitê de ética.....</b>	<b>55</b>

## 1 Introdução

O gênero *Staphylococcus* compreende importantes patógenos, que embora façam parte da microbiota normal de seres humanos, colonizando pele e mucosas, estão relacionados com processos infecciosos graves tanto no âmbito hospitalar como na comunidade. Esses microrganismos tornaram-se um obstáculo às novas terapias antimicrobianas, devido à aquisição de mecanismos de resistência aos agentes terapêuticos utilizados no combate às infecções estafilocócicas. Desde a introdução da meticilina na prática clínica, em 1961, a ocorrência de *Staphylococcus* meticilina resistente (MRS) elevou-se, e as infecções hospitalares transformaram-se em um sério problema de saúde pública de ordem mundial.

O elemento central do mecanismo de resistência à meticilina, em *Staphylococcus* é a aquisição e expressão do gene *mecA*, que codifica uma proteína alternativa de ligação à penicilina, conhecida como PBP2' ou PBP2a. Essa proteína é descrita como essencial para a síntese da parede celular e crescimento bacteriano na presença do antimicrobiano. No entanto, alguns isolados de *Staphylococcus* apresentam o gene *mecA*, porém são sensíveis a concentrações crescentes de antibióticos. Tais isolados são descritos na literatura como pré-MRS que por definição são aqueles que carregam os elementos que regulam o *mecA* (*mecI* e *mecR1*, repressor e indutor respectivamente), mas são sensíveis a meticilina porque o gene *mecI* reprime fortemente a expressão da PBP2a. Esses isolados são descritos também como OS-MRS, definidos como cepas que possuem o gene *mecA* mas são susceptíveis à oxacilina, com Concentração Inibitória mínima (MIC)  $\leq 2\mu\text{g/ml}$ . Geralmente, dentro dessa população, nem todas as células bacterianas expressam um perfil de resistência, fenômeno denominado de heterorresistência. Desta forma, os métodos fenotípicos para detecção de resistência podem ser de difícil interpretação.

A compreensão da expressão gênica relacionada com resistência a antimicrobianos permite adotar medidas mais direcionadas para o tratamento de infecções. Este estudo buscou investigar a expressão da PBP2a em cepas sensíveis à oxacilina e portadoras do gene *mecA*. Nosso objetivo foi verificar se essas cepas sob pressão de antibiótico, poderiam tornar-se resistentes devido ao estímulo da expressão da proteína PBP2a (indução) ou por seleção antibiótica de linhagens resistentes e qual o papel do gene *mecA* e o seu produto, a PBP2a, nesse processo. Ao mesmo tempo, o estudo do mecanismo de resistência a  $\beta$ -lactâmicos servirá para orientação da prescrição de antimicrobianos, evitando o uso de antibióticos de última geração em casos não comprovados de resistência.

## 2 Revisão de Literatura

### 2.1 *Staphylococcus*: características gerais

*Staphylococcus spp* são microrganismos gram-positivos, esféricos, sem esporos, imóveis que se apresentam agrupados em cachos, por sua habilidade de se dividir em mais de um plano (Figura 1). São capazes de sobreviver e se multiplicarem tanto em aerobiose quanto em anaerobiose. Em meio ágar sangue, esses organismos formam colônias pequenas, brancas ou douradas, com ou sem hemólise. Apresentam tolerância a altas concentrações de cloreto de sódio (NaCl) e ao ressecamento. Produzem a enzima catalase, o que os diferencia dos demais cocos Gram-positivos.

A patogenicidade de *Staphylococcus* está relacionada à produção de toxinas e à sua capacidade de invasão e disseminação sistêmica. Essas bactérias estão frequentemente envolvidas em processos supurativos. A liberação de toxinas pode provocar intoxicações alimentares, síndrome do choque tóxico e síndrome de Panton-Valentine (BANNERMAN, 2003). Com base na produção da enzima coagulase, o gênero *Staphylococcus* pode ser dividido em dois grupos: os estafilococos coagulase-positivos e estafilococos coagulase-negativos (SCN) (KONEMAN et al., 2008).

Figura 1- Microscopia eletrônica de varredura de *Staphylococcus aureus*.



Fonte: SCIENCE PHOTO LIBRARY. *Staphylococcus aureus*. Disponível em: <[www.sciencephoto.com](http://www.sciencephoto.com)>

Acesso em: 09.mar.2011

*Staphylococcus aureus* é considerado microbiota normal da nasofaringe, períneo e pele, podendo colonizar indivíduos assintomaticamente, por curtos ou longos períodos de tempo, causando doenças quando há um comprometimento do sistema imunológico (CHAMBERS, 2001; KLOOS; BANNERMAN, 1994). Esse microrganismo também é

considerado um dos principais patógenos humano, pela sua capacidade de acumular determinantes de resistência a antimicrobianos e de concentrar fatores de virulência, sendo capaz de causar diversas doenças infecciosas e se adaptar a diferentes condições (LOWY, 2003; STRUELENS, 1998). Em ambiente hospitalar, os maiores vetores de disseminação do *S. aureus*, são pacientes e parte dos profissionais de saúde, que abrigam estafilococos nas narinas ou na pele. As infecções nosocomiais por *S. aureus* são um grande problema clínico e epidemiológico, devido ao seu caráter oportunista e ao aumento da resistência aos antimicrobianos (LOWY, 2003; TENOVER, 2001).

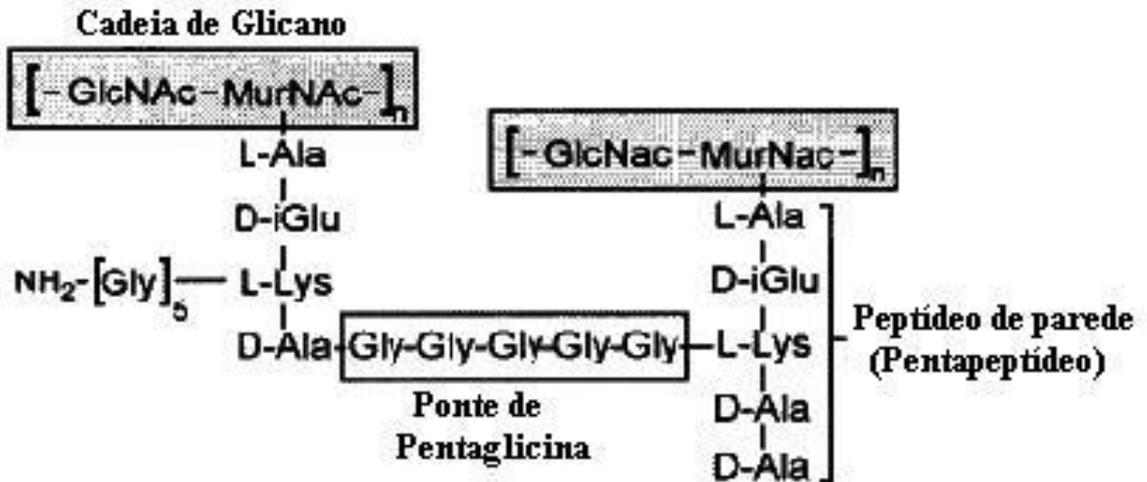
Os estafilococos coagulase negativos (SCN) foram, por muito tempo, considerados comensais da pele e contaminantes de culturas. Sua importância como patógeno foi reconhecida recentemente e fatores específicos envolvidos nessa patogenicidade estão sendo identificados. A crescente incidência de infecções causadas por essas bactérias pode ser atribuída à sua capacidade de colonizar materiais sintéticos que integram a medicina moderna. Esses microrganismos tornam-se patogênicos quando têm acesso a tecidos internos, através de trauma na barreira cutânea, inoculação por agulhas ou implante de materiais médicos como próteses articulares, cateteres, válvulas cardíacas e marcapassos (EIFF; HEILMANN; PETERS, 1998; HEIKENS et al., 2005; KONEMAN et al., 2008).

## 2.2 Parede celular

Tanto em bactérias gram-positivas como em gram-negativas, a estrutura da parede celular consiste em ligações cruzadas de polímeros de peptidoglicano, também chamado mureína. A parede celular é o principal elemento de apoio na manutenção da forma bacteriana e sua integridade é importante para viabilidade da célula, contribuindo também na sua infectividade e patogenicidade (SCHEFFERS; PINHO, 2005).

A parede celular de *Staphylococcus* é formada pela alternância de subunidades de  $\beta$ -1-*N*-acetilglicosamina (GlcNAc) e *N*-acetilmurâmico (MurNac) associada a uma cadeia tetrapeptídica de L-alanina, D-glutamina, L-lisina e D-alanina (Figura 2). Aproximadamente 90% dessas cadeias peptídicas estão ligadas a outras cadeias de glicano formando uma ponte interpeptídica de pentaglicina. Essas longas cadeias de glicano, ligadas através de flexíveis pontes peptídicas, formam uma estrutura forte e elástica que protege o protoplasto da lise devido à alta pressão osmótica interna (SCHEFFERS; PINHO, 2005). Ligada à parede celular das bactérias gram-positivas estão moléculas acessórias como ácidos tecóicos, ribitol, ácidos lipoteicóicos, polifosfatos e carboidratos (NAVARRE; SCHNEEWIND, 1999).

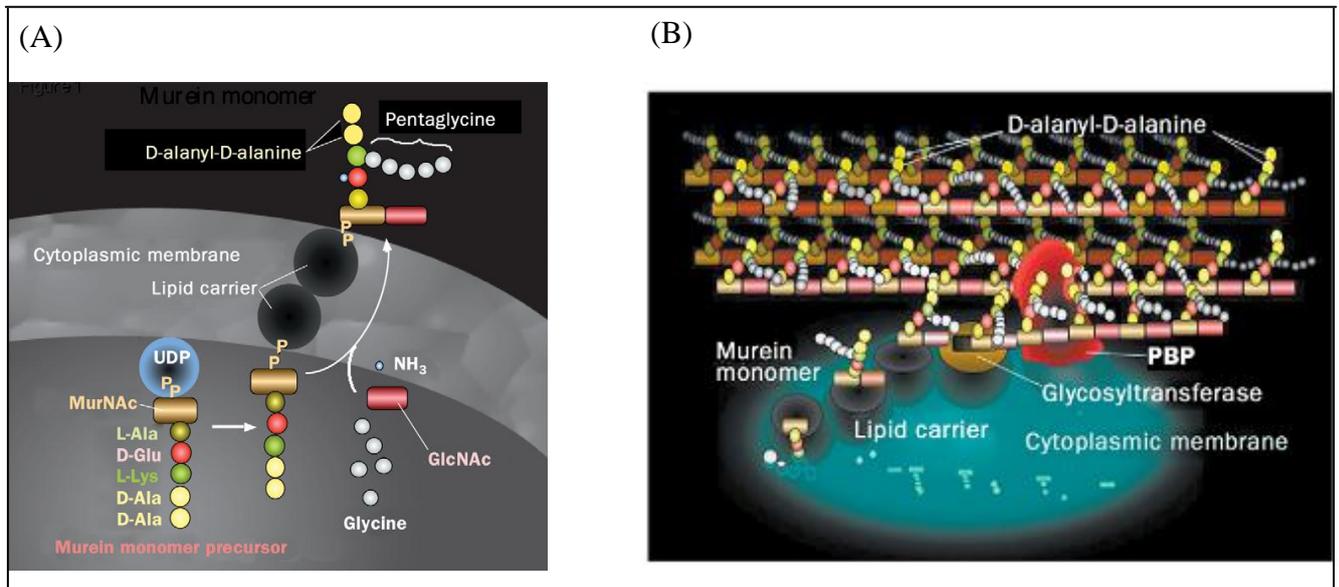
Figura 2- Diagrama da estrutura do peptidoglicano de *Staphylococcus aureus*. Cadeias de glicano compostas dos dissacarídeos, acetilglicosamina (GlcNAc) e acetilmurâmico (MurNAc) interligados por uma ponte de pentaglicina característico da espécie.



Fonte: Navarre e Schneewind (1999).

A biossíntese do peptidoglicano pode ser dividida em três diferentes estágios (Figura 3): (i) ocorre no citoplasma e conduz à síntese dos nucleotídeos precursores UDP-N-acetilmurâmico-pentapeptídeo e UDP-N-acetilglicosamina; (ii) na membrana citoplasmática, precursores lipídicos são sintetizados para fazer o transporte através da membrana citoplasmática. Nessa etapa da biossíntese, o uso de uma molécula lipofílica permite à célula transportar precursores hidrofílicos do meio citoplasmático, através da membrana hidrofóbica, para sítios de incorporação ao peptidoglicano crescente, no lado externo da membrana; (iii) a etapa final da biossíntese do peptidoglicano, acontece na parte externa da membrana citoplasmática e envolve a polimerização das unidades de peptídeos e dissacarídeos recém-sintetizados e a incorporação no peptidoglicano crescente, através da ação das chamadas proteínas de ligação a penicilina (PBPs) (SCHEFFERS; PINHO, 2005; STAPLETON; TAYLOR, 2002).

Figura 3- Diagrama da biossíntese do peptidoglicano.



Fonte: Hiramatsu (2001).

Nota: A geração dos precursores da parede celular (GlcNAc e MurNAc) (A) começa no citoplasma, posteriormente eles são transferidos por carreadores lipídicos na membrana e então translocados para o lado externo da membrana, atuando como substrato da glicosiltransferase e sofrendo reações de transpeptidação catalisadas pelas PBPs (B).

### 2.3 Proteínas de ligação à penicilina

Proteínas de ligação à penicilina (PBP's) pertencem à família serina acil-transferase. Elas são codificadas pelo gene de mesmo nome, *pbp* localizados no cromossomo (PEREIRA et al., 2007). Estão ancoradas na porção extracelular da membrana citoplasmática, através de pequenas sequências hidrofóbicas carboxi/aminoterminal. Essas enzimas atuam na etapa final de montagem da parede bacteriana catalisando a reação de transpeptidação entre os polímeros de peptidoglicano (BRAKSTAD; MAELAND, 1997; CHAMBERS, 1999).

As PBP's estão presentes em quase todas as bactérias, mas variam entre uma espécie e outra, em relação ao número, tamanho, quantidade e afinidade a antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (GEORGOPAPADAKOU, 1993). O termo "PBP" há tempos vem sendo inadequadamente empregado na literatura, por referir-se a qualquer enzima que reconhece e/ou metaboliza antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, independente da sua função na célula. As transpeptidases K15 e R61 de *Streptomyces*, por exemplo, possui afinidade à penicilina, mas não estão envolvidas na biossíntese do peptidoglicano e sua função celular não foi ainda descrita (MACHEBOEUF et al., 2006).

As PBP's são divididas em proteínas de alto peso molecular (HMW) e de baixo peso molecular (LMW). As PBP's HMW são enzimas localizadas na superfície da membrana citoplasmática e ligadas à membrana pelo domínio sinal N-terminal. O sítio C-terminal é formado por um domínio penicilina ligante, que catalisa a ligação cruzada. De acordo com sua estrutura primária e atividade catalítica estas PBP's podem ser divididas em duas classes: A e B. As de classe A são enzimas bifuncionais, catalisam tanto polimerização de cadeias de GlcNAc-MurNAc (glicosilação), quanto ligações cruzadas com cadeias de peptídeos adjacentes (transpeptidação). Enquanto as de classe B são monofuncionais e apresentam apenas atividade transpeptidase (GOFFIN; GHUYSEN, 2002; SCHEFFERS; PINHO, 2005)

No gênero *Staphylococcus*, as PBP's HMW são PBP1 (87 kDa), envolvidas na transpeptidação primária de unidades de mureína; a PBP2 (80 kDa) envolvida na transpeptidação e transglicosilação; e a PBP3 (75 kDa) que participa da septação do peptidoglicano (GEORGOPAPADAKOU, 1993).

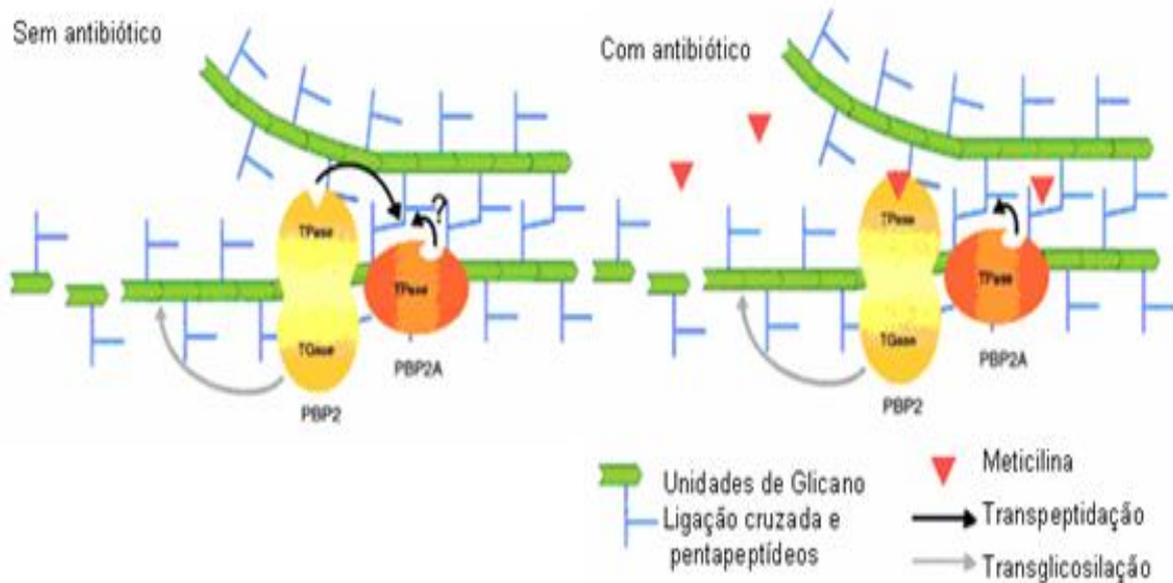
As PBP's HMW são alvo dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos. A ligação do antimicrobiano à PBP inibe o domínio de transpeptidação da proteína, com acúmulo de precursores de membrana dentro do citoplasma levando a liberação de enzimas autolíticas que degradam a parede celular pré-formada, com consequente morte celular bacteriana (CHAMBERS, 1999; STAPLETON; TAYLOR, 2002; SEFTON, 2002).

Isolados de *Staphylococcus* resistente à meticilina (MRS), produzem uma PBP adicional, a PBP2a também denominada PBP2' (78 kDa), com baixa afinidade de ligação a componentes  $\beta$ -lactâmicos (GEORGOPAPADAKOU, 1993). Elas são capazes de continuar a síntese de parede celular quando as PBP's nativas não estão em atividade (GOLDSTEIN et al., 2007). Segundo Pinho *et al.* (2001) a PBP2, uma das PBP's estafilocócicas nativas, é necessária para a síntese da parede celular e crescimento bacteriano na presença de antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos. A PBP2 possui um domínio transpeptidase (TPase) e um domínio transglicosilase (TGase). Em altas concentrações de meticilina, o domínio transpeptidase é acilado e não é mais capaz de realizar a ligação cruzada dos peptídeos. No entanto, o domínio transglicosilase mantém-se funcional e coopera com a atividade da transpeptidase da PBP2a, a PBP adicional (figura 4). A PBP2a é codificada pelo gene *mecA* e não pelo gene *pbp* e contém um domínio transpeptidase e um domínio penicilina não ligante (BRAKSTAD; MAELAND, 1997).

As PBP's LMW são monofuncionais e ajudam no controle da extensão da malha do peptidoglicano (SCHEFFERS; PINHO 2005). No gênero *Staphylococcus* a PBP4 (41kDa) está envolvida na transpeptidação secundária (GEORGOPAPADAKOU, 1993). As PBP's

LMW embora tenham papel na síntese de parede, não são alvos dos antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos (CHAMBERS, 1999).

Figura 4- Mecanismo de ação da PBP2 nativa e PBP2a.



Fonte: Pinho et al. (2001).

Nota: Na ausência do antibiótico, os domínios TPase and TGase da PBP2 participam na biossíntese do peptidoglicano. Na presença do antibiótico, o domínio TPase da PBP2 está inativo, mas seu domínio TGase coopera com a atividade do domínio TPase da PBP2a.

#### 2.4 Base molecular da PBP2a

O gene responsável pela expressão da PBP2a em cepas MRS é conhecido como *mecA*. Quando se tornou evidente que o *mecA* estava amplamente disseminado entre as múltiplas espécies de estafilococos, a hipótese era de que ele poderia estar localizado em um elemento móvel que poderia ser facilmente transferido entre as espécies. Um elemento genético móvel designado cassete genético móvel posteriormente designado como *SCCmec* (KATAYAMA; ITO; HIRAMATSU, 2001). Este elemento é considerado uma ilha de resistência por compreender numerosos genes de resistência a diferentes classes de antibióticos (HIRAMATSU et al., 2001). Além de outros elementos genéticos móveis como IS's, plasmídios conjugativos e transposons, dois elementos destacam-se dentro do *SCCmec*, o Complexo *ccr*, responsável pela mobilização do cassete e o Complexo *mec*, um operon com 42 kb formado pelos genes reguladores *mecI* (repressor) e *mecRI* (indutor) localizados a esquerda do gene estrutural *mecA* (INTERNATIONAL WORKING GROUP ON THE

CLASSIFICATION OF STAPHYLOCOCCAL CASSETTE CHROMOSOME ELEMENTS, 2009).

## 2.5 Mecanismos de Resistência

Os mecanismos da resistência bacteriana são complexos, variados e não completamente conhecidos (KONEMAN et al., 2008). Entre os *Staphylococcus*, além da resistência a antibióticos  $\beta$ -lactâmicos mediada pela presença do gene *mecA* codificante da proteína PBP2a existe a produção de enzimas modificadoras de antibióticos como  $\beta$ -lactamases, que hidrolisam o antibiótico e são codificados pelo gene *blaZ* (HIRAMATSU et al., 2001). Segundo Chambers (1999), isolados apresentando resistência à meticilina e *mec*-negativos mostram altos níveis de atividade das  $\beta$ -lactamases, exibindo baixos valores de MIC (Concentração Inibitória Mínima) na associação de  $\beta$ -lactâmicos com inibidores da ação dessas enzimas, como o ácido clavulânico ou sulbactam. A hiperprodução dessas enzimas resulta na hidrólise lenta das penicilinas semi-sintéticas e resistência limítrofe à meticilina/oxacilina. Dessa forma, a resistência à oxacilina e a outras penicilinas resistentes à penicilinase também pode ser observada em algumas cepas, embora a hiperprodução dessa enzima esteja mais associada a cepas SCN que *S. aureus* (ARCHER; BOSILEVAC, 2001).

## 2.6 Epidemiologia das infecções por *Staphylococcus* resistentes à meticilina.

Um dos maiores problemas de Saúde Pública enfrentado nas últimas décadas é o aumento da resistência a antimicrobianos em populações bacterianas, principalmente de origem hospitalar, devido à facilidade de disseminação de patógenos resistentes (TENOVER, 2001). A resistência apresentada pelos microrganismos é uma questão grave por limitar as opções terapêuticas (DZIDIC; BEDEKOVIC, 2003; SADER et al., 2001;). Apesar do volume de conhecimento, da vigilância reforçada e das medidas de controle de infecções adotadas pelas instituições de saúde para abordar a endemicidade e os surtos de doenças frequentes por *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) as infecções causadas por este microrganismo ainda são responsáveis por cerca de 50% das infecções hospitalares com morbidade e mortalidade crescentes (TAIWO, 2009).

Como estafilococos são encontrados na pele e na nasofaringe a disseminação desses microrganismos torna-se mais fácil. Geralmente estas cepas são introduzidas em uma

instituição hospitalar por meio de paciente ou indivíduo da equipe de saúde colonizado e o principal modo de transmissão se dá através das mãos (CHAMBERS, 2001). Além da transmissão por contato direto, os equipamentos e utensílios manipulados por pessoas colonizadas podem desempenhar importante papel na epidemiologia das infecções por MRS (CHAMBERS, 2001).

A origem de cepas MRS é desconhecida. Estudos por meio de genética da evolução demonstram que o gene *mecA* foi transferido de isolados *Staphylococcus* coagulase negativos para *S. aureus*. Um homólogo ao gene *mecA* apresentando 88% de similaridade foi encontrado em *Staphylococcus sciuri* que se encontra na base da árvore genealógica do gênero *Staphylococcus*, e está muito afastado filogeneticamente de *S. aureus*, que é uma das espécies mais evoluídas (COUTO et al., 1996).

Tradicionalmente, infecções por *Staphylococcus* resistentes à meticilina eram adquiridas exclusivamente em âmbito hospitalar. Fatores de risco contribuem para colonização ou infecção, como a exposição a terapias antimicrobianas, o longo tempo de internamento em Unidade de Terapia Intensiva (UTI), pacientes cirurgiados, procedimentos invasivos e exposição a pacientes já colonizados por *Staphylococcus* resistentes à meticilina (MRS). Quando casos de infecções por MRS eram investigados na comunidade ficava evidente hospitalização anterior ou contato com pessoas que tenham tido uma hospitalização recente (CHAMBERS, 2001). Com a emergência de *S. aureus* resistentes à meticilina associados à comunidade (CA-MRSA), houve uma mudança na epidemiologia das infecções causadas por *S. aureus* resistentes à meticilina. Os CA-MRSA já foram descritos em várias regiões do globo, entre elas o Brasil (RIBEIRO et al., 2005).

Infecções causadas por *Staphylococcus* spp. impõe uma carga elevada e crescente sobre os recursos de cuidados a saúde (CHU, 2005). O aumento da resistência de vários patógenos a uma variedade de antimicrobianos tem demandado o desenvolvimento de novos e mais potentes agentes antimicrobianos. Com esse aumento da resistência a vigilância começou a ser reconhecida como necessária, unindo esforços locais, nacionais e internacionais, com programas multicêntricos de vigilância, monitorando e acompanhando a evolução da resistência no tempo, bem como desenvolvendo medidas preventivas (SADER et al., 2001).

Infecções por *Staphylococcus* resistentes à meticilina matam aproximadamente 19.000 pacientes americanos hospitalizados anualmente, o que é semelhante ao número de mortes em decorrência da AIDS, tuberculose e hepatites virais (tabela 1) (HELEN; BOUCHER; COREY, 2008; KLEVENS et al., 2007).

Tabela 1- Taxa anual de mortes por doenças infecciosas.

<b>Doenças infecciosas</b>	<b>Numero de mortes</b>	<b>Ano</b>
	<b>(estimadas)</b>	
<b>Infecções por MRSA</b>	19.000	2005
<b>AIDS</b>	15.798	2004
<b>Tuberculose</b>	662	2004
<b>Hepatite viral</b>	5.793	2002

Fonte: Helen; Boucher; Corey, 2008.

## 2.7 Métodos para detecção de resistência

A determinação precoce e precisa da resistência à meticilina é importante para o prognóstico de infecções causadas por bactérias do gênero *Staphylococcus* (ANAND et al, 2009). O reconhecimento laboratorial da aquisição de resistência e suas implicações clínicas tornaram-se cada vez mais relevantes, com impacto assistencial e epidemiológico, devido à evolução temporal da resistência (ROSSI; ANDREAZZI, 2005). Os isolados de *S. aureus* resistentes à meticilina/oxacilina são, por definição, resistentes a todos os  $\beta$ -lactâmicos e carbapenems. Esta resistência é identificada por vários métodos como disco-difusão, diluição em agar, aglutinação em látex, métodos automatizados e ensaios moleculares (CENTRO DE CONTROLE E PREVENÇÃO DE DOENÇAS, 1996).

As isoxazolilpenicilinas (oxacilina, dicloxacilina, cloxacilina e flucloxacilina) são estáveis em pH ácido e apresentam alto índice de ligação às proteínas plasmáticas (80%). Embora a oxacilina seja homólogo à meticilina, ela é mais resistente à hidrólise. A oxacilina é o fármaco preconizado, mas continua sendo empregada a expressão “meticilina-resistente” ou a sigla MRS, para designar as cepas de *Staphylococcus* que não respondem ao tratamento com oxacilina e por extensão, com as demais isoxazolilpenicilinas (AMATO NETO et al., 2000).

O Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) é uma entidade internacional que preconiza como os testes de susceptibilidade aos antimicrobianos devem ser realizados e interpretados. O método de Kirby-Bauer (disco-difusão) utilizando disco de oxacilina, embora ainda utilizado na maioria dos laboratórios clínicos possui uma menor especificidade quando comparado a outros métodos (UNAL et al., 1994). A partir de 2004 o CLSI passou a

recomendar o teste com disco de 30µg de cefoxitina para a detecção de cepas MRS. Essa recomendação baseou-se em relatos sobre o uso da cefoxitina, por este ser potente indutor do sistema regulatório do gene *mecA*. Sendo possível considerá-lo como um marcador na detecção de resistência à meticilina mediada pelo *mecA*. O teste utilizando cefoxitina apresenta especificidade e sensibilidade para detectar o gene *mec* igual à reação em cadeia de polimerase (PCR) (SWENSON et al., 2007).

Outro método para determinação da susceptibilidade à meticilina é o da concentração inibitória mínima (MIC), incluindo métodos de diluição em agar, em caldo (macrodiluição e microdiluição) e de gradiente de difusão em agar. Apesar desses métodos possibilitarem uma avaliação quantitativa da resistência à oxacilina e de serem métodos muitas vezes considerados padrão, podem não ter acurácia significativamente maior (para a presença do gene *mecA*) do que os testes fenotípicos qualitativos. No entanto, devido à existência de outros mecanismos de resistência, esses métodos podem e devem ser utilizados como confirmatórios e/ou adjuvantes em isolados nos quais o padrão de suscetibilidade é duvidoso ou de difícil diagnóstico (VELASCO, 2005).

Os métodos fenotípicos podem falhar na detecção dessa resistência, uma vez que esta pode ser influenciada pelas condições de cultivo, como temperatura, pH e concentração de NaCl do meio. Duas sub-populações podem coexistir na mesma cultura, onde cepas apresentando baixo nível de resistência podem não ser detectadas. Estas cepas apesar de possuírem a informação genética, apresentam *in vitro* o fenótipo de sensibilidade (MURAKAMI et al., 1991).

Desta forma, a detecção do gene *mecA* ou seu produto, a proteína de ligação a penicilina (PBP2a) é considerada “padrão ouro” para confirmação de cepas MRS (SKOV et al., 2006). Mohanasoundaram e Lalitha (2008), em seu estudo de comparação dos métodos fenotípicos e genotípicos na detecção de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina, analisaram 150 isolados e pelos métodos de MIC e disco difusão apenas 33 foram classificados como MRSA. Já o método de aglutinação em látex com soro monoclonal para PBP2a apresentou 99% de especificidade e 100% sensibilidade, onde todos os MRSA foram positivos na reação e apenas uma cepa sensível foi classificada erroneamente como MRSA. A PCR do *mecA* apresentou especificidade e sensibilidade similares ao teste de aglutinação em látex.

## 2.8 Heterorresistência e Homorresistência

Alguns isolados são descritos na literatura como pré-MRS que por definição são aqueles que carregam os elementos que regulam o *mecA* (*mecI* e *mecR1*, repressor e indutor respectivamente), mas são sensíveis a meticilina porque o gene *mecI* reprime fortemente a expressão da PBP2a (KOBAYASHI et al., 1998; PETINAKI et al., 2001). Hososaka et al. (2007) encontraram numa população de 480 cepas de *S. aureus*, seis apresentando perfil de sensibilidade à oxacilina e *mecA* positivos. Esses isolados são descritos também como OS-MRS, definidos como cepas que possuem o gene *mecA* mas são susceptíveis à oxacilina, com MIC  $\leq 2\mu\text{g/ml}$  (GIANOULLI et al. 2010). Geralmente, dentro dessa população, nem todas as células bacterianas expressam um perfil de resistência, fenômeno denominado de heterorresistência (KLOOS; BANNERMAN, 1994).

A resistência mediada pela PBP2a é denominada heterorresistência, uma vez que o gene *mecA* pode ser expresso por algumas ou por todas as células de uma determinada população (KONEMAN et al., 2008). Enquanto o *mecA* é essencial para a resistência à oxacilina, a expressão fenotípica da resistência em células contendo o gene varia. Dois padrões devem ser considerados na detecção da resistência do gênero *Staphylococcus*, um homogêneo e outro heterogêneo. No padrão homogêneo todas as colônias expressam resistência à meticilina sem dificuldade para interpretação no teste. Já no padrão heterogêneo ou heterotípico, somente uma fração de colônias expressa resistência à oxacilina, apesar da presença do gene *mecA*, dificultando a interpretação do teste. Essa expressão heterogênea de resistência é uma das principais características de *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA), tanto provenientes de hospitais quanto da comunidade (ROSSI; ANDREAZZI, 2005). Recentemente, foram relatados novos isolados MRSA fenotipicamente heterogêneos que apresentam sensibilidade à oxacilina, apesar de serem *mecA* positivos. É provável que essas cepas sejam clinicamente relevantes, já que a exposição dos isolados a  $\beta$ -lactâmicos pode resultar em um alto nível de resistência de caráter homogêneo. A hipótese é que a seleção dessas cepas pode ser determinada pela pré-existência de uma população hipermutável, que favorece a sua seleção na presença de oxacilina (CUIROLO; PLATA; ROSATO, 2009).

### 3 Justificativa

As bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. resistentes à meticilina (oxacilina) são frequentemente isoladas em hospitais da cidade de Recife. A presença dessas bactérias acarreta problemas para o tratamento dos pacientes, por restringir a escolha dos antimicrobianos, aumentarem a morbidade e tempo de permanência desses indivíduos no hospital, o que encarece o tratamento e favorece o surgimento de resistência a outros antibióticos. Além disso, em Pernambuco, os estudos referentes aos aspectos moleculares dessa resistência são escassos.

Os métodos fenotípicos para detecção de isolados MRSA são de difícil interpretação e podem falhar na detecção dessa resistência, uma vez que esta pode ser influenciada pelas condições de cultivo. Além disso, estas cepas apresentam um padrão heterogêneo de resistência, onde somente uma fração de colônias expressa resistência à oxacilina, apesar da presença do gene *mecA*, dificultando a interpretação do teste. A detecção por PCR do gene *mecA*, embora seja considerada “padrão ouro”, nem sempre está associada ao fenótipo de resistência em alguns isolados.

Assim, a utilização de técnicas moleculares e imunológicas para monitoramento do nível de resistência frente ao uso de oxacilina e cefalosporina de segunda geração, nos fornecerá instrumentos para uma correta identificação dos isolados de *Staphylococcus* spp. com potencial para desenvolver resistência a  $\beta$ -lactâmicos., Identificando o mecanismo dessa resistência, seja pela indução ou seleção antibiótica permitirá uma orientação mais adequada para o uso dos antimicrobianos e um controle mais eficaz das infecções hospitalares.

## 4 Objetivos

### 4.1 Geral

Avaliar a expressão da proteína de resistência PBP2a em cepas de *Staphylococcus* spp. carreadoras do gene *mecA*.

### 4.2 Específicos

- a) Determinar a Concentração Inibitória Mínima (MIC) da oxacilina e da cefoxitina frente aos isolados de *Staphylococcus* spp.;
- b) Avaliar a expressão da proteína PBP2a em cepas de *Staphylococcus* spp. sensíveis à oxacilina carreadoras do gene *mecA*;
- c) Induzir a produção da proteína de resistência PBP2a em cepas de *Staphylococcus* spp. sensíveis à oxacilina carreadoras do gene *mecA* pela exposição à oxacilina e cefoxitina;
- d) Analisar a mudança do padrão da MIC antes e após a indução pela exposição a antibióticos.

## 5 Material e Método

### 5.1 Local de estudo

As amostras são oriundas de pacientes do Hospital Universitário Oswaldo Cruz do Recife-PE (HUOC). As amostras estiveram conservadas em BHI (*Brain Heart Infusion*)/glicerol a -80°C no Departamento de microbiologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/FIOCRUZ) e foram reativadas a partir de inoculação em caldo BHI, sendo incubadas a 37°C/24h. Em seguida, foi realizada a confirmação fenotípica a partir do aspecto das colônias crescidas em agar sangue (produção de pigmento e hemólise) e dos testes de produção de catalase e coagulase em tubo.

### 5.2 Amostras – Cultura de bactérias e caracterização fenotípica

Foi selecionado um total de 42 amostras de *Staphylococcus* spp, sendo 25 isolados de *S. aureus* e 17 de *Staphylococcus* coagulase negativos (SCN), todos apresentando o gene *mecA*. As amostras tiveram seu perfil de susceptibilidade testados no laboratório de Bacteriologia do HUOC, por meio de cultivo de uma suspensão bacteriana, com turvação igual a 0,5 da escala McFarland, em ágar Mueller-Hinton suplementado com 4% de NaCl e 6µg/ml de oxacilina (screen agar) o que nos garante saber o perfil de susceptibilidade prévio dessas amostras. No Departamento de Microbiologia do CPqAM/FIOCRUZ foi verificado a presença do gene *mecA* através de reações de PCR. As amostras são caracterizadas como de infecção hospitalar seguindo critérios da CDC, 1996.

### 5.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC)

A determinação do MIC foi realizada pelo método de microdiluição em caldo Mueller Hinton segundo as recomendações do CSLI (2010) utilizando oxacilina e cefoxitina (Sigma-Aldrich/Alemanha). A concentração da solução estoque foi calculada a partir da maior concentração testada para cada antimicrobiano, do volume de caldo Mueller-Hinton utilizado e do volume final da solução estoque (TERASAWA, 2006). A quantidade em miligrama, do antimicrobiano, necessária para preparar as soluções foi calculada usando a seguinte fórmula:

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

Após o preparo, as soluções estoque foram esterilizadas por filtração em membrana Millipore de 0,22 µm de diâmetro, aliquotadas em frascos contendo 2 mL e estocadas -80°C. A partir da solução-estoque foram feitas diluições 1:2 até atingir a menor concentração capaz de inibir o crescimento visível da bactéria. Foram feitas 12 diluições do antibiótico oxacilina (256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.12 µg /mL) e 12 de cefoxitina (512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, µg/mL).

Para o preparo do inóculo, uma suspensão de concentração referente à turvação 0,5 da escala MacFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL) foi acertada com o auxílio de aparelho fotométrico, em absorvância de 600 nm. Foram distribuídos 50 µL de cada suspensão bacteriana em placas de ELISA (*Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*) de 96 poços, com o auxílio de um multi-inoculador. Utilizou-se como controle de qualidade cepas *American Type Culture Collection* (ATCC). Para este teste, foram utilizadas a cepa *S. aureus* ATCC 33591 resistente à oxacilina e *S. aureus* ATCC 29213, sensível à oxacilina.

As análises foram concentradas nas cepas de *Staphylococcus* spp. carreadoras do gene *mecA* e fenotipicamente sensíveis. As faixas de susceptibilidade foram determinadas seguindo as normas do CLSI (2010) (tabela 2).

Tabela 2- Padrão de susceptibilidade para os antibióticos oxacilina e cefoxitina para *Staphylococcus aureus* e coagulase negativos.

Agente antimicrobiano	Padrão interpretativo (µg/mL)		Comentários
	S	R	
Oxacilina	≤ 2	≥ 4	Para <i>S. aureus</i>
Cefoxitina	≤ 4	≥ 8	Cefoxitina é usada como padrão para resistência a oxacilina
Oxacilina	≤ 0.25	≥ 0.5	Para <i>Staphylococcus</i> Coagulase Negativos

Fonte: Clinical and Laboratory Standards Institute (2010).

#### 5.4 Padronização da técnica de Imunofluorescência Indireta

Isolados da bactéria foram testados em três diferentes faixas de Densidade Óptica (O.D) com comprimento de onda de 600nm: 0.08 a 0.1, 0,1 a 0.2 e 0.2 a 0,4. Foi testado também as diluições do anticorpo a ser utilizado nas reações. Para o anticorpo primário (soro anti-PBP2a previamente produzido) foram testadas as diluições de 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:8000. Nos testes para padronização da técnica foi utilizada a cepa de *S. aureus* ATCC 29213 como controle negativo e a *S. aureus* ATCC 33591 como controle positivo da reação.

### 5.5 Reconhecimento da PBP2a por Imunofluorescência Indireta

A suspensão bacteriana obtida após incubação do isolado por 24h na presença do antibiótico na concentração estabelecida no teste de MIC em caldo Mueller Hinton, foi centrifugada por 5 minutos a 26292,2 G a 4°C e ressuspendida em PBS. Esse procedimento foi repetido 3 vezes ou até a obtenção de células livre do meio de cultura. Posteriormente foi medida a absorbância pelo uso do espectrofotômetro e foram feitas diluições até a obtenção da Densidade óptica (O.D<sub>600nm</sub>) variando de 0,08 a 0,10. A suspensão celular foi depositada em lâminas de microscopia e incubada por 2 horas a 37°C ou deixadas à temperatura ambiente “overnight”. Após secagem foram adicionados às lâminas 20 µl do anticorpo primário – o antissoro policlonal anti-PBP2a, previamente produzido em coelho na diluição de 1:1000 (MANGUEIRA, 2009). A lâmina foi incubada por 30 minutos em estufa a 37°C, submetida a lavagem com PBS e posteriormente deixada em cuba de lavagem por 15 minutos. Ao abrigo da luz, foi adicionado 20µl do anticorpo secundário, anti-IgG de coelho marcado com FITC, diluído em Azul de Evans (1:25 em PBS). A leitura do resultado foi realizada em microscópio de fluorescência. As cepas ATCC sabidamente negativas e positivas para o gene *mec*, foram utilizadas como controles negativos e positivos, respectivamente.

### 5.6 Extração de proteínas total de parede celular

Para extração das proteínas de parede foi utilizada uma adaptação dos protocolos descritos por Reynolds; Brown, (1985), Katayama Zhang e Chambers, (2004); Ender Callum e Berger-Bächli, (2008), gerando dessa forma um novo protocolo como é descrito a seguir. Três a cinco colônias de *Staphylococcus*, previamente plaqueadas em ágar sangue, foram crescidas em 5 mL de BHI adicionadas de 40 µL/mL de oxacilina até alcançar a O.D.<sub>600</sub> de 0,6 a 0,8. Uma alíquota de 1,5 mL desta cultura foi centrifugada por 5 min a 26292,2 G a 4°C. O sobrenadante foi desprezado com auxílio de bomba de vácuo e ao sedimento foi adicionado 1 mL de tampão (50mM tris-HCl, pH 7,5; 150mM NaCl; 5mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,5), 20 µL de lisostafina (100 µg/mL), 20 µL de RNase (5 µg/mL) e 1 µL de DNase, homogeneizado e incubado em banho maria 37°C por 30 min. As amostras foram resfriadas a 4°C por 5 min e então centrifugadas por 10 min a 26292,2 G, 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento lavado 2 vezes com PBS pH 7,5 (centrifugações de 5 min a 26292,2 G). Após as lavagens, foi adicionado ao sedimento 60 µL de LE2x. As amostras foram fervidas por 2

minutos, deixadas em gelo por 5 minutos, homogeneizadas e migradas em gel SDS-PAGE 15% por 1h e 30 min. Posteriormente foi realizada a transferência para membrana de PVDF, 96V por 1 hora.

### 5.7 Reconhecimento da PBP2a por *Western blot*

A membrana foi bloqueada em solução de leite a 5% TBS/ Tween por 1 hora, sendo posteriormente incubado com o anticorpo primário, o soro anti-PBP2a produzido, em solução de leite a 1% TBS 1X/Tween por 1 hora. A membrana foi lavada 3 vezes com TBS 1X/Tween por 10 minutos cada, seguida de nova incubação, durante 1 hora, com o segundo anticorpo anti IgG de coelho marcado com peroxidase, numa solução de leite a 1% TBS 1X/Tween. Decorrido esse tempo, foram realizadas mais 3 lavagens com TBS 1X/Tween por 10 minutos. A membrana foi então incubada numa solução de luminol 1,2 mM, iodofenol 0,4 mM e peróxido de hidrogênio 0,03% por 2 minutos para reação de quimiluminescência, e depois de seca exposta a um filme de auto-radiografia durante 1 e 2 minutos. O filme foi revelado com uma solução de Dektol (1:2) por 3 minutos e depois fixado, deixado em água corrente e posteriormente colocada para secar.

### 5.8 Testes de indução de resistência

Amostras de *Staphylococcus* sensíveis à oxacilina e portadoras do gene *mecA* foram expostas às concentrações de oxacilina e cefoxitina pré-estabelecidas pelo teste de MIC (Tabela 3), baseado no teste realizado por Kampf et al. (2003).

Uma alíquota de 100  $\mu$ L de uma cultura crescida “overnight” em caldo Mueller Hinton, livre de antibiótico, com absorbância em 600nm variando de 0,08 a 0,10, que é equivalente à solução padrão de 0,5 McFarland, foi inoculada em placa contendo as concentrações dos antibióticos e incubada a 37°C por 24h.

O poço com maior concentração de antibiótico, no qual foi visível o crescimento após o período de incubação, teve sua O.D. medida para posterior análise. O crescimento foi então plaqueado em meio ágar sangue para confirmação da pureza da suspensão bacteriana.

A partir de colônias crescidas em placa da cultura foi feita uma suspensão bacteriana em solução salina 0,9%, até absorbância de 0,08 a 0,10 para dar continuidade a indução voltando a expor os isolados às novas concentrações estabelecidas no experimento anterior,

para oxacilina e cefoxitina. Foram realizados experimentos até alcançar a concentração que possibilitasse considerar as cepas como resistentes.

### 5.9 Teste de seleção de linhagens resistentes

As amostras foram plaqueadas em ágar sangue e incubadas em estufa a 35°C por 24 horas. Da cultura crescida foi selecionado aleatoriamente seis a dez colônias e passadas para o caldo BHI (*Brain Heart Infusion*). A partir da cultura crescida em caldo foi realizada a extração de DNA, segundo protocolo de Freitas et al. (2008). A reação de PCR, foi realizada utilizando *primers* que ancoram em região interna do gene *mecA*. O *primer* descrito por Perez-Roht *et al.*, (2001) (5'-TAGGGATCCGTAGAAATGACTGAACGTCCGATAA-3') foi utilizado como *forward* e a sequência descrita por Petinaki *et al.*, (2001), (5'-TTGCTCGAGTTCTGCAGTACCGGATTTGC-3') foi utilizado como *reverse*.

A reação de amplificação foi preparada em volume total de 25 µL por tubo, compreendendo: KCl 50 mM; Tris-HCl 10 mM; MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM; dNTP 200 µM; 20 pmol de cada primer; 20 ng de DNA genômico; 1 U de Taq DNA polimerase. As reações foram realizadas em termociclador (Biometra), programado inicialmente para 30 ciclos térmicos, com desnaturação de um minuto a 94°C, anelamento de um minuto a 50°C e uma extensão de um minuto a 72°C seguido de uma etapa de alongamento final de 10 minutos a 72°C. O produto da amplificação foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% e corado com brometo de etídio, visualizado em transluminador UV e digitalizado (Kodak digital science).

A partir das mesmas colônias selecionadas, foram realizados os ensaios de Imunofluorescência indireta (item 5.4) e *Western blot* (itens 5.5 e 5.6) para análise da presença da PBP2a.

### 5.10 Testes de disco de ampicilina com ácido clavulânico

A realização deste teste foi baseada no método de Kirby-Bauer onde inicialmente preparou-se uma suspensão bacteriana com turvação equivalente à escala 0,5 de MacFarland com o auxílio de aparelho fotométrico, a qual foi inoculada na superfície do ágar Mueller-Hinton. O antimicrobiano utilizado foi uma associação de ampicilina com inibidor de beta-lactamase (ácido clavulânico) e os discos foram depositados sobre este meio com pinça

estéril. As placas foram incubadas a 35°C durante 24 horas. Isolados apresentando diâmetro de halo de inibição  $\leq 19$  mm são classificados como resistentes, já os isolados com halos  $\geq 20$  mm são classificados como sensíveis, produtores de  $\beta$ -lactamase (CLSI, 2010). Foram testadas amostras que apresentaram altas MIC para cefoxitina, característico de resistência, porém negativas nos ensaios imunológicos para reconhecimento da PBP2a.

## **6 Considerações Éticas**

Este trabalho contou com a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Oswaldo Cruz (Parecer nº 17.7.0052 CEP/HUOC) (Anexo A).

## 7 Resultados

### 7.1 Concentração Inibitória Mínima (MIC)

Entre os 42 isolados investigados neste estudo foi observado que das 25 amostras de *S. aureus*, 14 amostras tiveram  $MIC \leq 4 \mu\text{g/ml}$  para cefoxitina e 11 amostras apresentaram  $MIC \geq 8 \mu\text{g/ml}$ . Ao serem testados para oxacilina, 18 amostras apresentaram  $MIC \leq 2 \mu\text{g/ml}$ , enquanto que 7 isolados apresentaram  $MIC \geq 4 \mu\text{g/ml}$ . Os 14 isolados sensíveis à cefoxitina também foram sensíveis à oxacilina. Entretanto, entre os 18 isolados sensíveis à oxacilina, quatro apresentaram perfil de resistência à cefoxitina com MIC de 16  $\mu\text{g/ml}$  e 128  $\mu\text{g/ml}$ . Correlacionando o teste de MIC com o *screen* para os isolados de *S. aureus*, foi observado que apenas um isolado apresentou  $MIC \leq 2 \mu\text{g/ml}$  à oxacilina e  $MIC \geq 8 \mu\text{g/ml}$  à cefoxitina, sendo positivo no *screen*. Dezesete isolados apresentaram teste de *screen* negativo, ou sensível e houve correlação com o MIC à oxacilina. Destas, 3 tiveram MIC para cefoxitina  $\geq 8 \mu\text{g/ml}$  (Tabela 3).

Todos os isolados de SCN tiveram  $MIC \geq 4 \mu\text{g/ml}$  para cefoxitina. Ao observar o perfil para oxacilina, 8 isolados apresentaram  $MIC \leq 0,25 \mu\text{g/ml}$  e 9 tiveram  $MIC \geq 0,5 \mu\text{g/ml}$ . Ao correlacionar o teste do MIC com o teste de *screen*, dos 8 isolados com  $MIC \leq 0,25 \mu\text{g/ml}$ , 2 foram resistentes no teste *screen* e dos 9 isolados com  $MIC \geq 0,5 \mu\text{g/ml}$  à oxacilina, 2 apresentaram sensibilidade no teste (Tabela 3).

Com base nesses dados foi possível constatar que 15 isolados podem ser classificados como OS-MRS. Embora, três destes isolados foram resistentes à cefoxitina.

Tabela 3-- Caracterização dos isolados investigados neste estudo.

Nº/ano	Espécie	MIC (Cefo) µg/ml	MIC(Oxa) µg/ml	Oxacilina 6mg	<i>mecA</i>	IFI	WB
236/02	<i>S.aureus</i>	128	32	R	+	+	+
794/03	<i>S.aureus</i>	128	64	R	+	+	+
227/02	<i>S.aureus</i>	16	1	R	+	NF	NF
853/03	<i>S.aureus</i>	128	64	R	+	NF	NF
038/04	<i>S.aureus</i>	256	32	R	+	NF	NF
464/04	<i>S.aureus</i>	256	128	R	+	NF	NF
710/04	<i>S.aureus</i>	256	128	R	+	NF	NF
969/04	<i>S.aureus</i>	128	64	R	+	NF	NF
09/04	SCN	64	32	R	+	+	+
162/02	SCN	32	8	R	+	NF	NF
237/02	SCN	8	0,5	R	+	NF	NF
804/03	SCN	8	0,5	R	+	NF	NF
013/04	SCN	8	0,12	R	+	NF	NF
012/04	SCN	256	16	R	+	NF	NF
070/04	SCN	128	4	R	+	NF	NF
412/04	SCN	128	0,25	R	+	NF	NF
992/04	SCN	64	16	R	+	NF	NF
47/02	<i>S.aureus</i>	4	0,015	S	+	+	+
121/02	<i>S.aureus</i>	4	0,03	S	+	+	+
126/02	<i>S.aureus</i>	4	0,06	S	+	+	+
202/02	<i>S.aureus</i>	2	0,03	S	+	+	+
666/03	<i>S.aureus</i>	2	0,015	S	+	+	+
687/03	<i>S.aureus</i>	2	0,06	S	+	+	+
722/03	<i>S.aureus</i>	2	0,06	S	+	-	-
741/03	<i>S.aureus</i>	4	0,03	S	+	-	-
749/03	<i>S.aureus</i>	4	0,06	S	+	+	+
807/03	<i>S.aureus</i>	128	2	S	+	+	+
808/03	<i>S.aureus</i>	128	2	S	+	+	+
835/03	<i>S.aureus</i>	2	0,12	S	+	+	+
599/04	<i>S.aureus</i>	2	0,03	S	+	+	+
827/04	<i>S.aureus</i>	2	0,015	S	+	+	+
862/04	<i>S.aureus</i>	16	0,25	S	+	-	-
990/04	<i>S.aureus</i>	4	0,03	S	+	+	+
995/04	<i>S.aureus</i>	4	0,06	S	+	+	+
81/02	SCN	128	64	S	+	-	-
105/02	SCN	128	0,015	S	+	-	-
109/02	SCN	128	64	S	+	-	-
124/02	SCN	4	0,06	S	+	-	-
522/04	SCN	8	0,12	S	+	-	-
525/04	SCN	16	0,25	S	+	-	-
942/04	SCN	128	0,015	S	+	+	+
976/04	SCN	8	0,12	S	+	+	+

Fonte: Elaborado pela autora.

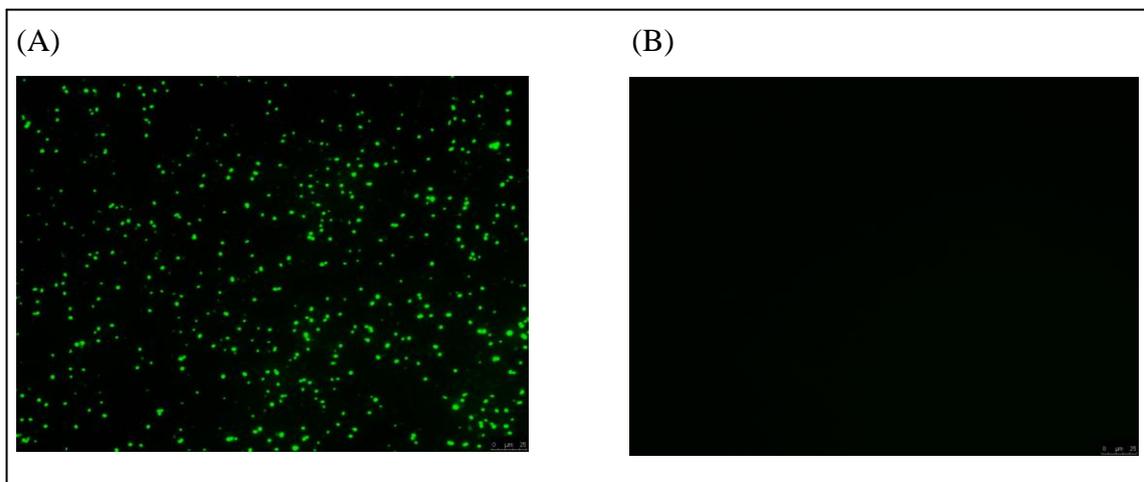
Nota: SCN: *Staphylococcus* Coagulase Negativo; NF: Não feitos; R: Resistente; S: Sensível; MIC(cefo): Concentração Inibitória Mínima da cefoxitina; MIC(oxa): Concentração Inibitória Mínima da oxacilina; IFI:Imunofluorescência Indireta; WB: *Western blot*.

## 7.2 Padronização da técnica de Imunofluorescência Indireta

Determinou-se o a O.D.<sub>600</sub> de 0,08 a 0,10 e o uso do anticorpo primário na concentração de 1:1000. O 2º anticorpo (anti-IgG de coelho marcado com FITC) já estava disponível no laboratório para uso na diluição de 1:800.

Houve reconhecimento da proteína característica da resistência (PBP2a) apenas no controle positivo confirmando a viabilidade da técnica e a especificidade do soro (Figura 5).

Figura 5- Imunofluorescência indireta.



Fonte: Elaborado pela autora

Nota: (A) Reconhecimento da proteína de resistência PBP2a; cepa *S. aureus* ATCC 33591, resistente, controle positivo. (B) cepa *S. aureus* ATCC 29213, sensível, controle negativo.

## 7.3 Reconhecimento da PBP2a por *Western blot* e Imunofluorescência Indireta

O soro anti-PBP2a reconheceu a proteína PBP2a em 19 isolados. Entre os isolados caracterizados como sensíveis à cefoxitina e oxacilina e *mecA* positivos, 12 foram positivos na IFI e no *Western blot* na ausência do antibiótico. Sete isolados foram resistentes à cefoxitina e/ou oxacilina. Nove isolados foram negativos em ambos os ensaios e destes, 2 foram resistentes à cefoxitina e oxacilina, 4 foram resistentes à cefoxitina e sensíveis à oxacilina e 3 foram sensíveis a ambos os antibióticos (Tabela 3).

#### 7.4 Teste de indução da resistência

No primeiro teste de indução com oxacilina observou-se a variação da MIC nas primeiras exposições ao antibiótico, porém na 2ª e 3ª etapas de indução houve uma estabilização e a MIC se manteve constante (Tabela 4).

Tabela 4- Primeiro teste de Indução com Oxacilina; variação da MIC pela exposição ao antibiótico.

Isolado	Espécie	MIC Inicial (µg/ml)	1ª indução (µg/ml)	2ª indução (µg/ml)	3ª indução (µg/ml)
121	S. aureus	0,03	0,25	0,25	0,25
666	S. aureus	0,015	0,06	0,5	0,5
976	SCN	0,12	0,25	1	1

Nota: MIC: Concentração Inibitória Mínima; µg/ml: micrograma por microlitro; SCN: Staphylococcus Coagulase Negativo.

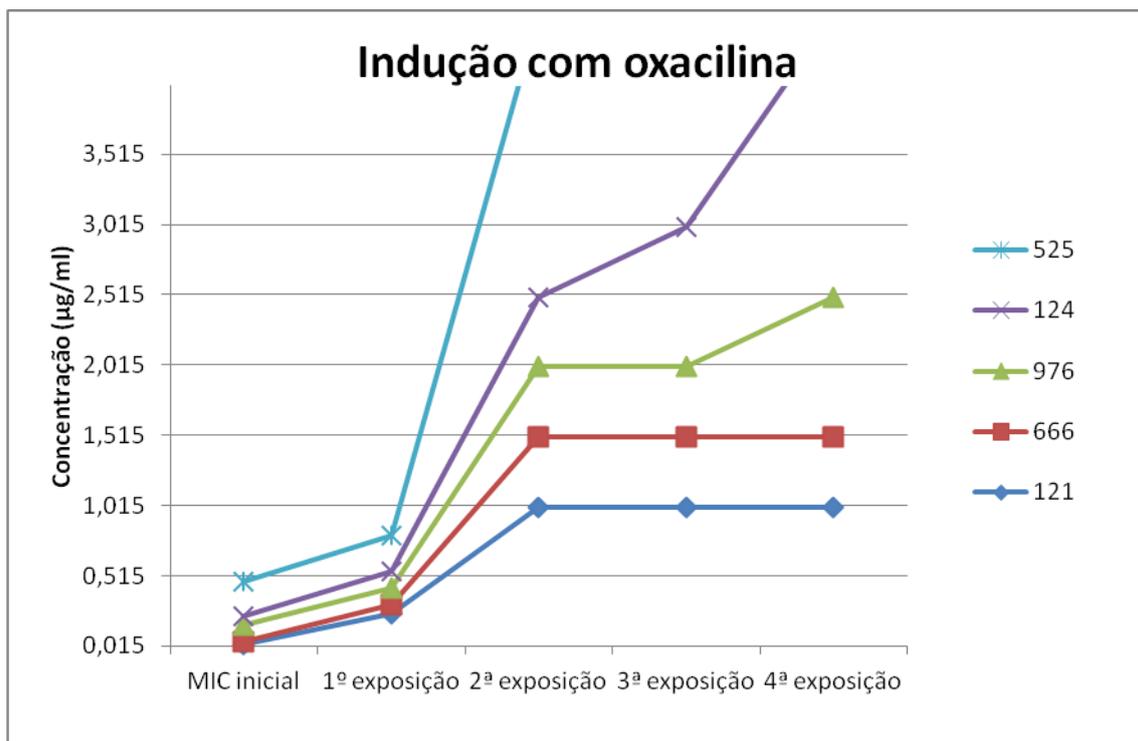
No segundo teste de indução as amostras 121, 666 e 976 apresentaram o mesmo perfil do teste anterior confirmando a reprodutibilidade do teste. Alguns alcançaram a MIC de 2 µg/mL, chegando até a 4 µg/mL (Tabela 5)(Gráfico 1). No teste de indução com o antibiótico cefoxitina, observou-se uma maior variação da MIC (Tabela 6) (Gráfico 2).

Tabela 5- Segundo teste de indução com oxacilina; variação da MIC pela exposição ao antibiótico.

Isolado	Espécie	MIC Inicial ( $\mu\text{g/ml}$ )	1ª Exposição ( $\mu\text{g/ml}$ )	2ª Exposição ( $\mu\text{g/ml}$ )	3ª Exposição ( $\mu\text{g/ml}$ )	4ª Exposição ( $\mu\text{g/ml}$ )
121	<i>S. aureus</i>	0,03	0,25	1	1	1
124	SCN	0,06	0,12	0,5	1	2
525	SCN	0,25	0,25	2	4	4
666	<i>S. aureus</i>	0,015	0,06	0,5	0,5	0,5
976	SCN	0,12	0,12	0,5	0,5	1

Nota: MIC: Concentração Inibitória Mínima;  $\mu\text{g/ml}$ : micrograma por microlitro; SCN: Staphylococcus Coagulase Negativo.

Gráfico 1- Variação da MIC pela exposição ao antibiótico oxacilina



Fonte: Elaborado pela autora.

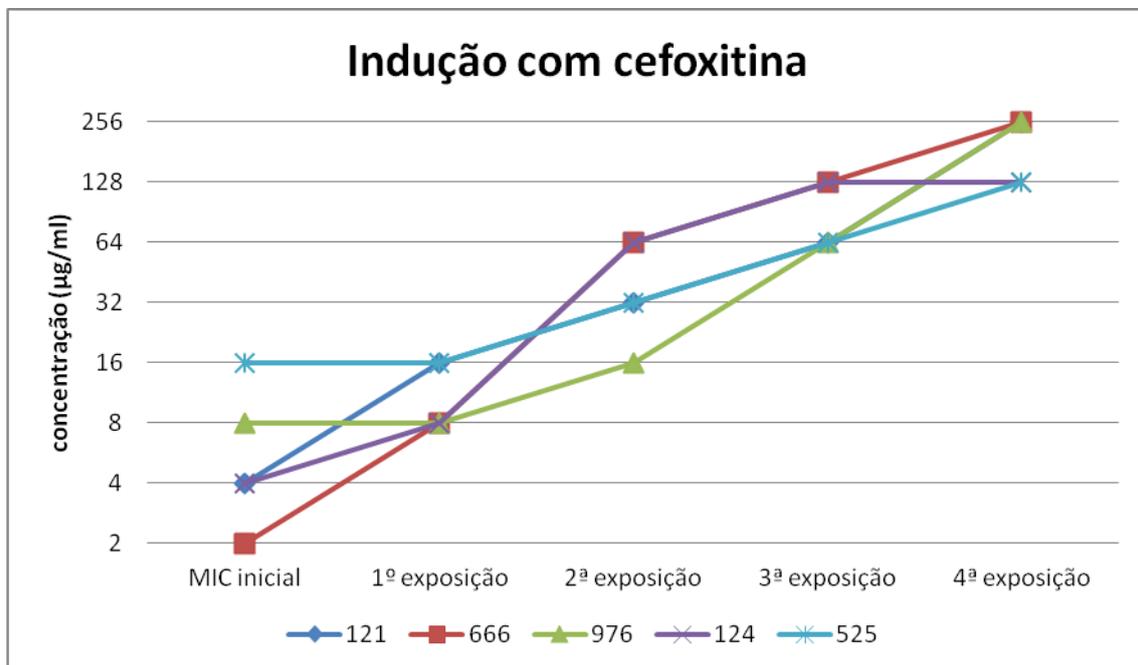
Nota: MIC: Concentração Inibitória Mínima;

Tabela 6- Teste de Indução com Cefoxitina; variação da MIC pela exposição ao antibiótico.

Isolado	Espécie	MIC Inicial (µg/ml)	1ª Exposição (µg/ml)	2ª Exposição (µg/ml)	3ª Exposição (µg/ml)	4ª Exposição (µg/ml)
121	<i>S. aureus</i>	4	16	32	64	256
124	SCN	4	8	64	128	128
525	SCN	16	16	32	64	128
666	<i>S. aureus</i>	2	8	64	128	256
976	SCN	8	8	16	64	256

Nota: MIC: Concentração Inibitória Mínima; µg/ml: micrograma por microlitro; SCN: Staphylococcus Coagulase Negativo.

Gráfico 2- Variação da MIC pela exposição ao antibiótico cefoxitina.



Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: MIC: Concentração Inibitória Mínima

### 7.5 Teste de seleção de linhagens resistentes

Foi observada variabilidade dentro de um mesmo isolado quanto à presença do gene *mecA*. Dos quatro isolados escolhidos para o teste foi possível notar que algumas colônias amplificaram o gene *mecA*, enquanto em outras colônias do mesmo isolado o gene não foi amplificado ou foi fracamente amplificado (Figuras 6 e 7). Exceto pelo isolado 236 (*S. aureus*), que amplificou o gene *mecA* em todas as colônias analisadas e foi positivo também nos ensaios de *Western blot* e IFI (figura 8).

Figura 6- Produto da amplificação do gene *mecA* e Imunofluorescência indireta (IFI) com reconhecimento da proteína de resistência PBP2a de colônias do isolado 525. Avaliação do perfil de heteroresistência no teste de seleção com destaque para o padrão de banda na PCR e a respectiva IFI das colônias 2, 3, 4, 5 e 6.

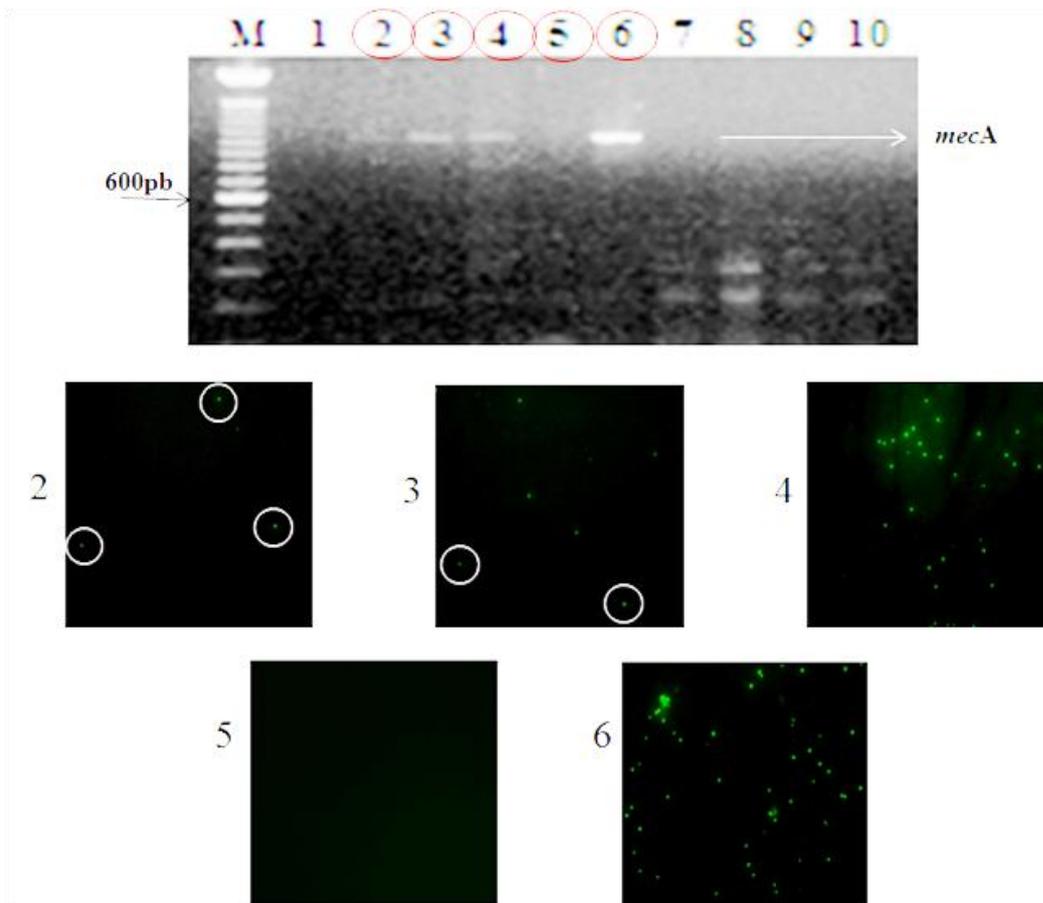


Figura 7- Produto da amplificação do gene *mecA* e Imunofluorescência indireta (IFI) com reconhecimento da proteína de resistência PBP2a de colônias do isolado 666. Avaliação do perfil de heteroresistência no teste de seleção com destaque para o padrão de banda na PCR e a respectiva IFI das colônias 1, 6, 8, 9 e 12.

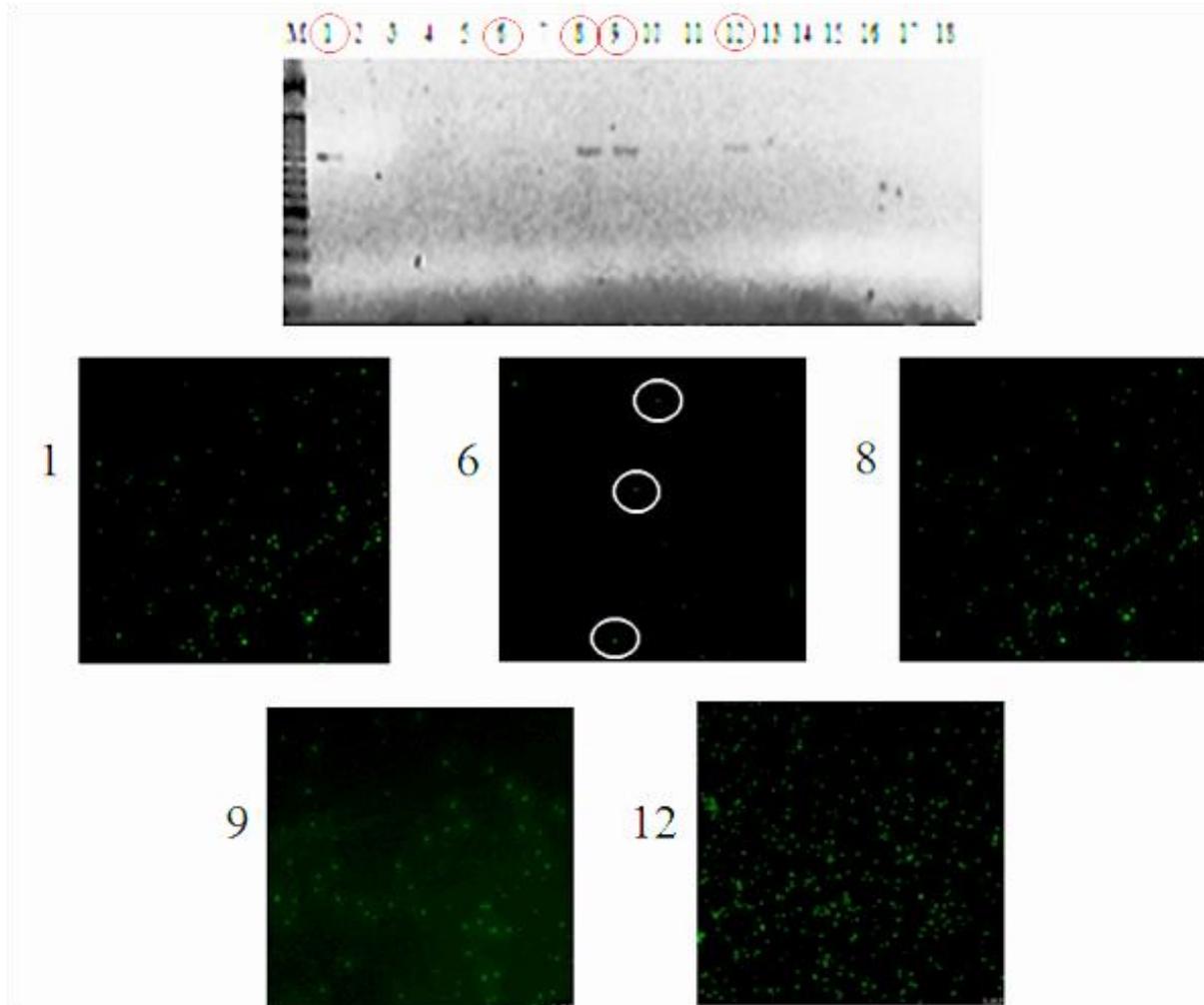
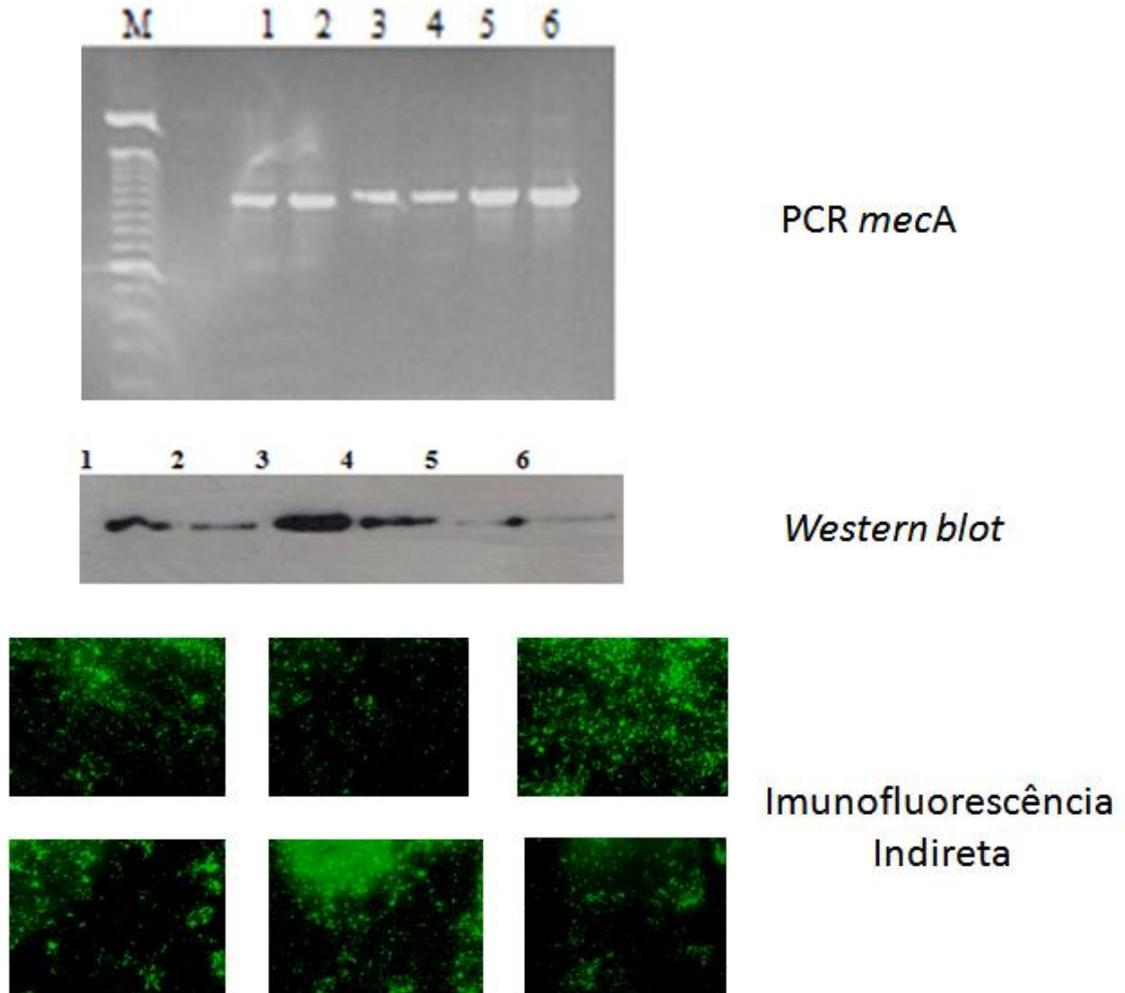


Figura 8- Produto da amplificação do gene *mecA*, filme de auto-radiografia revelando o reconhecimento da PBP2a nas colônias por ensaios de *Western blot* e Imunofluorescência indireta (IFI) com reconhecimento da proteína de resistência em 6 colônias selecionadas aleatoriamente da amostra 236.



## 7.6 Teste de disco Ampicilina com Ácido clavulânico

Os quatro isolados testados apresentaram perfil de resistência no teste de disco da associação de ampicilina com inibidor de  $\beta$ -lactamase (tabela 7).

Tabela 7- Perfil das amostras frente ao teste de susceptibilidade à combinação de  $\beta$ -lactâmico com inibidor de  $\beta$ -lactamase.

<b>Nº/ano</b>	<b>Espécie</b>	<b>origem</b>	<b>MIC (Cefo)</b>	<b>mecA</b>	<b>IFI</b>	<b>WB</b>	<b>Halo (mm)</b>	<b>Perfil</b>
<b>81</b>	SCN	Hemocultura	128	+	-	-	10	R
<b>105</b>	SCN	Hemocultura	128	+	-	-	10	R
<b>109</b>	SCN	Hemocultura	128	+	-	-	7	R
<b>525</b>	SCN	Ponta de cateter	16	+	-	-	10	R

Nota: MIC (cefo): Concentração Inibitória Mínima à cefoxitina; mm: milímetros; SCN: Staphylococcus Coagulase Negativo; IFI: Imunofluorescência Indireta; WB: *Western blot*; R: Resistente.

## 8 Discussão

Em laboratórios clínicos, na maioria das vezes a resistência à oxacilina em *Staphylococcus* é determinada utilizando dois testes paralelos: disco difusão e o teste utilizando oxacilina em meio sólido. A resistência ou sensibilidade é relatada apenas quando ambos os testes indicam o mesmo resultado. Estudos recentes indicam que o teste usando cefoxitina possui qualidade superior à maioria dos métodos diagnósticos atualmente utilizados, sendo um método aceito para detecção de amostras MRS (ANAND, 2009). Nesta investigação, testamos a suscetibilidade dos nossos isolados frente a duas drogas, cefoxitina, uma cefalosporina de segunda geração, recomendada pelo CLSI para determinação da resistência decorrente da expressão do gene *mecA*, e oxacilina, droga de escolha no tratamento de cepas produtoras de  $\beta$ -lactamase. Foi verificado o comportamento dos isolados a esses fármacos, por meio da Concentração Inibitória Mínima (MIC) e teste de screen para oxacilina. Observamos, que ambos os testes, para a maioria dos isolados, apresentou resultado semelhante. Alguma discrepância ocorrida em alguns poucos isolados pode ser explicada pela alta sensibilidade da cefoxitina, corroborando com a recomendação do CLSI para o uso da cefoxitina para detecção de cepas MRS. Segundo Anand et al (2009), o teste de screen positivo em isolados de *S. aureus*, geralmente indica que tal isolado seja *mecA* positivo. Ocasionalmente, contudo, isolados heterorresistentes *mecA*-positivo podem não ser detectados devido a baixa expressão de resistência. Além disso, o teste de screen pode ter seu poder discriminatório afetado por condições físicas e ambientais como pH, temperatura, tempo de incubação, inóculo e componentes do meio Mueller Hinton.

Em nossos isolados, foi observado que 15 deles foram sensíveis à cefoxitina e tiveram MIC para oxacilina  $\leq 2\mu\text{g/ml}$ . Hososaka (2007), e um pouco antes Petinaki et al (2001), já haviam documentado esse perfil, ao que eles denominaram de cepas OS-MRS. Tais cepas, embora apresentem o gene *mecA*, apresentam perfil de sensibilidade à oxacilina. Este fenômeno pode ser explicado pela regulação do gene *mecA*. É sabido que a regulação da expressão de PBP2a ocorre por ação de uma proteína sinalizadora ou indutora: MecRI, uma proteína transmembrana codificada pelo gene *mecR1*. A ligação do antibiótico a esta proteína estimula uma mudança conformacional da mesma, levando a produção de metaloprotease que cliva a proteína repressora MecI, em fragmentos incapazes de formar dímeros e se ligar ao DNA. Sem a repressão de MecI a transcrição do gene estrutural é liberada para produção da PBP2a (ARCHER; BOSILEVAC, 2001; ZHANG ET AL., 2001).

Alguns testes para detecção de cepas MRS são simples e possuem sensibilidade e especificidade entre 97 e 100%, respectivamente. O teste de aglutinação em látex, por exemplo, utiliza anticorpos monoclonais direcionados para proteína PBP2a. A leitura é realizada visualmente a partir do padrão de aglutinação e se mostra positivo a partir da aglutinação do látex presente na solução (MOHANASOUNDARAM; LALITHA, 2008). Tal teste reforça a idéia de que nem todas as cepas *mecA* positivo, podem estar produzindo PBP2a. Desta forma, a utilização de novas abordagens que permita avaliar a expressão da proteína pode fornecer um perfil de resistência que levará a uma conduta clínica mais segura.

No presente estudo, buscamos verificar a presença da PBP2a utilizando um soro policlonal anti-PBP2a produzido em coelhos (MANGUEIRA,2009). Foram aplicadas duas técnicas para essa detecção, a Imunofluorescência indireta (IFI) e o *Western blot* (WB). Nossos resultados mostraram que os dados obtidos pela técnica do WB e da IFI apresentaram-se semelhantes. Entretanto, o teste da IFI foi mais sensível na detecção de cepas produtoras de PBP2a, que o teste de WB. Esse fato foi devido a alguns isolados serem heterorresistentes, em que foi possível observar a presença de poucas células fluorescentes na IFI, enquanto que no WB, não houve reconhecimento da proteína apesar da especificidade do anticorpo utilizado. Esses dados sugerem que talvez a expressão desta proteína não fosse suficiente para sua visualização no filme de auto-radiografia.

Segundo Darini e Palazzo, (2004) a detecção da resistência mediada pela PBP2a é complicada devido aos diferentes níveis de resistência à meticilina apresentada pela população de *Staphylococcus* spp. Dois fenótipos de resistência são encontrados em cepas meticilina resistentes: homotípico e heterotípico. O homotípico possui linhagens expressando resistência de alto nível, enquanto que no perfil heterotípico, apenas subpopulações expressam a resistência (NIEMEYER et al, 1996). De fato, nossos achados revelaram que a expressão da proteína de PBP2a se mostrou variável entre cepas, carreadoras do gene *mecA*. Nove isolados foram negativos na IFI e WB, embora apresentassem altos MIC para cefoxitina e baixo MIC para oxacilina, além de sensíveis também no teste de screen. Quatro desses isolados ao serem testados com ampicilina associada ao ácido clavulânico apresentaram perfil de resistência. Isolados apresentando resistência e *mec*-negativo mostram altos níveis de atividade das  $\beta$ -lactamases, exibindo baixos valores de MIC na associação de  $\beta$ -lactâmicos com inibidores da ação dessas enzimas, como o ácido clavulânico ou sulbactam. Entretanto nossas amostras apresentaram perfil *mec*-positivo, o que nos leva a sugerir que outros fatores estão envolvidos na resistência dessas amostras que não a expressão de PBP2a e  $\beta$ -lactamase (HIRAMATSU et al. 2001). Entretanto dentre aqueles 19 isolados positivos tanto na IFI quanto no WB, apenas

3 apresentaram altos valores de MIC para cefoxitina e oxacilina, inclusive no teste *screen*. Neste caso é possível associar tal perfil a expressão de PBP2a ou a um perfil homotípico. Isso pode ser exemplificado por meio da cepa 236, em que foi verificado a presença do gene *mecA* no teste de seleção de linhagens resistentes e todas as colônias apresentavam o gene *mecA* e todas reconheceram o soro anti-PBP2a tanto na IFI quanto no *Western blot*.

Ao submetermos algumas amostras a concentrações crescentes de antibióticos, foi observado que a concentração máxima a qual os isolados mostraram visível crescimento depois de exposição repetitiva daqueles *mecA*-positivo, apresentando sensibilidade à cefoxitina e oxacilina foi de 4µg/ml para oxacilina e 256 µg/ml para cefoxitina. Os dados obtidos com o teste de indução, nos mostra claramente que a cefoxitina induz mais facilmente essas cepas que a oxacilina. Esse achado pode ser explicado pela seleção de mutantes altamente resistentes, desde que alguns destes foram positivos na IFI e WB, antes do início do teste. Esse achado reforça a necessidade de um diagnóstico fidedigno destas cepas nas unidades de saúde, já que uma terapia antibiótica equivocada pode levar ao um aumento da resistência e a escolha de antibióticos de última escolha como é o caso da Vancomicina.

Na avaliação de heterorresistência, Finan et al. (2002) relataram que o perfil predominante é o fenótipo heterogêneo, caracterizado pela presença de uma pequena população de células (geralmente 0,1- 0,01%) resistentes enquanto a maioria da população seria morta por baixas concentrações do antibiótico. Um dado curioso encontrado, foi a variabilidade na presença do gene *mecA* e expressão da PBP2a dentro de uma mesma população. Dos 4 isolados escolhidos para o teste foi possível notar que, em 3 deles (525, 666 e 976), algumas colônias amplificaram o gene *mecA* e tiveram respectiva expressão da PBP2a, enquanto em outras colônias do mesmo isolado o gene não foi amplificado ou foi fracamente amplificado e conseqüentemente observou-se ausência total ou fraco reconhecimento do seu produto, a proteína de resistência PBP2a. Já o isolado 236 (*S. aureus*) apresentou amplificação do gene *mecA* em todas as colônias analisadas e foi positivo também nos ensaios de WB e IFI demonstrando um perfil homogêneo com alto nível de resistência. Tal dado nos leva a questionar se o fato de alguns isolados apresentarem um perfil de heterorresistência seria devido a questões transcricionais do operon *mec*, ou devido a algumas células dentro de uma mesma população não apresentarem o cassete SCC*mec*. Desta forma acreditamos que dentro do processo de resistência podem ocorrer dois fenômenos distintos: primeiro uma seleção, onde frente ao uso de antibióticos, algumas células que não possuem o gene irão morrer e aquelas células com maior resistência serão selecionadas em detrimento às cepas sensíveis. Ao mesmo tempo não podemos descartar a possibilidade de algumas células

com o gene *mecA* estejam sendo fortemente reprimidas por seu repressor (*mecI*) e em algum momento do processo este sofra mutação. O próprio Niemeyer (1996), já havia confirmado isso ao afirmar que mutações são necessárias dentro da região reguladora do gene *mecA* para expressão da PBP2a naqueles isolados clinicamente resistentes.

## 9 Conclusões

- a) O uso da cefoxitina é o mais indicado para detecção de resistência em *Staphylococcus* spp.;
- b) A cefoxitina leva a uma maior variação da MIC quando comparado à oxacilina em cepas de *Staphylococcus* spp.;
- c) A maioria das cepas apresenta o perfil de heterorresistência;
- d) A exposição aos antibióticos levou a ocorrência da seleção de células resistentes e não de uma indução, como esperado inicialmente;
- e) Este trabalho reforça a importância da detecção do gene *mecA* para prescrição antibiótica na prática clínica.

## Referências

AMATO NETO, V. et al. **Antibióticos na prática médica**, 5 ed, São Paulo: Roca, 2000.

ANAND, K.B. et al. Comparison of cefoxitin disc diffusion test, oxacillin screen agar, and PCR for *mecA* gene for detection of MRSA. **Indian Journal of Medical Microbiology**, Mumbai, v.1, p.27-29, 2009.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil) **Lei nº 9.431 de 6 de janeiro de 1997**. Brasília, DF, 1997. Disponível em:  
<[http://www.anvisa.gov.br/legis/leis/9431\\_97.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/leis/9431_97.htm)> Acesso em: 20 mar.2011.

ARCHER, G.L.; BOSILEVAC, J.M. Signaling antibiotic resistance in *Staphylococci*. **Science**, Washington, v.291, p.1915-1916, 2001.

BANNERMAN, T. M. *Staphylococcus*, *Micrococcus* and other catalase-positive cocci that grow aerobically. **Manual of Clinical Microbiology**, Washington v.1, p.384-404, 2003.

BRAKSTAD, O.G.; MAELAND, J.A. Mechanisms of methicillin resistance in staphylococci. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, Copenhagen, v.105, p.264–276, 1997.

CENTRO DE CONTROLE E PREVENÇÃO DE DOENÇAS (Estados Unidos). Guideline for isolation precautions in hospitals. Evolution of practices. **American Journal of Infection Control**, v.1, n. 24, p. 24-31, 1996.

CHAMBERS, H.F. Penicillin-binding protein-mediated resistance in Pneumococci and Staphylococci. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 179, p. S353-S359, 1999.

CHAMBERS, H. F. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? **Emerging Infectious Disease**, Atlanta, v.7, n.2, p.178-182, 2001.

CHU, V.H.; CROSSLIN, D.R.; FRIEDMAN, J.Y. et al. *Staphylococcus aureus* bacteremia in patients with prosthetic devices: costs and outcomes. **American Journal of Medicine**, Nova York, v. 118, p.1416, 2005.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. (Estados Unidos) **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**. CLSI, Wayne, 2010. (17<sup>th</sup> informational supplement, M100-S17)

COUTO I. et al. Ubiquitous presence of a *mecA* homologue in natural isolates of *Staphylococcus sciuri*. **Microbial Drug Resistance**, Larchmont, v.2, n.4, p.377-391, 1996.

CUIROLO, A., PLATA, K.; ROSATO, A.E. Development of homogeneous expression of resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strains is functionally associated with a  $\beta$ -lactam-mediated SOS response. **Journal of antimicrobial Chemotherapy**, Londres, v. 64, p 37-45, 2009.

DARINI, A.L.; PALAZZO, I.C.V. Cefoxitin does not induce production of penicillin binding Protein 2a in Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, n. 9, p. 4412-4413, 2004.

DZIDIC, S.; BEDEKOVIC, V. Horizontal gene transfer emerging multidrug resistance in hospital bacteria. **Acta Pharmacological Sinica**, v. 24, n. 6, p. 519-526, 2003.

EIFF, C. V.; HEILMANN, C.; PETERS, G. *Staphylococcus epidermidis*: why is it so successful? **Clinical Microbiology and Infection**, Oxford, v. 4, n. 6, p. 297-300, 1998.

ENDER, M.C.; CALLUM, N.; BERGER-BÄCHI, B. Impact of *mecA* promoter mutations on *mecA* expression and beta-lactam resistance levels. **International journal of Medical Microbiology**. Stuttgart, v. 298, no 7, p. 607-617, 2008.

FINAN, J.E. et al. Conversion of oxacillin-Resistant *Staphylococci* from heterotypic to homotypic resistance expression. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. Washington, v. 46, n.1, p. 24-30, 2002.

FREITAS, M.F.L. et al. Staphylococcal toxin genes in strains isolated from cows with subclinical mastitis. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.28, n.12, p.617-621, 2008.

GEORGOPAPADAKOU, N.H. Penicillin-binding proteins and bacterial resistance to  $\beta$ -lactams. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v.37, n.10, p.2945-2053, 1993.

GIANNOULI, S. et al. A. Detection of mutations in the FemXAB protein family in oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* clinical isolates. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Washington, v. 65, n.4, p.626-633, 2010.

GOFFIN, C.; GHUYSEN, J.M. Biochemistry and comparative genomics of SXXX superfamily acyltransferases offer a clue to mycobacterial paradox. **Microbiology Molecular Biology Reviews**, Washington, v.66, p. 702-738, 2002.

GOLDSTEIN, F. et al. Identification and phenotypic characterization of a beta-lactam-dependent, methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strain. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v.51, p.2514–2522, 2007.

HEIKENS, E. et al.. Comparison of genotypic and phenotypic methods for species level identification of clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 43, n. 5, p. 2286-2290, 2005.

HELEN, W.; BOUCHER, G.; COREY, R. Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Clinical Infectious Diseases** , Chicago, v.46, p. 344–39, 2008.

HIRAMATSU, K.; CUI, L., KURODA, M.; ITO, T. The emergence and evolution of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v.9, n.10, p. 486-93, 2001.

HOSOSAKA, Y. et al. Characterization of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus*: a new type of MRSA. **Journal of Infection and Chemotherapy**, Tóquio, v.13, n.2, p.79-86, 2007.

INTERNATIONAL WORKING GROUP ON THE CLASSIFICATION OF STAPHYLOCOCCAL CASSETTE CHROMOSOME ELEMENTS. Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*): Guidelines for Reporting Novel SCC*mec* Elements. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. Washington, v. 53, n 12, p. 4961–4967, 2009.

KAMPF, G. et al. Inducibility and potential role of *mecA*-gene-positive oxacillin-susceptible *Staphylococcus aureus* from colonized healthcare workers as a source for nosocomial infections. **Journal of Hospital Infection**, Londres, v. 54, p.124-129, 2003.

KATAYAMA, Y.; ITO, K.; HIRAMATSU. Genetic organization of the chromosome region surrounding *mecA* in clinical staphylococcal strains: role of IS431-mediated *mecI* deletion in expression of resistance in *mecA*-carrying, low-level methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Londres, v.45, p.1955–1963, 2001.

KATAYAMA, Y.; ZHANG, H.Z.; CHAMBERS, H.F. PBP2a Mutations producing very-high-level resistance to beta-lactams. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v.48, p.453-459, 2004.

KLOOS, W. E.; BANNERMAN, T. L. Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 7, p. 117-140, 1994.

KLEVENS, R.M.; MORRISON, M.A.; NADLE, J. et al. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. **The Journal of the American Medical Association**, v.298, p. 1763–1771, 2007.

KOBAYASHI, N.; TANIGUCHI, K.; URASAWA, S. Analysis of diversity of mutations in the *mecI* gene and *mecA* promoter/operator region of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. Washington. v. 42, n.3, p. 717-720, 1998.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D. JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN, W.C 2008. **Diagnóstico Microbiológico**, 6.ed. Guanabara Koogan, 2008.

LOWY, F. D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Investigation**, Nova York, v.3, p.265-1273, 2003.

MACHEBOEUF, P. et al. A. Penicillin binding proteins: key players in bacterial cell cycle and drug resistance processes. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v.30, p. 673-691, 2006.

MANGUEIRA, E.V.C. **Detecção da proteína PBP2a em amostras de *Staphylococcus spp* utilizando a técnica de Western blot**. Monografia (graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2009.

MOHANASOUNDARAM, K.M.; LALITHA, M.K. Comparison of phenotypic versus genotypic methods in the detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **The Indian Journal of Medical Research**, Nova Deli, v.127, no.1, p.78-84, 2008.

MURAKAMI, K. et al. Identification of methicillin-resistant strains of staphylococcus by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.29,p.2240-2244, 1991.

NAVARRE, W.W.; SCHNEEWIND, O. Surface proteins of gram positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washintgon, v.63, p.174-229, 1999.

NIEMEYER, D. M. et al. Role of *mecA* transcriptional regulation in the phenotypic expression of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.18, n.178, p.5464-5671, 1996.

PEREIRA, S. F. et al. Role of PBP1 in cell division of *Staphylococcus aureus*. **The Journal of Bacteriology**, Washington, v.189, n.9, p. 3525-3531, 2007.

PEREZ-ROTH, E. Multiplex PCR for simultaneous identification of *Staphylococcus aureus* and detection of methicillin and mupirocin resistance. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.39, p.4037-4041, 2001.

PETINAKI, E. et al I. Detection of *mecA*, *mecR1* and *mecI* genes among clinical isolates of methicillin-resistant staphylococci by combined polymerase chain reactions. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.47, n.3, p. 297-304, 2001.

PINHO, M.G.; LENCASTRE, H.; TOMASZ, A. An acquired and a native penicillin-binding protein cooperate in building the cell wall of drug-resistant staphylococcy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.98, p.10.886-10.891, 2001.

REYNOLDS, P.E., BROWN, D.F.J. Penicillin-binding proteins of  $\beta$ -lactam-resistance strains of *Staphylococcus aureus*. Effect of growth conditions. **FEBS**, v.192 p.2832, 1985.

RIBEIRO, A. et al. First report of infection with community acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in South America. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 43, p. 1985-1988, 2005.

ROSSI, F., ANDREAZZI, D. **Resistência Bacteriana. Interpretando o antibiograma**. 1. ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

SADER, H.S. et al. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY antimicrobial surveillance program. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**. Salvador, v.5, p.200-214, 2001.

SANDERS, C. C.; SANDERS, W. E. Type I beta-lactamases of gram-negative bacteria: Interactions with beta-lactam antibiotics. **Journal of infectious diseases**. Chicago, v.5, p. 792-800, 1986.

SCHEFFERS, D.J.; PINHO, M.G. Bacterial cell wall synthesis: new insights from localization studies. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v.69, n.4, p.585-607, 2005.

SEFTON, A.M. Mechanisms of antimicrobial resistant: their clinical relevance en the new millennium. **Drugs**, Nova York, v.62, p.557-566, 2002.

SKOV, R.. et al. Phenotypic detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* by disk difusion testing and etest on Mueller-Hinton agar. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 44, p. 4395-99, 2006.

STAPLETON, P.D.; TAYLOR, P.W. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: mechanisms and modulation. **Scientific Program Committee**, v.85, p.57-72, 2002.

STRUELENS, M. J. The epidemiology of antimicrobial resistant in hospital acquired infections: problems and possible solutions. **British Medical Journal**, v.317, p.652-654, 1998.

SWENSON, J.M. et al. Detection of *mecA*-mediated resistance using reference and commercial testing methods in a collection of *Staphylococcus aureus* expressing borderline oxacillin MICs. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, Nova York, v.9, p.33-58, 2007.

TAIWO, S.S. Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*: A Review of the molecular epidemiology, Clinical significance and laboratory detection methods. **West African Journal of Medicine**. Lagos, v. 28, No.5, p. 281-290, 2009.

TENOVER, F. C. Development and spread of bacterial resistance to antimicrobial agents: on overview. **Cinical Infectious Disease**, Oxford, v.33, n.5, p.108-115, 2001.

TERASAWA, L.B. **Caracterização da resistência à oxacilina em estafilococos coagulase negativa isolados no hospital de clínicas de Curitiba – Paraná.**(Dissertação) Pós Graduação em Microbiologia. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

UNAL, S. et al. Comparison of tests for detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in a clinical microbiology labortory. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washigton, v.38, p. 345-347, 1994.

VELASCO, D. *et al.* Evaluation of different methods for detecting methicillin (oxacillin) resistance in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Londres, v. 55, p. 379-82, 2005.

ZHANG, H.Z. et al. A proteolytic transmembrane signaling pathway and resistance to  $\beta$ -lactams in *Staphylococci*. **Science**, Washington, v.291, p.1962-1965, 2001.

## ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética



## COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA/CEP

Recife, 24 de setembro de 2002

Sra. Pesquisadora  
Profa. Marinalda Anselmo Vilela

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa do HUOC analisou, nesta data, o protocolo de estudo – no.17.7.0052, intitulado *Infeção Hospitalar*- e considerou-o APROVADO, de acordo com a Resolução 196/96, do Conselho Nacional de Saúde. Recomenda seja-lhe enviado relatório no fim do projeto (ou relatório parcial, caso a pesquisa seja interrompida).

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
Prof. Wilson de Oliveira Jr.  
Coordenador