

ANÁLISE MOLECULAR ASSOCIADA AO ESTUDO DOS GENES DE  
RESISTÊNCIA EM *Staphylococcus aureus* RESISTENTES À  
METICILINA

NEIDE HIROMI TOKUMARU MIYAZAKI

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

Orientadora: Dra. Maria Helena Simões Villas Bôas

Rio de Janeiro  
2006

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Análise molecular associada ao estudo dos genes de resistência em *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina

Neide Hiromi Tokumaru Miyazaki

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.

Aprovada:

\_\_\_\_\_ (Doutora em Ciências - Microbiologia)  
Dra. Cleide Aparecida Ferreira de Rezende

\_\_\_\_\_ (Doutora em Ciências - Microbiologia)  
Dra. Prescilla Emy Nagao Ferreira

\_\_\_\_\_ (Doutora em Ciências - Microbiologia)  
Dra. Maria Helena Simões Villas Bôas

Orientadora: Dra. Maria Helena Simões Villas Bôas

Rio de Janeiro  
2006

## FICHA CATALOGRÁFICA

Miyazaki, Neide Hiromi Tokumaru

Análise molecular associada ao estudo dos genes de resistência em *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina./ Neide Hiromi Tokumaru Miyazaki. Rio de Janeiro: INCQS/ FIOCRUZ, 2006

xv, 78 p., il., tab.

Tese em Vigilância Sanitária, Prog. Pós-graduação em Vigilância Sanitária/ INCQS, 2006. Orientadora: Maria Helena Simões Villas Boas.

1. MRSA. 2. resistência. 3. antimicrobianos. 4. desinfetantes. 5. gene *qacA/B*. I. Título

Molecular analysis associated with resistance genes in methicillin-resistance *Staphylococcus aureus*

## AGRADECIMENTOS

À Maria Helena, não somente por ter sido minha orientadora colaborando efetivamente para o desenvolvimento desta tese, mas também pela grande amizade.

À Alessandra, Cátia Cristina e Clarisse pela amizade, dedicação e contribuição na realização desta tese.

Às amigas Cleide e Prescilla, pelo incentivo e colaboração durante o desenvolvimento e conclusão desta tese.

Ao Victor pela colaboração durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Pedro Jun pelo carinho, incentivo e paciência.

À Yumi e à Cristal pelo divertimento, carinho e contribuição em diminuir o estresse.

À Simone e à Gisele pelo apoio na CPG/ INCQS, e principalmente por terem se tornado minhas amigas.

Ao Pedro Igor, sempre solícito no atendimento na CPG/ INCQS.

Ao Dr. André Gemal, diretor do INCQS, pelo apoio na realização desta tese.

À Marise, chefe do Departamento de Microbiologia na época da realização deste trabalho, pela confiança e apoio constante.

Àqueles Setores do Departamento de Microbiologia que de alguma forma contribuíram para que fosse possível concluir esta tese.

À Cléia, à Vera e ao João por terem selecionado os isolados clínicos nos hospitais em que trabalham para serem utilizados nesta tese.

À Biblioteca/ INCQS pela presteza às solicitações.

**Ao  
Pedro Jun**

## RESUMO

*Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA) é um dos principais agentes de infecção humana e constitui um grave problema de saúde pública em todo o mundo. A expressão de resistência heterogênea desses microrganismos é um fator limitante dos métodos de caracterização fenotípica. O sistema automatizado Vitek, um dos métodos fenotípicos utilizados, resultou num erro de 4,05% identificando como *Staphylococcus aureus* suscetíveis a meticilina (MSSA). Esses isolados assim como os 95,95% caracterizados como MRSA apresentaram o gene *mecA* pela técnica de PCR, cuja caracterização é considerada padrão ouro na detecção de MRSA. Observou-se também que 84,48% eram multi-resistentes e 13,51% eram MRSA multi-suscetíveis aos antimicrobianos. Outro método fenotípico utilizado foi o da triagem em ágar contendo 25 mg/L de meticilina, através do qual verificou-se que não ocorreu crescimento de 100% dos isolados de MRSA nesse meio de cultura, diferentemente dos dados obtidos por outros pesquisadores. A eletroforese de pulsos elétricos alternados (PFGE) forneceu 11 diferentes perfis clonais com predominância do clone A, correspondente ao clone epidêmico brasileiro verificado há 10 anos e que ainda está presente nos hospitais do Rio de Janeiro. Biocidas (desinfetantes/ anti-sépticos) a base de compostos quaternários de amônio são freqüentemente utilizados em Instituições de Saúde com o intuito de auxiliar na prevenção das infecções nosocomiais, porém tem sido discutido que o amplo uso desses produtos poderia levar a emergência de microrganismos resistentes aos desinfetantes/ anti-sépticos através da aquisição do gene *qacA/B*. Esse gene foi detectado em 79,73% dos isolados e está amplamente disseminado nos 3 hospitais estudados. Trata-se de um resultado relevante, pois é a primeira vez que o gene *qacA/B* está sendo descrito em MRSA no Brasil. Os três representantes dos dois perfis clonais mais presentes e o de MRSA multi-suscetíveis aos antimicrobianos foram destruídos pelo desinfetante nas concentrações de 1600 e 2000 ppm de cloreto de benzalcônio, o que correspondem respectivamente a 1600 e 2000 vezes maior que a CIM. Entretanto, a presença do gene de resistência aos compostos quaternários de amônio pode significar que esses microrganismos possuem um grande potencial para a sobreviver no ambiente hospitalar. Além disso, existe ainda o risco da co-resistência e da resistência cruzada entre os biocidas a base de quaternários de amônio e os medicamentos antimicrobianos.

## ABSTRACT

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is one of the most important pathogens, and it has become a serious public health worldwide. The right detection of these microorganisms is complex by the fact that expression of the resistance is variable and, normally, heterogeneous within strains. By Vitek automated system, one of the phenotypic methods tested, 95.95% were identified as MRSA and 4.05% were misidentified as methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA). PCR reaction to detect *mecA* gene is considered as gold standard and that gene was presented in 100% of isolates. Data show that 84.48% were multi-resistant MRSA and 13.51% multi-susceptible MRSA. The methicillin 25 mg/L agar screen was the other phenotypic method used and it did not allow the growth of all classes of isolates as observed by others authors. By pulsed field gel electrophoreses (PFGE) was observed the predominance of pattern A, the same epidemic Brazilian clone described 10 years ago that is the same found in Rio de Janeiro hospitals to this time. The distribution of *qacA/B* gene, which is the determinant of resistance to quaternary ammonium compounds largely employed in hospital disinfection was examined. Some authors think the wide use of that product lead to the emergence of biocide resistance. By polymerase chain reaction (PCR) *qacA/B* gene was found in 79.73% of the isolates, which is a significant result considering it is the first time that *qacA/B* gene is being reported for Brazilian MRSA strains and it is presented at a high rate. The concentration of 1600 and 2000 ppm of quaternary ammonium, corresponding to the 1600 and 2000 folds MIC value, were used to perform the bactericidal assay and all of these isolates were killed. The presence of disinfectant/antiseptic resistance in *S. aureus* is of particular significance in terms of the potential of this organism for survival in the hospital environment, which might cause a great impact on human health, since concerns have arisen regarding the potential emergence of co-resistance and cross-resistance between widely used disinfectants and antibiotics.

## LISTA DE SIGLAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOAC – Association of Official Analytical Chemists

ATCC – American Type Culture Collection

*attBSCC* – bacterial chromosomal attachment site

CHEF DR III – Contour-clamped homogeneous electric field

C – confluenta

CA – Califórnia

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CL 1 – Caldo Lethen correspondente ao tubo nº 1

CL 1R – Caldo Lethen correspondente ao tubo nº 1 da re-subcultura (ou 2ª subcultura)

DNA – Desoxi Ribonucleic Acid (ácido desoxirribonucléico)

DISAD – Divisão de Saneantes Domissanitários

dNTP – di-Nucleosídeos Tri-Fosfatados

EDTA – Ethylene Diamine Tetra Acetic acid (ácido etileno diamino tetra acético)

EUA – Estados Unidos da América

GPS – Gram Positive Susceptibility card (cartão contendo antimicrobianos para Gram positivos, utilizado no equipamento Vitek)

GR-MRSA – Gentamycin resistant Methicillin *Staphylococcus aureus* (*Staphylococcus aureus* resistente a metilina, resistente a gentamicina)

GS-MRSA – Gentamycin susceptible Methicillin *Staphylococcus aureus* (*Staphylococcus aureus* resistente a metilina, suscetível a gentamicina)

I – Intermediariamente resistente

INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

KCl – Cloreto de potássio

LACEN – Laboratório Central de Saúde

MgCl<sub>2</sub> – Cloreto de magnésio

## LISTA DE SIGLAS

MRSA – Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (*Staphylococcus aureus* resistente a metilina)

MSSA – Methicillin susceptible *Staphylococcus aureus* (*Staphylococcus aureus* suscetível a metilina)

Met 25 – Metilina a 25 µg/ mL

MFS – Major facilitator superfamily (principal superfamília facilitadora )

mL – mililitro

µg – micrograma

N – Negativo

NaCl – Cloreto de sódio

NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards

NNIS – National Nosocomial Infections Surveillance System

nM – nano Mol

ORF – Open Reading Frame

P – Positivo

PCR – Polymerase Chain Reaction (reação em cadeia da polimerase)

PFGE – Pulsed Field Gel Electrophoreses (eletroforese em campos elétricos alternados)

PLP – Proteína de Ligação a Penicilina

pmol – picomol

POP – Procedimento Operacional Padronizado

ppm – partes por milhão

R – Resistente

RAPD – Random Amplification of Polymorphic DNA (polimorfismo de DNA de amplificação randômica)

RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism

RNase – Ribonuclease A (enzima de digestão)

RJ – Rio de Janeiro

rpm – rotações por minuto

S – Sensível

## LISTA DE SIGLAS

*Sccmec* – Staphylococcal cassette chromossome *mec* gene (cassete cromossomal *mec* estafilocócico)

SCoN – Staphylococcus coagulase negativa

SUS – Sistema Único de Saúde

TSA – Tryptic Soy Agar

*Taq* – enzima polimerase termoestável obtida da bactéria *Thermus aquaticus*

TBE – tampão Tris borato EDTA

TSB – Tryptic Soy Broth

U – Unidades

UFC – Unidade Formadora de Colônia

VISA – Vigilância Sanitária

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Síntese esquematizada da parede celular em <i>S. aureus</i> .....	2
FIGURA 2. Resistência a penicilina devido a hidrólise do anel $\beta$ -lactâmico pela enzima $\beta$ -lactamase.....	3
FIGURA 3. Diagrama esquemático da síntese da parede celular em MRSA na presença de $\beta$ -lactâmicos semi-sintéticos.....	5
FIGURA 4. SCCmec tipos I – V observados em estafilococos.....	7
FIGURA 5. Fatores que afetam a biossíntese da parede celular em MRSA .....	10
FIGURA 6. Perfil de Análise Populacional (PAP) de MRSA .....	12
FIGURA 7. Esquema do Método da Diluição de Uso .....	30
FIGURA 8. Perfil de resistência aos antibióticos de MRSA, exibindo a percentagem de resistência aos diversos antimicrobianos testados em relação a cada hospital.....	43
FIGURA 9. Percentagem de suscetibilidade aos antimicrobianos dos 10 isolados de MRSA multi-suscetíveis dos três hospitais do Rio de Janeiro.....	44
FIGURA 10. PCR exibindo o produto da amplificação do gene <i>mecA</i> .....	45
FIGURA 11. PCR exibindo o produto de amplificação do gene <i>qacA/B</i> .....	46
FIGURA 12. Dendrograma das 74 amostras de MRSA.....	47
FIGURA 13. Dendrograma dos Novos MRSA multi-suscetíveis aos antibióticos não $\beta$ -lactâmicos.....	49
FIGURA 14. Perfil de fragmentação do DNA dos representantes de cada clone de MRSA obtido através de eletroforese de campos elétricos alternados, após a digestão com a enzima <i>SmaI</i> .....	50
FIGURA 15. Perfil de fragmentação do DNA dos representantes de cada clone de MRSA obtido através de eletroforese de campos elétricos alternados, após a digestão com a enzima <i>SmaI</i> .....	51

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Sequências dos oligonucleotídeos (primes) usados para as amplificações dos genes <i>mecA</i> and <i>qacA/B</i> .....	36
TABELA 2. Suscetibilidade dos isolados do Hospital RJ-A.....	37
TABELA 3. Suscetibilidade dos isolados do Hospital RJ-B.....	38
TABELA 4. Suscetibilidade dos isolados do Hospital RJ-C.....	39
TABELA 5. Perfil de resistência de MRSA aos antimicrobianos exibindo o total de isolados resistentes.....	40
TABELA 6. Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos dos 10 isolados de MRSA multi-suscetíveis aos antibióticos não $\beta$ -lactâmicos.....	41
TABELA 7. Resultados dos testes Met25 e pesquisa dos genes <i>mecA</i> e <i>qacA/B</i> .....	42

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS GERAIS.....	22
3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.1. Amostras bacterianas.....	23
4.2. Desinfetante.....	23
4.3. Isolamento.....	23
4.4. Preparação do estoque dos isolados de MRSA.....	23
4.5. Identificação bacteriana.....	24
4.6. Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos.....	24
4.7. Teste para triagem preliminar aos antimicrobianos em ágar contendo meticilina (Met 25).....	24
4.8. Reação em cadeia da polimerase – PCR.....	24
4.8.1. Preparação do DNA bacteriano .....	24
4.8.2. Verificação da presença dos genes <i>mecA</i> , <i>qacA/B</i> e <i>smr</i> .....	25
4.9. Seqüenciamento e análise.....	25
4.10. Eletroforese de pulsos elétricos alternados (Pulsed Field Gel Electrophoresis - PFGE).....	26
4.10.1. Preparação do DNA.....	26
4.10.2. Digestão do DNA e eletroforese de campos elétricos alternados (PFGE).....	26
4.10.3. Análise do perfil de fragmentação do PFGE.....	27
4.11. Verificação da qualidade do desinfetante .....	27
4.12. Suscetibilidade ao desinfetante.....	27
4.13. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do desinfetante.....	28
5. RESULTADOS.....	31
5.1. Identificação bacteriana.....	31
5.2. Teste de suscetibilidade aos antibióticos.....	31
5.3. Teste para triagem preliminar aos antimicrobianos em ágar contendo meticilina (Met 25).....	32
5.4. Reação em cadeia da polimerase.....	33

## SUMÁRIO

5.5. Seqüenciamento e análise.....	33
5.6. Eletroforese de pulsos elétricos alternados (PFGE).....	33
5.7. Verificação da qualidade do desinfetante.....	34
5.8. Suscetibilidade ao desinfetante .....	34
5.9. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do desinfetante.....	35
6. DISCUSSÃO.....	52
7. CONCLUSÕES.....	62
8. REFERÊNCIAS.....	64
9. ANEXO 1.....	78

## 1. INTRODUÇÃO

A ocorrência das infecções hospitalares (IH) foi observada desde meados do século XIX, tornando-se acentuada a partir da década de 50, a qual foi marcada pela incidência freqüente de casos de infecções por *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (LA FORCE, 1993).

A infecção hospitalar é definida como aquela a qual não há qualquer evidência de que a infecção estivesse presente ou incubada na época da admissão do paciente no hospital. Para ser classificada como infecção, deve ser manifestada como doença clínica, e não como colonização que significa que os microrganismos estão presentes, mas não causam efeito adverso ao hospedeiro. No entanto, um paciente assintomático pode ser considerado infectado se microrganismos patogênicos são encontrados em fluidos corpóreos ou sítios normalmente estéreis como fluido cérebro-espinhal ou sangue (EMORI & GAYNES, 1993).

*S. aureus* é um microrganismo Gram-positivo, coagulase e catalase positivos, que fermenta o manitol e a trealose. É um patógeno classicamente conhecido por causar doenças que variam desde infecções cutâneas e sub-cutâneas como furunculose, foliculite, celulite, mastite e impetigo até infecções mais graves como osteomielite, endocardite, meningite, miocardite, septicemia e síndrome da pele escaldada. Está também comumente relacionado a infecções de feridas pós-operatórias, infecções por uso de cateteres, síndrome do choque tóxico (TSS) e intoxicação alimentar (LIVERMORE, 2000; NOVICK, 2001; SALMENLINNA, 2002).

A parede celular de *S. aureus* é constituída de uma porção peptídica composta de aminoácidos conectados por ligações peptídicas, e uma porção glicana que está disposta em camadas e que forma a estrutura principal da molécula. A porção glicana possui unidades alternadamente repetidas das aminoglicanas N-acetil glicosamina e ácido N-acetil murâmico unidas umas as outras através de ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4. Ligado ao ácido N-acetil murâmico encontra-se uma cadeia de tetrapeptídeos contendo L-alanina, D-glutamina, L-lisina e D-alanina e essas cadeias se interligam transversalmente através de pontes peptídicas entre o grupo carboxil do aminoácido de um tetrapeptídeo, localizado na camada de uma glicana, ao grupo amino do aminoácido do tetrapeptídeo da camada de outra glicana (FIGURA 1).

Assim, as várias camadas da glicana vão sendo unidas e no caso do *S. aureus* estão envolvidas 4 transpeptidases para catalizar as ligações transversas na construção da parede celular. Essas proteínas são alvos para a ação dos antimicrobianos do grupo da penicilina e por isso recebem o nome de proteínas de ligação a penicilina (PLPs 1, 2, 3 e 4) (LESKI & TOMASZ, 2005).

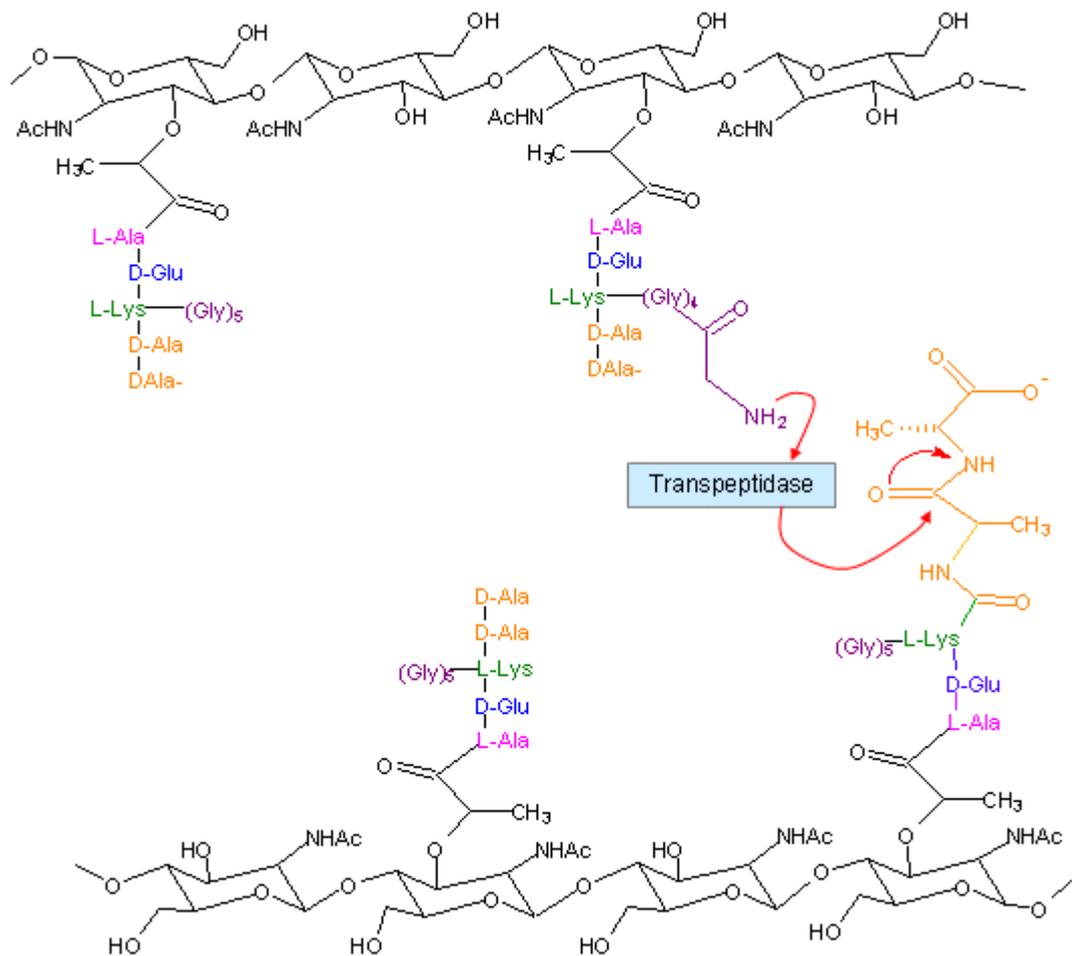


FIGURA 1. Síntese esquematizada da parede celular em *S. aureus*. Disponível no endereço eletrônico: <http://www.omedon.co.uk/vrsa/pg/>

Os antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos produzem o efeito bactericida através da ligação covalente do antimicrobiano a uma ou mais PLPs que são as enzimas alvo. A interação dos  $\beta$ -lactâmicos com as PLPs ocorre sobre a superfície externa da membrana citoplasmática inibindo a sua função de transpeptidase, impedindo a ligação com o seu substrato D-alanil-D-alanina, não permitindo assim a formação da ligação transversa da peptidoglicana (ATLAS, 1997; BERGER-BACHI, 1999).

A introdução do uso clínico da penicilina ocorreu no início da década de 40, levando ao tratamento eficaz de pacientes com severas infecções estafilocócicas (NORTH & CHRISTIE, 1946).

Em 1944, época do início da utilização de antimicrobianos, quando a penicilina foi introduzida para o tratamento das doenças infecciosas mais de 94% dos *S. aureus* isolados eram suscetíveis; em 1948 mais de 50% apresentavam-se resistentes devido a produção de  $\beta$ -lactamases (penicilinases), o que foi demonstrado nos estudos realizados em Londres no final da década de 40. Antes de 1944, data da introdução da penicilina na clínica, alguns isolados já produziam  $\beta$ -lactamases e as razões pelas quais ocorria a produção dessas enzimas permanecem ainda sob especulação. No entanto, o fato de ter sido observado o aumento do número de isolados produtores de  $\beta$ -lactamases subseqüentemente a introdução da penicilina é facilmente compreendido e pensa-se que foi devido ao uso intenso e inapropriado do antimicrobiano (LIVERMORE, 2000).

As  $\beta$ -lactamases são enzimas extracelulares normalmente de natureza plasmidial, embora já tenha sido descrito que alguns isolados parecem apresentar resistência de origem cromossomal (AL-MASAUD, 1991). São enzimas que hidrolisam o anel  $\beta$ -lactâmico produzindo o ácido penicilóico inativando assim o antimicrobiano, conforme o esquema da FIGURA 2. (LIVERMORE, 2000).

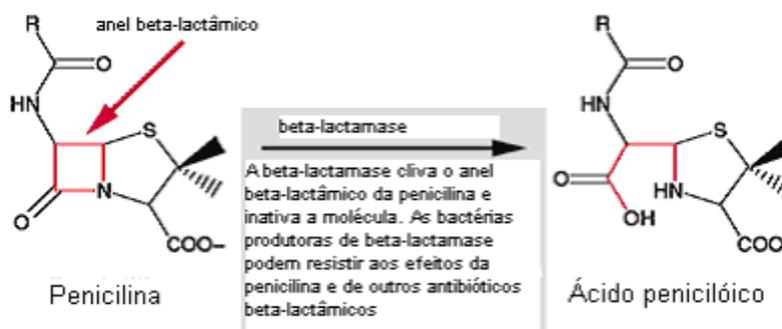


FIGURA 2. Resistência à penicilina devido a hidrólise do anel  $\beta$ -lactâmico pela enzima  $\beta$ -lactamase.

Adaptado do esquema disponível no endereço eletrônico:

[http://www.wiley.com/college/pratt/0471393878/student/activities/bacterial\\_drug\\_resistance/beta\\_lactamase\\_rxn.gif](http://www.wiley.com/college/pratt/0471393878/student/activities/bacterial_drug_resistance/beta_lactamase_rxn.gif)

O aparecimento dessa resistência levou a utilização de outras drogas, como estreptomicina, tetraciclina, cloranfenicol, entre outros. Com o advento do tratamento

das doenças infecciosas através do uso de vários antimicrobianos começaram a surgir isolados de *S. aureus* que se apresentavam multi-resistentes e eram responsáveis pelos casos de infecções hospitalares (BULGER & SHERRIS, 1968; VAN WAMEL et al., 1995).

O estudo de antimicrobianos que fossem estáveis à ação das  $\beta$ -lactamases estafilocócicas levou ao desenvolvimento das penicilinas semi-sintéticas como a meticilina, nafcilina e oxacilina, as quais foram introduzidas em 1960 para o tratamento das infecções por *S. aureus* multi-resistentes. Esses antimicrobianos contêm grupos acil que estericamente impedem o ataque do anel  $\beta$ -lactâmico pelas  $\beta$ -lactamases (AL-MASAUD, 1991; LIVERMORE, 2000; SALMENLINNA, 2002). Porém, em 1961, no Reino Unido, foi descrita pela primeira vez o aparecimento de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA) apresentando múltipla resistência aos antimicrobianos. Além das PLPs 1, 2, 3 e 4 os MRSA possuem uma PLP adicional, a PLP 2' ou PLP 2a de 78 kDa e que apresenta baixa afinidade pelos antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos, o que conseqüentemente confere resistência a todos os  $\beta$ -lactâmicos (FIGURA 3) (ROSSI et al., 1985; LYON & SKURRAY, 1987; DE JONGE et al., 1992).

A PLP 2, em *Staphylococcus*, é a única proteína de ligação a penicilina bifuncional, ou seja, além da atividade transpeptidase como as outras PLPs, possui também atividade de transglicosilase (LESKI & TOMASZ, 2005). Pinho et al. (2001) observaram que a inativação do domínio transglicosilase da proteína PLP 2 de MRSA evita a expressão da resistência aos antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos apesar da presença da proteína PLP 2a. Os autores sugeriram a ocorrência de uma ação conjunta de pelo menos duas proteínas na síntese da parede celular desses microrganismos: a PLP 2 através do domínio transglicosilase, e a PLP 2a provavelmente "emprestando" a sua característica de baixa afinidade pelos  $\beta$ -lactâmicos através da atividade transpeptidase, que mesmo de forma deficiente, realiza as ligações transversas da peptidoglicana em MRSA na presença desses antimicrobianos.

Segundo Pinho et al. (2001) a atividade transglicosilase é essencial para a expressão da resistência à meticilina e a explicação para tal afirmação baseia-se no fato de que mutantes transglicosilase negativos têm quantidade de fragmentos curtos de unidades dissacarídicas aumentada. Os autores sugeriram que as

bactérias somente sobreviveriam na presença de antimicrobianos do grupo dos  $\beta$ -lactâmicos se a PLP 2 sintetizasse unidades de glicanas longas o suficiente para compensar a diminuição da transpeptidação da parede celular realizada pela PLP 2a.

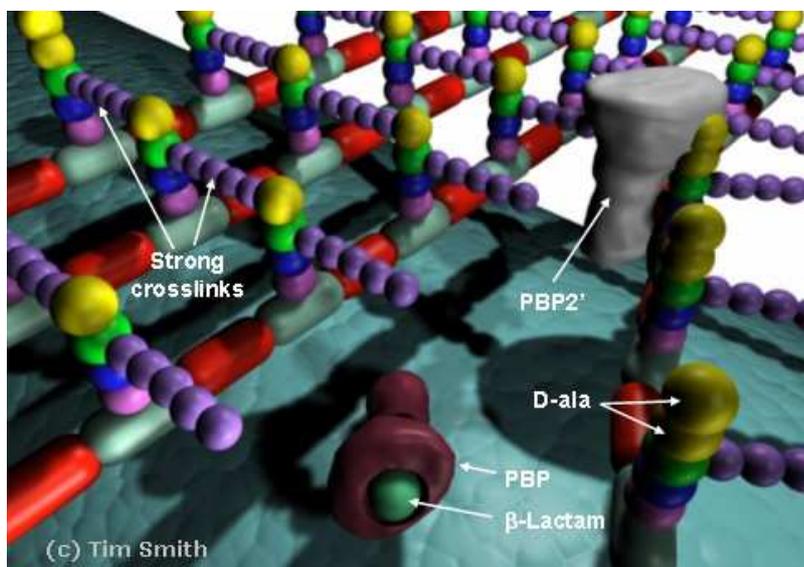


FIGURA 3. Diagrama esquemático da síntese da parede celular em *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, na presença de antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos. Strong crosslinks – ligações transversas firmes; PBP – proteína de ligação a penicilina; PBP2' – proteína de ligação a penicilina 2';  $\beta$ -lactam -  $\beta$ lactâmico; D-ala – D-alanina. Disponível no endereço: <http://www.omedon.co.uk/vrsa/pg/>

A PLP 2a é codificada pelo gene *mecA* que está localizado em um grande segmento de DNA inserido ao DNA cromossomal e conhecido como região *mec*, gene *mec*, ou atualmente denominada cassete cromossomal *mec* estafilocócico (*Staphylococcal Cassete Chromosome mec* – SCC*mec*) e que não está presente em MSSA (LIVEMORE, 2000; HIRAMATSU et al., 2001).

O SCC*mec* além de carrear o complexo do gene *mecA* – constituído pelo gene *mecA*, os genes regulatórios *mecRI* (sensor) e o *mecI* (repressor) – que confere resistência à meticilina, é também um sítio preferencial (“hot spot”) de inserção de outros elementos genéticos acessórios incluindo plasmídios, transposons e elementos IS que podem carrear também os genes de resistência aos antimicrobianos não  $\beta$ -lactâmicos originando um grande fragmento de DNA, cujo tamanho varia entre 21 e 67 kb, e pelo fato de conter uma variedade de tais genes pode ser considerado como uma ilha de resistência aos antimicrobianos (ITO, KATAYAMA & HIRAMATSU, 1999; KATAYAMA, ITO & HIRAMATSU, 2000;

HIRAMATSU et al., 2001; KIKUCHI, 2003). A razão pela qual ocorre esse acúmulo de elementos de resistência nessa região é ainda desconhecida (NOVICK, SCHLIEVERT & RUZIN, 2001).

A integração do *SCCmec* é seqüência-específica, isto é, ocorre em um único sítio denominado sítio de ligação ao cromossoma bacteriano (*bacterial chromosomal attachment site – attBSCC*) localizado próximo da origem de replicação e dos genes *spa* e *purA*. A seqüência *attBSCC* encontra-se na posição *downstream* de uma região de leitura aberta (*open reading frame – orf*) de função desconhecida designada *orfX*, a qual é bem conservada entre os isolados clínicos de *S. aureus* e está presente tanto em cepas resistentes quanto em cepas suscetíveis à meticilina. Trata-se de um elemento genético móvel diferenciado já que não contém genes relacionados ao fago e nenhuma transposase específica. (HANSSEN & SOLLID, 2006).

Para se movimentar, o *SCCmec* carrega dois genes específicos designados cassete cromossomal recombinase A e B (*ccrA* e *ccrB*). Essas recombinases determinam a orientação sítio-específica para a integração do *SCCmec* no cromossoma além de estarem envolvidas na excisão precisa desse fragmento do cromossoma (HIRAMATSU et al, 2001).

A inserção do *SCCmec* está esquematizada na FIGURA 4. As combinações dos complexos dos genes *ccr* e *mec* determinam os 5 tipos de *SCCmec* estruturalmente diferentes, conhecidos até o momento, designados *SCCmec* I, II, III, IV e V que conferem diferentes fenótipos de resistência aos vários antimicrobianos (HANSSEN & SOLLID, 2006).

Os *SCCmec* tipos I, IV e V não contêm genes de resistência a quaisquer antimicrobianos com exceção do *mecA*, porém o *SCCmec* tipo IVc carrega o *Tn4001* que codifica uma proteína bifuncional – proteína Aac/Aph – que confere resistência à maioria dos aminoglicosídeos. Os *SCCmec* tipos IV e V contêm o gene *mecA*, são menores e foram encontrados nos MRSA isolados da comunidade (HANSSEN & SOLLID, 2006).

O *SCCmec* tipo I estava disseminado entre as cepas de MRSA isoladas no início da década de 60 e não contém outros genes de resistência a não ser o *mecA*. Os tipos II e III eram carregados pelas cepas predominantes em 1980 e continham genes de resistência para múltiplos antimicrobianos (HIRAMATSU et al., 2001; KIKUCHI, 2003).

O SCCmec tipo II carrega o *Tn554* que codifica a resistência à eritromicina e espectromicina. O pUB110 é ladeado por um par de elementos IS431 e codifica a resistência à kanamicina e tobramicina. O SCCmec tipo III além do *Tn554* e do pUB110, contém o pseudo *Tn554* ( $\Psi$ *Tn554*) codificando resistência ao cádmio, o pT181 que codifica a resistência à tetraciclina e o IS258 que confere resistência ao mercúrio (HANSSEN & SOLLID, 2006).

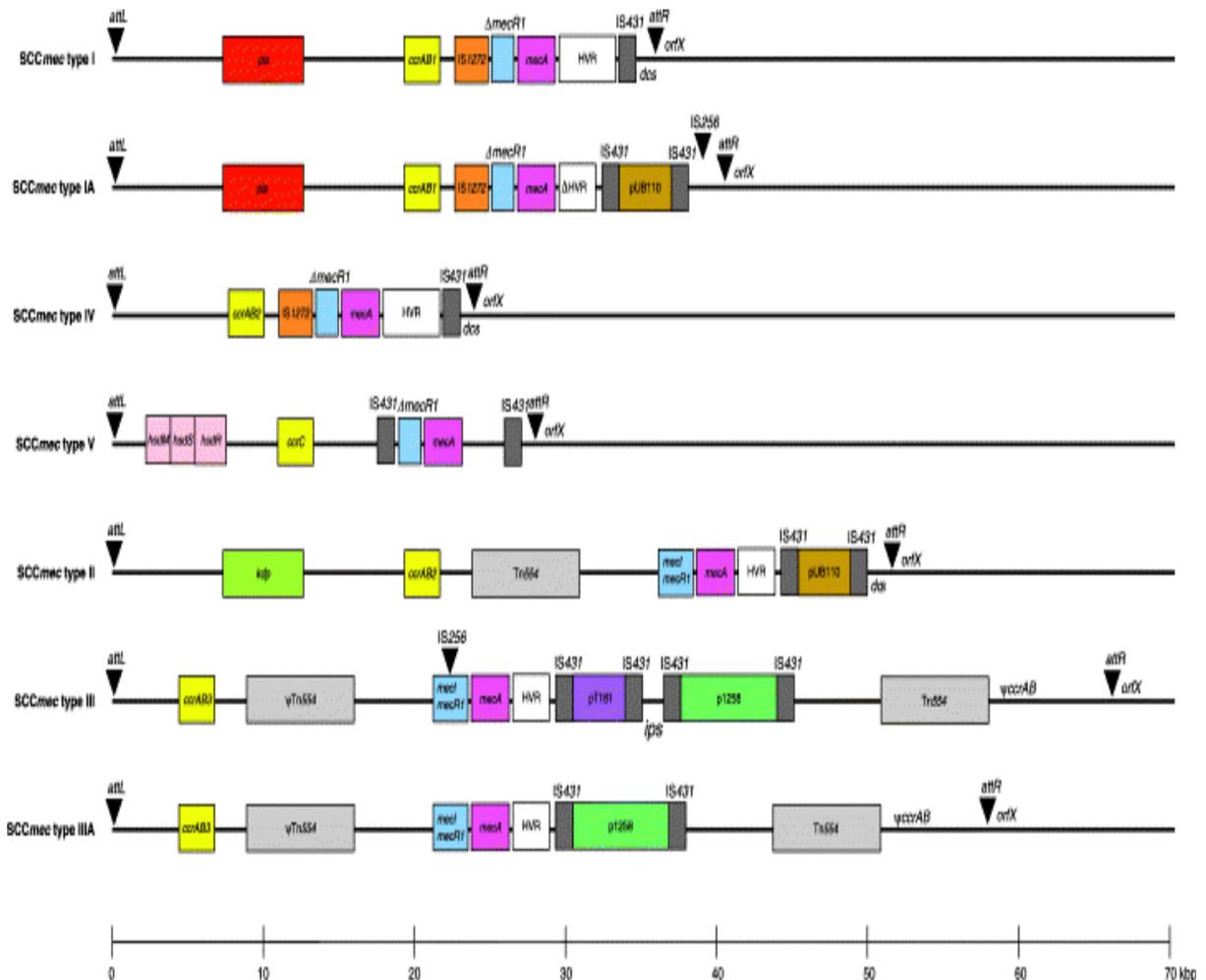


FIGURA 4. SCCmec tipos I – V observados em estafilococos.

*pls*, proteína de superfície plasmínica; *kdp*, operon envolvido no transporte ATP-dependente de potássio através da membrana celular bacteriana. HVR, região hipervariável; *dcs*, downstream – sequência constante e conservada da região em SCCmec tipos I, II and IV entre IS431 e *orfX*; *ips*, região entre IS431 a direita do pT181 e à esquerda do p1258 em SCCmec III.

Disponível no endereço eletrônico: <http://www.blackwell-synergy.com/doi/full/10.1111/j.1574-695X.2005.00009.x>

A origem do SCCmec não está ainda elucidada. Sabe-se, entretanto, que esses elementos estão amplamente disseminados em estafilococos, inclusive em *S.*

*aureus* e até o momento não foi descrita a presença desse inserto em nenhuma outra cepa de outros gêneros bacterianos (HIRAMATSU et al., 2001).

Segundo Crisóstomo (2001), o SCC $mec$  em MRSA originou de espécie desconhecida, não estafilocócica e existem duas hipóteses para explicar a evolução dessas cepas (FITZGERALD et al., 2001). A hipótese postulada por Musser & Kapur (1992) defende que ocorreu a associação do gene *mec* com linhagens de *S. aureus* geneticamente diferentes. Essa hipótese se baseou em dados que indicam que o gene *mec* foi horizontalmente transferido em laboratório, levando os pesquisadores a acreditar que as cepas de MRSA evoluíram através de várias transferências laterais independentes do elemento *mec* para linhagens filogeneticamente distintas suscetíveis à meticilina. Em contrapartida, dados obtidos por Kreiswith et al. (1993), através de análise de RFLP (restriction fragment length polymorphism) com sondas para *mecA* e *Tn 554* demonstraram que os MRSA evoluíram a partir de um clone suscetível que adquiriu o elemento *mec* e subsequentemente gerou uma substancial diversidade cromossomal.

Segundo Fitzgerald et al. (2001) a transferência lateral de genes teve um papel fundamental na evolução dos *S. aureus*. O gene *mec* foi transferido horizontalmente para diferentes cromossomos de *S. aureus* pelo menos cinco vezes, e através de análise de *DNA microarray*, verificou que as cepas resistentes à meticilina originaram em períodos independentes e não a partir de uma única cepa ancestral.

É importante também observar que os estudos realizados por Crisóstomo et al. (2001) mostraram que o perfil genético e fenotípico de MSSA e MRSA isolados na Dinamarca e no Reino Unido, no início dos anos 60 apresentavam-se semelhantes, o que levou os autores a sugerir que aqueles MSSA representavam a geração de uma cepa que serviu como um dos primeiros *S. aureus* receptores do determinante de resistência à meticilina na Europa.

Hiramatsu et al. (2001), pelo método da ribotipagem, identificaram pelo menos 5 tipos clonais distintos entre as cepas de MRSA de todo o mundo.

Mongkdrattanothai et al. (2004) sugeriram que cepas resistentes de *Staphylococcus coagulase negativa* (CoNS) podem servir como reservatórios para os genes de resistência aos antimicrobianos. Esses genes podem ser transferidos para outros organismos Gram-positivos, incluindo as cepas de *S. aureus* (HANSSEN & SOLLID, 2006).

A hipótese da transferência do SCC*mec* entre CoNS e *S. aureus* tem sido mantida por evidências tais como a homologia de 98-99% do SCC*mec* tipo IV em *Staphylococcus epidermidis* e o SCC*mec* tipo IVa em *S. aureus*. No restante do genoma de *S. epidermidis* somente 17% dos ORFs apresentam aproximadamente 80% de identidade com o *S. aureus*, porém mesmo essa relação de 17% pode significar que ocorreu a troca de DNA inter-espécies (HANSSEN & SOLLID, 2006).

Outra linha de evidência está relacionada com o IS1272 que está presente em *Staphylococcus haemolyticus* e *S. epidermidis*, e é encontrado menos freqüentemente em *S. aureus*. O *S. aureus* e o *S. epidermidis* possuem seqüências de ligação idênticas do IS1272- $\Delta$ *mecRI* nos SCC*mec* tipos I e IV. Os pesquisadores acreditam que pode ter ocorrido recombinação em CoNS gerando o SCC*mec* tipo IV, e que a seqüência do tipo IV foi subsequente transferida para o *S. aureus*, já que em *S. haemolyticus* o IS1272 normalmente está inserido de forma intacta e em *S. epidermidis* e *S. aureus* aparecem com deleções. Archer et al. (1996) sugeriram que *S. haemolyticus* foi um dos hospedeiros definitivos para o IS1272 e que foi secundariamente adquirido pelos *S. epidermidis* e *S. aureus*. (HANSSEN & SOLLID, 2006).

Em contrapartida, Sousa & de Lencastre (2004) propuseram que a principal fonte de SCC*mec* seria o MRSA e que a aquisição de *mecA* de CoNS é um evento raro. Conforme Hanssen & Sollid (2006), essa hipótese necessita de investigações futuras.

Uma característica intrigante da resistência à meticilina refere-se ao fenômeno da resistência heterogênea. Apesar das cepas de MRSA conterem o gene *mecA* o nível de resistência à meticilina não está correlacionado com a quantidade de PLP 2a produzida (BERGER-BACHI et al., 1992). Pesquisa realizada por Hartman & Tomasz (1986) evidenciou que ocorre uma enorme variação na expressão fenotípica de resistência à meticilina, com muitas cepas exibindo resistência heterogênea apesar de todas conterem o gene *mecA*.

A regulação do *mecA* é complexa. A síntese da proteína MecA é induzida e modulada por um sistema de transdução de sinal. O gene *mecI* codifica a proteína MecI, constitutiva, repressora da transcrição e o gene *mecRI* codifica a proteína MecRI que é transdutora de sinal. A proteína MecRI detecta a presença de antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos através de um domínio extracelular ligador de penicilina e ativa o seu domínio citoplasmático a uma clivagem auto-catalítica,

atuando como uma protease. Isso direta ou indiretamente, cliva a proteína repressora MecI ligada a região operadora do gene *mecA* (HIRAMATSU et al., 2001; MALLORQUÍ-FERNÁNDEZ et al., 2004). Além disso, a transcrição do *mecA* é modulada por genes cromossomais denominados *fem* que codificam as enzimas que modificam o conteúdo da peptidoglicana, contribuindo para o fenótipo da resistência heterogênea entre os MRSA.

A causa da heterogeneidade foi inicialmente investigada por mutagenese mediada por transposon, o que levou a identificar os locus que ao serem inativados diminuía o nível de resistência e foram denominados fatores *fem* (fatores essenciais para resistência à meticilina) ou fatores *aux* (auxiliares) (HURLIMANN-DALEL et al., 1992; DE LENCASTRE & THOMASZ, 1994). Mutações nesses fatores inibem a biossíntese da parede celular. Os fatores *femA*, B e X catalisam a adição de glicinas na ponte pentaglicídica, *femC* realiza a amidação do glutamato, *femD* forma a glucosamina fosfato e *femF* adiciona a lisina (SALMENLINNA, 2002).

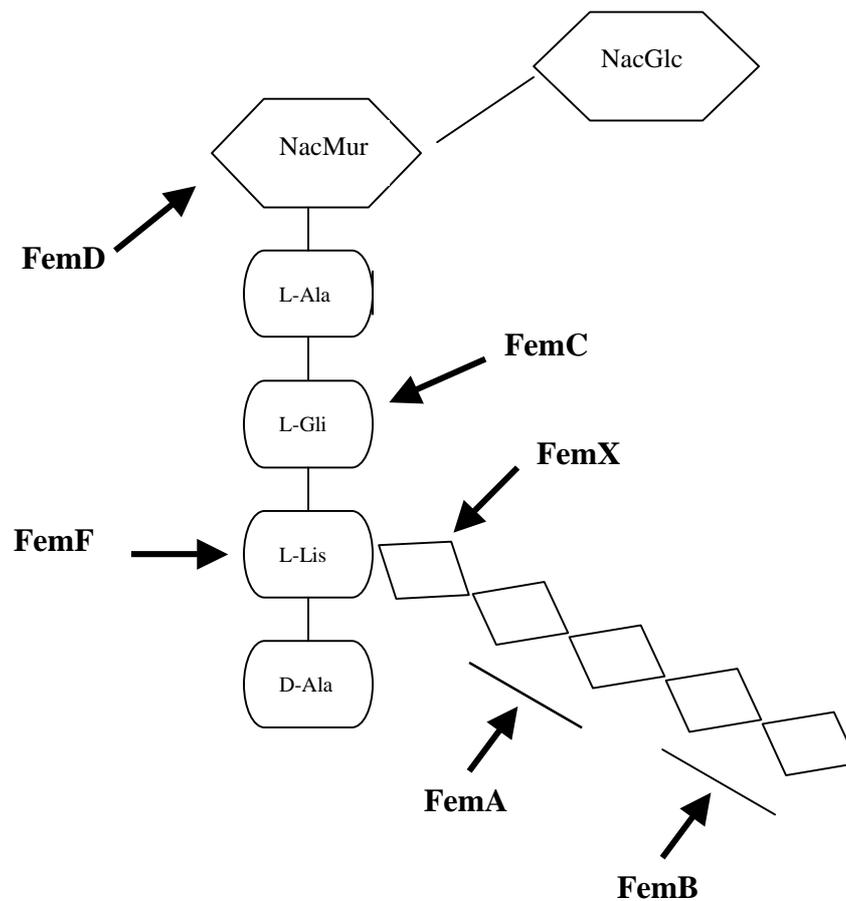


FIGURA 5. Fatores que afetam a biossíntese da parede celular em *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina.

Tomasz et al. (1991) definiram quatro diferentes classes de resistência baseada na expressão fenotípica dos MRSA. Nas cepas heterogêneas de classe I a maioria das células (99%) apresenta valores de concentrações inibitórias mínimas - CIMs de 1,5-3,0 µg/ mL e somente uma pequena sub-população ( $10^{-8}$ – $10^{-6}$ ) é altamente resistente. Nos MRSA heterogêneos de classe II a CIM para a maioria das células varia de 6-25 µg/ mL e uma sub-população maior ( $10^{-5}$ - $10^{-4}$ ) é altamente resistente. A CIM para as cepas de classe III ultrapassa 50 µg/ mL e uma proporção maior de células altamente resistentes está presente ( $10^{-3}$ - $10^{-1}$ ). A classe menos freqüente de MRSA correspondia à classe IV e compreende as cepas com resistência homogênea cujo valor de CIM ultrapassa 400 mg/L (DE LENCASTRE, FIGUEIREDO & TOMASZ, 1993).

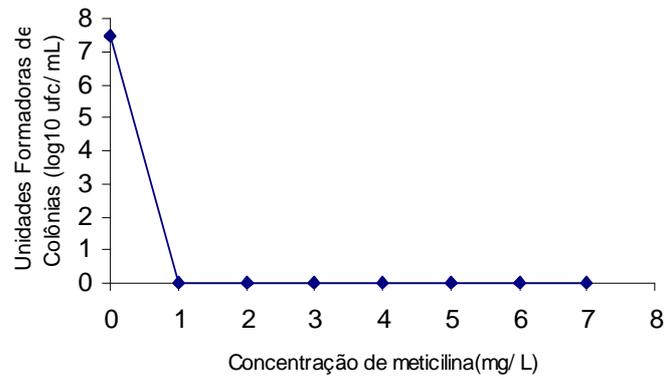
Essa variedade de fenótipos dificulta a detecção de resistência, principalmente daquelas cepas de classe I na qual a CIM da maioria das células pode estar abaixo de 1,5 µg/ mL, podendo ser confundidas com *S. aureus* suscetível, o qual possui CIM entre 0,5 - 1,0 µg/ mL (DE LENCASTRE et al., 1991). As cepas de classe I muitas vezes acabam ainda sendo classificadas como cepas com resistência *borderline* (MIC 2-4 µg/ mL). As cepas *borderline* podem ser divididas em duas categorias: as que contêm o gene *mecA* e as que não apresentam esse gene. As *borderline mecA* positivas são cepas resistentes a meticilina, extremamente heterogêneas, apresentando uma sub-população de células, embora em número muito baixo, que pode crescer a altas concentrações da droga. As cepas *borderline* que não contêm o gene *mecA* não possuem sub-populações altamente resistentes, e acredita-se que sua resistência deve-se à hiperprodução de β-lactamase ou à reduzida afinidade pelas PLPs 1 e 2 (TOMASZ et al., 1989; CHAMBERS, 1997).

O número de sub-populações altamente resistentes e sua freqüência em MRSA é cepa-específica. Normalmente as células altamente resistentes, uma vez isoladas, retêm sua alta resistência e acredita-se que esse mecanismo ocorra no ambiente clínico levando a seleção de cepas com resistência aumentada, uma das razões para a falha do tratamento com β-lactâmicos contra os MRSA (BERGER-BACHI, 1999).

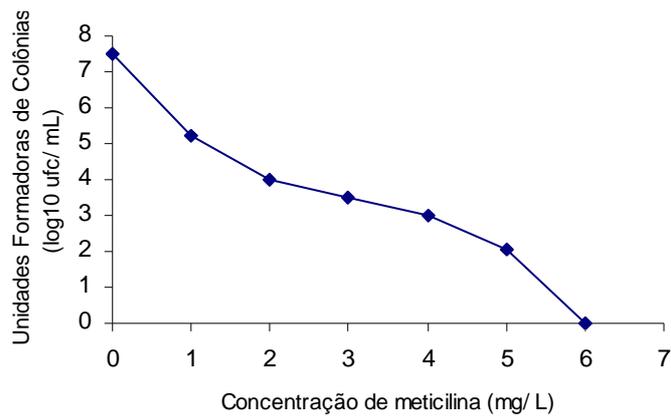
Luz, Miyazaki e Bôas (2005), determinaram o perfil de análise populacional (PAP) de 55 isolados clínicos de MRSA oriundos de 2 hospitais do Rio de Janeiro e

verificaram a presença de MRSA das classes I, II, III e IV, ilustradas na FIGURA 6. Foi observado também que dentre os isolados de MRSA estudados havia a predominância da classe IV, diferentemente do que ocorria há 10 anos.

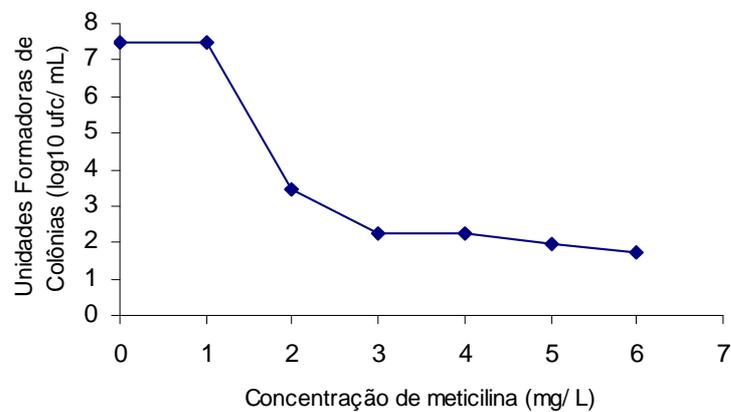
*S. aureus* "borderline"



MRSA Classe I



MRSA Classe II



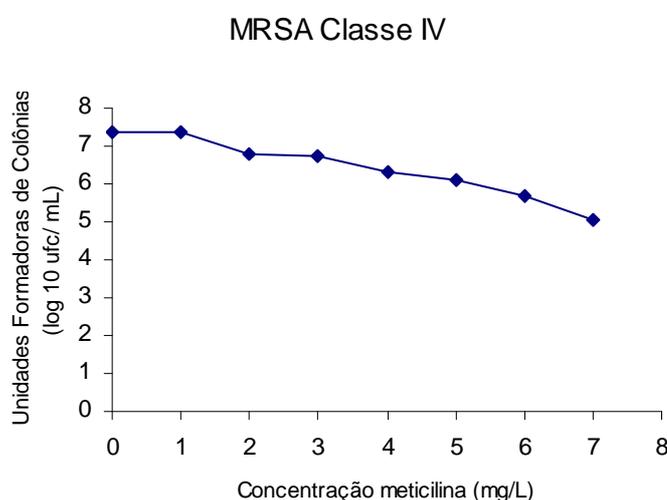
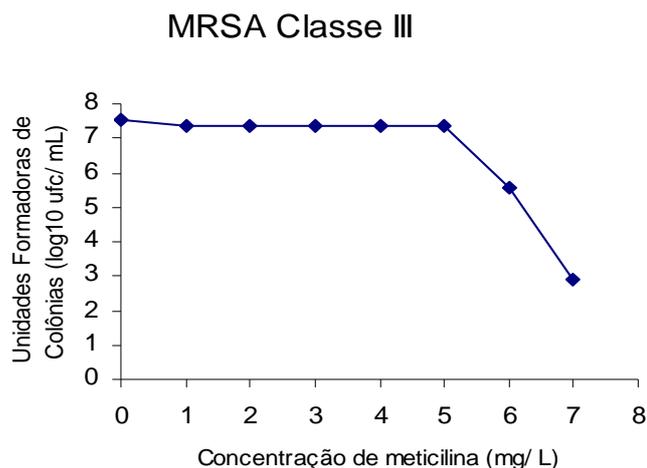


FIGURA 6. Perfil de Análise Populacional (PAP) de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina. Concentrações de meticilina: 1 = 3 µg/ mL; 2 = 25 µg/ mL; 3 = 50 µg/ mL; 4 = 80 µg/ mL; 5 = 200 µg/ mL; 6 = 400 µg/ mL; 7 = 800 µg/ mL.

Portanto, a correta determinação da suscetibilidade à oxacilina/ meticilina de *S. aureus* é vital tanto para o tratamento com antimicrobianos como também para impedir a disseminação de MRSA. Porém, a expressão heterogênea de resistência à meticilina é um fator limitante para a identificação acurada na rotina laboratorial através dos métodos de detecção fenotípica de MRSA (CHAMBERS,1997; BROWN, 2001). Estudo realizado por Resende & Figueiredo (1997) demonstrou que o teste utilizando ágar contendo 25 µg/ mL de meticilina conseguiu detectar todas as classes heterogêneas de MRSA além de não permitir o crescimento de *S. aureus*

*borderline* ou os *S. aureus* sensíveis à metilina (MSSA) testados, minimizando o erro na identificação de MRSA.

As detecções do gene *mecA* ou da proteína PLP 2a são apontadas como as mais precisas na caracterização de MRSA (O'HARA, HARRINGTON & REYNOLDS, 1989; ARCHER & PENNELL, 1990; GERBENDING et al., 1991) e são consideradas como padrões ouro (CHAMBERS, 1997; BROWN, 2001).

Comparadas às infecções causadas pelas cepas sensíveis, as infecções pelos organismos resistentes aos antimicrobianos levam à hospitalização mais prolongada e conseqüentemente, aumentam o risco de infecções hospitalares.

Estudos epidemiológicos indicam um aumento contínuo na resistência aos antimicrobianos nos hospitais dos Estados Unidos, nas unidades de tratamento intensivo. Dados referentes ao período de janeiro a dezembro de 2003 mostraram que a incidência de MRSA aumentou em 11% quando comparada ao período de 1998 a 2002. A proporção de MRSA continuou a aumentar chegando próximo a 60% (NNIS SYSTEM, 2004).

Em relação ao Brasil, em 1986 mais de 50% dos isolados nosocomiais de *S. aureus*, provenientes de pacientes internados em hospitais universitários na cidade de São Paulo, eram resistentes a metilina (PEREIRA et al., 1988; LOFTI, SILVA & MACHADO, 1988). Por volta de 1990, a taxa de MRSA em seis hospitais brasileiros variava de 38% a 78%, levando a um aumento significativo no uso da vancomicina (PANNUTI & GRINBAUM, 1995). Em estudo realizado entre janeiro de 1997 e dezembro 1999 foi observado que 34% dos *S. aureus* isolados de 12 hospitais, localizados em 4 estados brasileiros, eram resistentes a oxacilina (SADER et al., 2001).

Entretanto alguns estudos têm indicado uma mudança no perfil de suscetibilidade dos MRSA aos antimicrobianos. Inicialmente, após o primeiro relato de MRSA, os isolados apresentavam resistência a outras drogas que incluíam penicilina, tetraciclina e normalmente estreptomicina. Alguns isolados eram ainda resistentes a eritromicina, lincomicina, neomicina, kanamicina e novobiocina. Em 1969 foi observada, pela primeira vez, uma cepa clínica de MRSA resistente a gentamicina (GR-MRSA) que em 1980 já havia se tornado epidêmica na Austrália, Estados Unidos da América e Europa. Esses GR-MRSA eram resistentes a um grande número de outros antimicrobianos como trimetopim e ciprofloxacina (LELIÈVRE et al., 1999).

O MRSA do clone epidêmico (predominante), nos países da região oeste da Europa até 1990, era composta por microrganismos resistentes a múltiplos antimicrobianos e que expressavam resistência homogênea a meticilina (LAURENT et al., 2001). Entretanto em 1992, os hospitais da França observaram a re-emergência de cepas de MRSA suscetíveis a gentamicina e que também eram suscetíveis a outras drogas com tetraciclina, refampina e macrolídeos (LELIÈVRE et al., 1999; LAURENT et al., 2001).

Nas últimas décadas, técnicas de biologia molecular como amplificação do DNA pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e eletroforese em campos elétricos alternados (PFGE) têm sido utilizadas para estudar a relação entre os microrganismos pertencentes a uma determinada espécie, o que é essencial para a investigação epidemiológica de surtos de infecções em hospitais, na comunidade ou de origem alimentar (TENOVER et al., 1995).

A PCR é um processo através do qual se amplifica uma pequena quantidade de DNA em um grande número de cópias da região do DNA contendo o fragmento de interesse. O DNA que está sendo pesquisado (molde de DNA) juntamente com as quatro bases formadoras do DNA, o par de DNA iniciadores (*primers*) que contém nucleotídeos complementares ao fragmento de DNA de interesse, e a enzima de polimerização termoestável são submetidos a temperaturas variadas, em termociclador onde ocorrem o aquecimento que tem por objetivo separar as duas fitas do molde de DNA, o resfriamento que permite a ligação dos *primers* aos nucleotídeos complementares do molde e um novo aquecimento para que ocorra a extensão do fragmento de DNA de interesse. Essas variações na temperatura são repetidas várias vezes a fim de multiplicar o DNA de forma exponencial.

Estudos comparando a utilização de métodos moleculares têm demonstrado que, até o momento, o PFGE é o que melhor discrimina os diferentes tipos genômicos de uma espécie de microrganismo. Na técnica de PFGE o microrganismo é imobilizado em agarose, onde é lisado. O DNA é digerido com uma endonuclease de restrição que possui sítios infreqüentes, submetido à eletroforese utilizando um equipamento que gera campos elétricos de forma alternada e esses fragmentos de DNA são resolvidos no gel de agarose em um perfil de bandas, o qual é comparado com os perfis de outros isolados. De acordo com Tenover et al. (1995) a relação genética e epidemiológica entre os isolados pode ser classificada como:

- Indistinguíveis: são os isolados que possuem perfis com o mesmo número de bandas e que aparentemente são do mesmo tamanho quando comparado ao padrão de peso molecular. A interpretação epidemiológica de Tenover et al. (1995) é de que esses isolados são representantes da mesma cepa, ou seja, demonstram ter originado do mesmo ancestral. Caso essa cepa esteja presente com o maior número de isolados, é considerada como cepa-surto.
- Estreitamente relacionados: um isolado é considerado estreitamente relacionado à cepa-surto quando os perfis de PFGE diferem em um simples evento genético, como mutação pontual, inserção ou deleção de DNA, gerando entre 2 e 3 bandas de diferença.
- Possivelmente relacionados: um isolado é considerado possivelmente relacionado à cepa-surto quando os perfis de PFGE diferem através de dois eventos genéticos, como uma simples inserção ou deleção de DNA, ou ganho ou perda de sítios de restrição, originando entre 4 e 6 bandas de diferença.
- Não relacionado: um isolado é considerado não relacionado à cepa-surto quando os perfis de PFGE diferem através de três ou mais eventos genéticos gerando pelo menos 7 bandas de diferença.

Até um passado recente o estudo das infecções bacterianas enfocava somente como diagnosticar a doença. Nos últimos anos têm se dado, também, mais atenção às medidas preventivas para reduzir a exposição do hospedeiro suscetível à bactéria (SALYERS & WHITT, 1994) uma vez que, estudos epidemiológicos revelaram que os procedimentos e técnicas praticados pelos profissionais de saúde, que assistem aos pacientes, estão ligados diretamente à transmissão dos microrganismos causadores das infecções (GOLDMANN, 1992; EMORI & GAYNES, 1993).

Na prática clínica, uma das medidas para prevenir a disseminação dos microrganismos no ambiente hospitalar refere-se ao uso de anti-sépticos sobre tecidos vivos, e de agentes antimicrobianos para a desinfecção de artigos médicos, do mobiliário e das superfícies em hospitais. A desinfecção por esses agentes pode ser de caráter físico ou químico ou às vezes a combinação dos dois (RUSSELL, 1991; NOGUCHI et al., 1999).

Dentre os agentes químicos estão os desinfetantes, os quais pertencem à classe denominada saneante domissanitário com ação antimicrobiana (BRASIL. Portaria DISAD nº 15/88) e podem apresentar em suas formulações diferentes princípios ativos como fenóis sintéticos, glutaraldeído, formaldeído, quaternários de amônio, entre outros.

No Brasil, os desinfetantes estão submetidos às ações da Vigilância Sanitária através das Leis nº 6360/76, nº 6437/77, Decreto nº 79094/77 e Lei nº 9782/99.

A Lei nº 6360/76 dispõe sobre a vigilância a que ficam sujeitos os medicamentos, as drogas, os insumos farmacêuticos e correlatos, cosméticos, saneantes e outros produtos; o Decreto nº 79094/77 regulamenta a Lei nº 6360/76; a Lei nº 6437/77 configura as infrações à legislação sanitária federal, estabelece as sanções respectivas e, a Lei nº 9782/99 define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária e cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, configura infrações à legislação sanitária federal e estabelece as sanções respectivas.

Os desinfetantes devem também atender ao disposto em legislações específicas. Para isso, faz-se necessário cumprir as normas para o registro dos saneantes domissanitários com ação antimicrobiana constantes na Portaria DISAD nº 15 de 23/08/88, na qual encontram-se as definições, as classificações dos produtos, além das exigências relacionadas à comprovação de sua eficácia.

O desinfetante, segundo a Portaria DISAD nº 15/88, é definido como “formulações que têm na sua composição substâncias microbicidas e apresentam efeito letal para microrganismos não esporulados”.

Biocida, por definição, é o agente físico ou químico, não quimioterápico, que mata todas as formas vivas de organismos, micro e macro, porém o termo é normalmente utilizado para se referir aos microrganismos (BLOCK, 2001).

O termo resistência bacteriana, quando aplicado aos biocidas, refere-se ao microrganismo de uma dada espécie que não é destruído ou que não é inibido pela concentração de biocida na qual a maioria dos microrganismos da mesma espécie seria (RUSSELL, HAMMOND & MORGAN, 1986; HAMMOND, MORGAN & RUSSELL 1987; CHAPMAN, 1998; CHAPMAN, DIEHL & FEARNside, 1998).

Os biocidas catiônicos como os compostos quaternários de amônio são amplamente utilizados como desinfetantes em ambientes de saúde e em locais de preparo de alimentos. Os compostos quaternários de amônio atuam sobre a membrana, ou seja, no caso de bactérias o sítio alvo é a membrana citoplasmática.

O mecanismo de ação envolve a adsorção e interiorização desses agentes químicos, a reação com os componentes da membrana citoplasmática seguida de sua desorganização, extravasamento de material intracelular de baixo peso molecular, degradação de proteínas e ácido nucléico, e lise da parede celular levando a morte da célula bacteriana (CHAPMAN, 2003).

As investigações relacionando a resistência cruzada e co-resistência entre biocidas e medicamentos antimicrobianos ainda são bastante controversas. A resistência cruzada ocorre quando diferentes agentes antimicrobianos atacam o mesmo alvo, iniciando assim a morte celular através de uma via em comum. A co-resistência ocorre quando os genes que codificam o fenótipo de resistência ao biocida estão localizados junto com marcadores de resistência aos medicamentos antimicrobianos no mesmo elemento genético móvel, como plasmídeo, transposon, ou integron. O resultado final para ambos os mecanismos é que o desenvolvimento de resistência para um agente antimicrobiano pode levar ao aparecimento de resistência para outro agente (CHAPMAN, 2003).

Chapman (2003) considera que a co-resistência entre compostos quaternários de amônio e medicamentos antimicrobianos é de destacado interesse já que a ampla utilização de produtos a base de quaternários de amônio em instituições de saúde e em locais de preparo de alimentos, poderia facilitar a introdução e a disseminação dos genes de resistência aos antimicrobianos, assim como o uso indiscriminado desses medicamentos poderia introduzir os genes de resistência.

A maioria dos estudos sobre resistência aos biocidas tem sido realizada em bactérias (RUSSELL, 2001). Os *S. aureus* são geralmente considerados sensíveis aos desinfetantes, no entanto, isolados resistentes aos compostos quaternários de amônio já foram isoladas (TOWNSEND et al., 1984; AKIMITSU et al., 1999)

Alguns estudos demonstram a ligação existente entre a resistência aos biocidas e aos medicamentos antimicrobianos (RUSSELL, 1999; RUSSELL, SULLER & MAILLARD, 1999; RUSSELL, 2000; RUSSELL & MAILLARD, 2000), entretanto outros autores verificaram que patógenos hospitalares resistentes aos antimicrobianos, como os estafilococos e os enterococos, eram prontamente inativados por biocidas assim como as cepas sensíveis aos medicamentos antimicrobianos (ALQURASHI, DAY & RUSSELL, 1996; BRADLEY & FRAIRE, 1996; ANDERSON, CARR & BOND, 1997; RUTALA et al, 1997).

Em geral, a resistência bacteriana aos biocidas deve-se a dois mecanismos, o intrínseco ou inato, e o adquirido (RUSSEL, 1994; RUSSELL, 1996; MC DONNELL & RUSSEL, 1999). A resistência intrínseca é uma propriedade natural do microrganismo capaz de impedir a ação do desinfetante/ anti-séptico. Pode ser manifestada pelo decréscimo da entrada do agente antimicrobiano devido, por exemplo, a impermeabilidade da célula bacteriana. Isso ocorre pelo fato de apresentarem estruturas que atuam como barreiras de acesso do antimicrobiano como é o caso da membrana externa em bactérias Gram-negativas, córtex e capa em endosporos bacterianos, parede celular lipídica em micobactérias, e glicocálice e cápsula no caso de bactérias Gram positivas. Outra possibilidade é a produção de enzimas mediadas pelo cromossoma e que podem inativar o agente químico.

A resistência aos agentes antimicrobianos pode também ser adquirida, resultando tanto da mutação quanto da aquisição de plasmídios ou transposons (RUSSELL, 1998).

Os genes *qacA*, *qacB*, *qacC*, *qacD*, *smr* e *ebr* foram identificados como os determinantes que conferem resistência aos cátions orgânicos através do mecanismo de bomba de efluxo de drogas dependente da força proton motora (PUTMANN, VAN VEEN & KONINGS, 2000). A análise da seqüência de nucleotídeos indicou que *qacA* é muito similar ao *qacB*, e *smr* é o mesmo que *qacC*, *qacD* e *ebr*. Assim, os genes de resistência aos desinfetantes/ anti-sépticos podem ser classificados estruturalmente em duas famílias: *qacA/B* e *smr* (LITTLEJOHN et al., 1990; NOGUCHI et al., 1999).

Os genes *qacA/B* e *smr* são geralmente de natureza plasmidial e codificam as proteínas QacA/B e Smr. Essas proteínas são classificadas de acordo com o tamanho e a similaridade de suas estruturas. Dessa forma, as proteínas QacA e QacB pertencem a uma classe denominada principal superfamília facilitadora (*major facilitator superfamily* – MFS) e estão envolvidas em transporte dos tipos uniporte, simporte e antiporte de várias substâncias. A proteína Smr faz parte da família secundária de resistência a múltiplas drogas (*small multidrug resistance family* – SMR) e realiza o transporte do tipo uniporte. (MITCHELL, BROWN, SKURRAY, 1998; PUTMANN, VAN VEEN & KONINGS, 2000)

Existem vários estudos relacionando a aquisição de plasmídios com a redução da suscetibilidade aos biocidas. Por exemplo, cepas de MRSA com plasmídios carreando genes de resistência à gentamicina exibem aumento da

resistência aos biocidas catiônicos como compostos quaternários de amônio, clorhexidina, entre outros (LYON & SKURRAY, 1987).

Os aspectos aqui abordados quanto à gravidade da resistência dos MRSA aos medicamentos antimicrobianos e aos desinfetantes têm a preocupação em proteger e promover a saúde no sentido amplo do termo.

Sendo a proteção e a promoção da saúde, e do bem-estar da população um dever do Estado, cabe a ele impedir e regular as atividades que possam significar riscos para a saúde pública. Essa atribuição do Poder Público se realiza de diversas formas e por meio de esferas da administração pública, dentre elas a Vigilância Sanitária.

Tecnicamente, Vigilância Sanitária pode ser entendida como a área da Saúde Pública que trata das diversas formas de ameaça à saúde, principalmente através do uso e consumo de novos materiais, produtos e tecnologias cada vez mais presentes na vida contemporânea.

Efetivar a proteção da saúde significa interferir no processo de fabricação e consumo de produtos e serviços, contrariando interesses econômicos. Essa priorização da saúde foi enfatizada a partir da publicação da Lei 8.080/90, a Lei Orgânica da Saúde que regulamenta o Sistema Único de Saúde - SUS, e define a vigilância sanitária como “um conjunto de ações capaz de eliminar, diminuir ou prevenir riscos à saúde, e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e circulação de bens e da prestação de serviços de interesse da saúde abrangendo:

- O controle de bens de consumo que, direta ou indiretamente, se relacionem com a saúde, compreendidas todas as etapas e processos, da produção ao consumo.
- O controle da prestação de serviços que se relacionam direta ou indiretamente com a saúde, tornando as ações da Vigilância Sanitária mais abrangentes (COSTA & ROSENFELD, 2000).

Porém, infelizmente, o SUS após 16 anos ainda não se consolidou de forma plena.

O sistema engloba unidades nos três níveis de governo: federal, estadual e municipal. No nível federal estão a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), criada pela Lei 9.782/99 como uma autarquia sob regime especial vinculada ao Ministério da Saúde e cuja finalidade institucional é promover a

proteção da saúde da população por intermédio do controle sanitário da produção e da comercialização de produtos e serviços submetidos à Vigilância Sanitária, e o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), que desempenha o papel de principal órgão nacional para as questões tecnológicas e normativas relativas ao controle de qualidade de insumos, produtos, ambientes e serviços.

Em nível estadual estão o órgão de Vigilância Sanitária (VISA) e o Laboratório Central de Saúde (LACEN) de cada uma das unidades da federação, e em nível municipal estão os serviços de vigilância sanitária dos municípios brasileiros.

Em um contexto mais abrangente do que o estabelecido pelas atividades da rotina analítica, o INCQS, da Fundação Oswaldo Cruz, visa dar suporte às ações da Vigilância Sanitária que se constituem em instrumento social, protegendo de violências contra as condições de saúde e de bem-estar da população, promovendo medidas de melhoria da qualidade da produção e comercialização, entre outras responsabilidades que lhe são conferidas.

## 2. OBJETIVOS GERAIS

Tendo em vista a missão do INCQS em “contribuir para a promoção e recuperação da saúde e prevenção de doenças, atuando como referência nacional para as questões científicas e tecnológicas relativas ao controle da qualidade de produtos, ambientes e serviços vinculados à Vigilância Sanitária”, a ampla disseminação dos MRSA no ambiente hospitalar, a persistência desses microrganismos frente à rotineira utilização dos desinfetantes à base de quaternários de amônio, inclusive já tendo sido descritos isolados resistentes a esse princípio ativo (TOWNSEND et al., 1984) é de fundamental importância determinar os tipos genômicos apresentados pelos MRSA, verificar a presença de genes de resistência aos quaternários de amônio e avaliar a suscetibilidade dos representantes dos principais clones de MRSA ao composto à base de quaternários de amônio.

## 3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

A fim de cumprir todas as etapas deste estudo teve-se como objetivos específicos:

- isolar e identificar os MRSA de origem clínica;
- verificar o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos;
- analisar os perfis de fragmentação dos DNAs utilizando a técnica de PFGE;
- verificar a presença do gene *mecA* e dos genes *qacA/B* e *smr* através da técnica de PCR;
- avaliar a qualidade do desinfetante à base de quaternários de amônio verificando a atividade bactericida pelo Método da Diluição de Uso, utilizando os microrganismos de referência;
- avaliar a suscetibilidade dos representantes dos principais clones de MRSA frente ao desinfetante à base de quaternários de amônio nas diluições recomendada pelo fabricante e 20% abaixo da mesma;
- determinar a concentração inibitória mínima do desinfetante para as cepas utilizadas no Método da Diluição de Uso.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Isolados clínicos**

Foram estudados 74 isolados clínicos de MRSA, provenientes de três hospitais do Rio de Janeiro – Hospital RJ-A, Hospital RJ-B e Hospital RJ-C – do período de 2002 a 2003.

*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e ATCC 33591 foram os microrganismos utilizados na detecção do gene *mecA* como controles negativo e positivo, respectivamente.

*Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 foram utilizados como microrganismos-controle do lote do cartão GPS 105 utilizado no teste de suscetibilidade aos antimicrobianos através do sistema Vitek.

*Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Salmonella choleraesuis* ATCC 10208 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 são os microrganismos de referência que foram utilizados no ensaio para avaliar a qualidade do desinfetante através da verificação da atividade bactericida, especificadas no Procedimento Operacional Padronizado do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – POP INCQS nº 65.3210.007, preconizadas pela Association of Official Analytical Chemists – AOAC (BELOIAN, 1990).

### **4.2. Desinfetante**

Foi empregado um desinfetante hospitalar à base do quaternário de amônio, cloreto de benzalcônio, contendo 4% (40000 ppm) do princípio ativo.

### **4.3. Isolamento bacteriano**

Os isolados clínicos foram semeados em placas de Petri contendo Tryptic Soy Agar (TSA) e incubadas a 37°C por 18-24 h, para verificação da pureza.

### **4.4. Preparação do estoque dos isolados de MRSA**

As colônias TSA foram semeadas em Tryptic Soy Broth (TSB) incubadas a 37°C por 18-24 h, sob agitação a 200 rpm. Alíquotas de 800 µL dessas culturas foram transferidas para criotubos, adicionadas de 200 µL de solução de glicerol a 50% e estocadas em freezer a – 70°C.

#### **4.5. Identificação bacteriana**

A confirmação dos microrganismos, que já vinham identificados pelos hospitais como MRSA, foi realizada através da coloração de Gram, da verificação da produção de coagulase e da catalase. Foram realizadas provas bioquímicas através do kit APIStaph (bioMérieux), de acordo com as instruções do fabricante.

#### **4.6. Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos**

O teste de suscetibilidade foi realizado através do sistema automatizado Vitek 32 (bioMérieux) usando o cartão GPS-105 (bioMérieux), de acordo com as instruções do fabricante. Os cartões contém os antimicrobianos AMP-ampicilina, SAM-ampicilina/sulbactam, CFZ-cefazolina, CIP-ciprofloxacina, CLI-clindamicina, ERY-eritromicina, GEN-gentamicina, NIT-nitrofurantoina, OXA-oxacilina, PEN-penicilina-G, RIF-rifampicina, TET-tetraciclina, SXT- trimetoprim/ sulfa, VAN-vancomicina, e foram inoculados com a suspensão do microrganismo, correspondente a 0,5 da escala McFarland.

#### **4.7. Teste para triagem preliminar de MRSA em ágar contendo metilicina (Met 25)**

Alíquotas de 100 µL das culturas em TSB incubadas a 37° C por 18-24 h, sob agitação a 200 rpm (fornecendo 10<sup>9</sup> UFC/ mL) foram semeadas sobre TSA contendo metilicina na concentração de 25 µg/ mL e incubadas a 37° C/ 24-48 h para verificação do crescimento frente a alta concentração desse antimicrobiano (RESENDE & FIGUEIREDO, 1997).

#### **4.8. Reação em cadeia da polimerase – PCR**

##### **4.8.1. Preparação do DNA bacteriano**

A cultura em TSB obtida após incubação a 37°C/ 18-24 h sob agitação a 200 rpm, foi centrifugada e o sedimento das células bacterianas foi suspenso no tampão de suspensão celular adicionado de 0,2 mg/mL de lisostafina e 10 mg/mL de lisozima e incubada a 37°C por 30 min.. O DNA total foi extraído através da utilização do kit DNeasy Tissue Kit (Qiagen, Inc, Valencia, CA) de acordo com a recomendação do fabricante.

#### 4.8.2. Verificação da presença dos genes *mecA*, *qacA/B* e *smr*

Foi realizada através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando oligonucleotídeos (*primers*) específicos, conforme descrito na TABELA 1, para amplificar os genes *mecA*, *qacA/B* e *smr* utilizando o aparelho DNA PTC-200 – Peltier Thermal Cycler (MJ Research – Massachusetts – EUA).

Para o gene *mecA* foi preparada uma mistura de reação com 25 µL de volume final contendo 1 µL de DNA genômico purificado, 0,5 pmol do par de *primers* *mecA*, 0,2 mM de dNTP, 0,02 U de Taq DNA polimerase e 2,5 µL de tampão 10X contendo 0,8 mM de MgCl<sub>2</sub>. A amplificação do gene *mecA* foi realizada de acordo com o programa: 94°C por 5 min seguido de 35 ciclos a 94°C por 2 min, 57°C por 2 min, 72° por 1 min e 72°C por 7 min.

Para o gene *qacA/B* foi preparada uma mistura de reação com 25 µL de volume final contendo 5 µL de DNA genômico purificado, 1 pmol do par de *primers* *qacA*, 0,2 mM de dNTP, 0,05 U de Taq DNA polimerase 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 programa: 95°C por 2 min seguido de 35 ciclos a 94°C por 1 min, 62°C por 1 min, 72° por 2 min e 72°C por 10 min.

Para o gene *smr* foi preparada uma mistura de reação com 25 µL de volume final contendo 5 µL de DNA genômico purificado, 4 pmol do par de *primers* *smr*, 0,2 mM de dNTP, 0,1 U de Taq DNA polimerase e 2,5 µL de tampão 10X contendo 3 mM de MgCl<sub>2</sub>. A amplificação do gene *smr* foi realizada de acordo com o programa: 95°C por 2 min, seguido de 35 ciclos a 95°C por 1 min, 55°C por 1 min, 72° por 2 min e 72°C por 10 min.

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% em TBE 1X a 90 V por 1:30 h, adicionado de brometo de etídio e visualizados em transiluminador de luz ultra-violeta.

#### 4.9. Seqüenciamento e análise

A seqüência de nucleotídeos foi determinada pelo método dideoxy chains-termination com terminações marcadas com corante, e polimerase T7 DNA de acordo com as instruções do fabricante (Applied Biosystems, Fosters, City, CA, USA), seguido da análise com seqüenciador automático ABI Prism 3100 (Applied Biosystems). A seqüência de nucleotídeos foi alinhada com o programa clustal X,

versão 1,8/22 e a seqüência de nucleotídeos disponível no GenBank, sob número de acesso 773395, foi usada para comparação.

#### **4.10. Eletroforese de pulsos elétricos alternados (Pulsed Field Gel Electrophoresis - PFGE)**

##### **4.10.1. Preparação do DNA**

Alíquotas de 100 µL das culturas em TSB de cada isolado de MRSA incubadas a 37°C por 18 - 24 h sob agitação a 200 rpm (fornecendo 10<sup>9</sup> UFC/ mL) foram centrifugadas a 10.000 rpm/ 5 min/ 4°C, suspensas em tampão Tris/NaCl e centrifugadas a 10.000 rpm/ 5min/ 4°C. Os sedimentos foram suspensos em 200 µL do mesmo tampão e adicionadas de 200 µL de agarose “low melting”. A confecção dos discos foi realizada pipetando alíquotas de 20 µL da mistura microrganismo/ agarose, dispendo-as sobre lâminas de vidro cobertas com parafilme e cobrindo-as com outra lâmina de vidro coberta com parafilme. Os discos foram incubados em 1,0 mL de tampão de lise contendo Tris 6,0 mM/EDTA 0,1 M/ NaCl 1,0 M, RNase 0,05 mg e lisostafina 0,08 mg, a 37°C por 3 h.. Após a retirada do tampão de lise foram tratados com 1,0 mL de solução aquosa contendo 1,0 mg de proteinase K e incubados a 50°C por 18 h. Os discos contendo o DNA bacteriano foram submetidos a 5 lavagens por 1 h. utilizando 5,0 mL de tampão Tris 10 mM/ EDTA 1 mM, e mantidos em geladeira a 5°C com 5,0 mL do mesmo tampão, até o momento de uso.

##### **4.10.2. Digestão do DNA e eletroforese de campos elétricos alternados (PFGE)**

Os discos contendo DNA foram digeridos em tampão Tris 6,0 mM/ KCl 100 mM/ MgCl<sub>2</sub> 6,0 mM contendo 0,2 µL de 2-mercapto-etanol e 8 U de enzima *Sma*I para cada disco, e incubados a 25°C por 18 h. Posteriormente foram introduzidos nos poços do gel de agarose a 1% p/v em Tris 2,5 mM/ ácido bórico 2,5 mM/ EDTA 1 mM (TBE 0,5X), e submetidos à eletroforese de campos elétricos alternados (pulsed field gel eletroforesis – PFGE) utilizando o aparelho CHEF DR III (Bio-Rad). A visualização dos fragmentos de DNA foi realizada em transiluminador de luz ultravioleta após corar o gel com brometo de etídio a 0,1 mg/mL.

#### **4.10.3. Análise do perfil de fragmentação do PFGE**

A análise do perfil de fragmentação foi realizada através do software Bionumerics Version 2.0 (Applied Maths – Kortrijk, Bélgica) que gerou um dendrograma. A designação dos clones foi realizada de acordo com os critérios de Tenover et al. (1995).

#### **4.11. Verificação da qualidade do desinfetante**

A qualidade do desinfetante contendo cloreto de benzalcônio foi verificada através do ensaio da atividade bactericida usando o Método da Diluição de Uso, da AOAC (BELOIAN, 1990), conforme o Procedimento Operacional Padronizado - POP INCQS nº 65.3210.007 ilustrado na FIGURA 7. Cilindros de aço inoxidável foram contaminados durante 15 min. com uma cultura de 48h incubada a 37°C, dispostos verticalmente em placas de Petri forradas com papel de filtro e levadas a estufa a 37°C por 40 min. Cada um dos cilindros foi transferido para cada tubo contendo 10 mL do desinfetante, na diluição recomendada pelo fabricante, durante 10 min. Após esse tempo de exposição foram transferidos para os tubos contendo 10 mL de caldo nutriente com lecitina e polissorbato 80 (caldo Lethen). Após 10 min. foram novamente transferidos para tubos contendo 10 mL do mesmo meio de subcultura e incubados a 37°C por 48 h.. Esse procedimento foi realizado utilizando 60 cilindros de aço inoxidável. Os ensaios foram realizados com os três microrganismos de referência, utilizando o desinfetante na diluição recomendada pelo fabricante.

Na leitura dos resultados verificou-se a presença ou a ausência de crescimento nos tubos de subcultura e re-subcultura após o tempo de incubação. Através do critério de avaliação o desinfetante deve ser capaz de matar os microrganismos de referência sobre 59 dos 60 cilindros.

#### **4.12. Suscetibilidade ao desinfetante**

A suscetibilidade ao desinfetante contendo cloreto de benzalcônio dos MRSA isolados de amostras clínicas foi avaliada através do Método da Diluição de Uso, da AOAC (BELOIAN, 1990), conforme o Procedimento Operacional Padronizado - POP INCQS nº 65.3210.007 ilustrado na FIGURA 7. Cilindros de aço inoxidável foram contaminados durante 15 min. com uma cultura de 48h incubada a 37°C, dispostos verticalmente em placas de Petri forradas com papel de filtro e levadas a estufa a 37°C por 40 min. Cada um dos cilindros foi transferido para cada tubo contendo 10

mL do desinfetante, na diluição recomendada pelo fabricante, durante 10 min. Após esse tempo de exposição foram transferidos para os tubos contendo 10 mL de caldo nutriente com lecitina e polissorbato 80. Após 10 min. foram novamente transferidos para tubos contendo 10 mL do mesmo meio de subcultura e incubados a 37°C por 48 h. Esse procedimento foi realizado utilizando 60 cilindros de aço inoxidável.

Os ensaios foram realizados com três representantes de cada um dos dois perfis clonais mais freqüentes determinados pelo PFGE, e três representantes de MRSA multi-suscetíveis aos antimicrobianos a fim de verificar o seu comportamento frente ao desinfetante na diluição indicada pelo fabricante e numa diluição 20% abaixo da recomendada.

Os isolados de MRSA utilizadas neste ensaio foram:

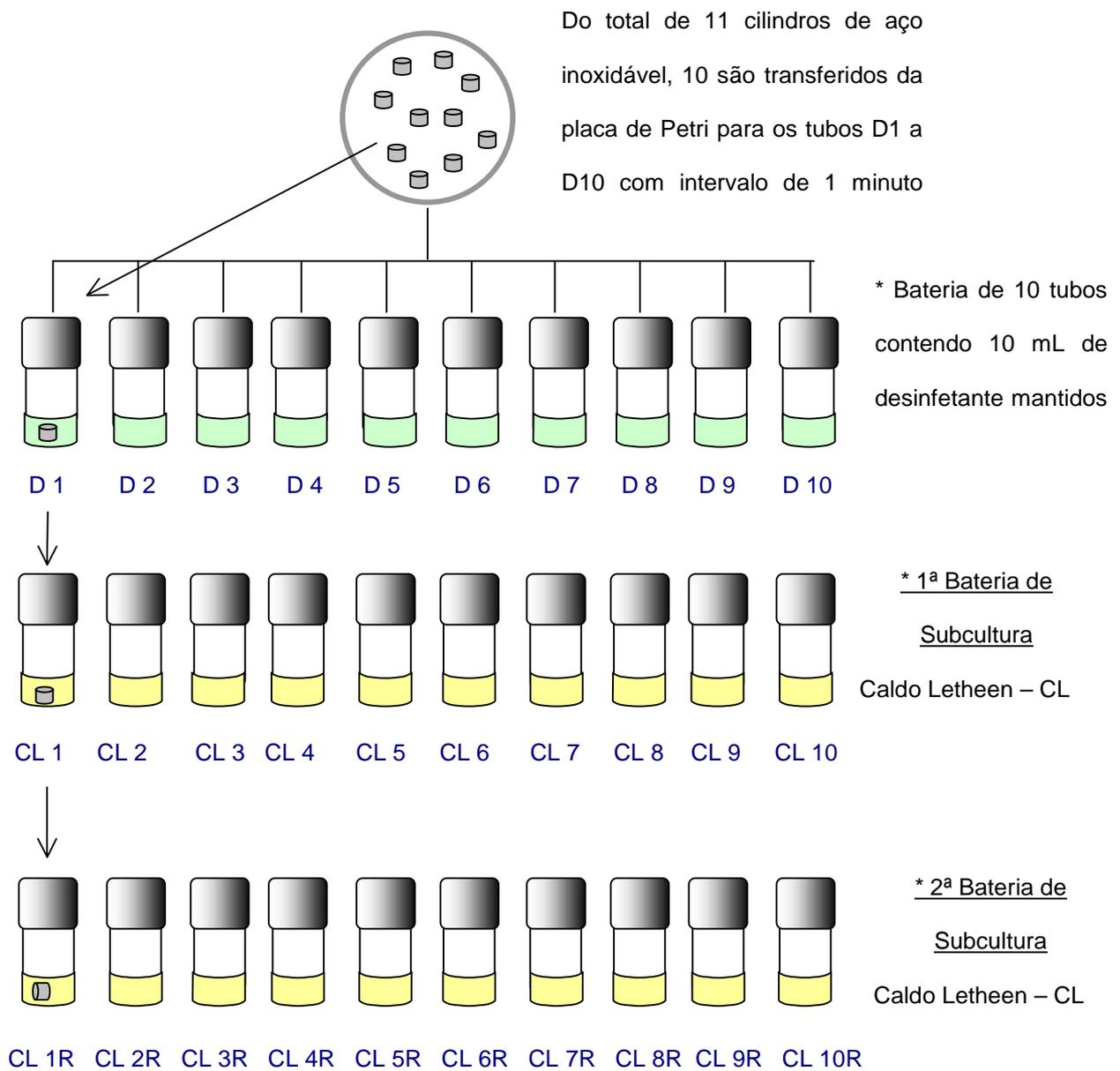
- Clone A (clone prevalente): 01/02 RJ-A, 47/02 RJ-B contendo o gene *qacA/B* e o 54/03 RJ-B sem a presença do gene *qacA/B*.
- Clone A, sub-tipo A3 (sub-tipo mais prevalente do clone A): 66/02 RJ-C, 28/03 RJ-A contendo o gene *qacA/B* e o 58/03 RJ-B sem a presença do gene *qacA/B*.
- MRSA multi-suscetíveis aos antimicrobianos: 23/03 RJ-A e 24/03 RJ-A contendo o gene *qacA/B* e o 57/03 RJ-B sem a presença do gene *qacA/B*.

Na leitura dos resultados verificou-se a presença ou a ausência de crescimento nos tubos de subcultura e re-subcultura após o tempo de incubação. Para esse ensaio o critério de avaliação utilizado foi que os MRSA que apresentaram crescimento em mais do que 1 cilindro foram considerados menos suscetíveis do que o microrganismo de referência.

#### **4.13. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do desinfetante**

A determinação das CIMs do desinfetante à base de cloreto de benzalcônio foi realizada segundo Al-Masaudi et al. (1991) com algumas modificações. Três representantes de cada um dos dois perfis clonais mais freqüentes de MRSA determinados pelo PFGE (clone A, e o sub-tipo A3), três representantes de MRSA multi-suscetíveis aos antimicrobianos, e o microrganismo de referência de *S. aureus* foram cultivados em triplicata em meio TSB, e os CIMs determinados pela adição do desinfetante com concentrações variando de 0,1 a 1,0 ppm/ 10 mL e incubados por 24, 48 e 72 h a 37°C. Adicionou-se a cada tubo, o inóculo de 2 µL (cerca de  $2 \times 10^5$

UFC) obtido a partir de uma cultura de 24 h a 37°C em meio TSB. Foi considerada como a concentração inibitória mínima, aquela correspondente a maior concentração do desinfetante que não forneceu crescimento visível. Os clones de MRSA e o microrganismo de referência foram crescidos também na ausência do desinfetante como controle positivo.



D: desinfetante; CL: caldo Letheen; R: re-subcultura

\* Pode-se utilizar 1 bateria com 20 tubos e intervalo de 30 segundos entre cada transferência.

FIGURA 7. Esquema do Método da Diluição de Uso (POP INCQS nº 65.3210.007)

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Identificação bacteriana

Através das características morfo-tintoriais dos isolados provenientes dos hospitais verificou-se que eram cocos Gram-positivos, produziam as enzimas coagulase e catalase, e o kit ApiStaph confirmou que se tratavam de *Staphylococcus aureus*.

### 5.2. Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos

O perfil de suscetibilidade de cada um dos 74 isolados dos Hospitais RJ-A, RJ-B e RJ-C encontram-se nas TABELAS 2, 3 e 4, respectivamente. Esse perfil foi determinado usando o sistema automatizado Vitek com o cartão GPS 105, através do qual a maioria dos isolados de *S. aureus* (95,95%) apresentou-se resistente a oxacilina, e conseqüentemente a todos os  $\beta$ -lactâmicos testados e por essa razão determinados como MRSA. Além disso, pelo menos 83% dos isolados eram também resistentes aos diferentes grupos de antimicrobianos. Um percentual de 4,05% dos isolados (21/03 RJ-A, 23/03 RJ-A e 67/02 RJ-C) foi caracterizado pelo Vitek como MSSA. O perfil global de resistência aos antimicrobianos dos 74 isolados clínicos estudados encontra-se na TABELA 5.

Observou-se que dez (13,51%) dos 74 isolados apresentaram-se multi-suscetíveis a vários antimicrobianos antiestafilocócicos não- $\beta$ -lactâmicos, conforme pode ser observado na TABELA 6. Pode-se ainda verificar que sete (9,45%) dos 74 isolados, denominados MRSA suscetíveis a gentamicina, ou MRSA-GS, foram suscetíveis a ciprofloxacina, clindamicina, gentamicina, nitrofurantoina, rifampicina, tetraciclina, trimetoprim/ sulfam, e vancomicina, e entre eles encontravam-se os 3 isolados (21/03 RJ-A, 23/03 RJ-A e 67/02 RJ-C), que foram determinados através do Vitek, como MSSA apresentando CIM de 0,5  $\mu$ g/ mL para a oxacilina e o mesmo perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos. Três (4,05%) dos 74 isolados tinham perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos semelhante aos outros 7 MRSA-GS com a diferença de que eram resistentes a gentamicina.

Os outros 64 isolados (86,48%) apresentaram-se resistentes a todos os  $\beta$ -lactâmicos testados (ampicilina, ampicilina/ sulbactam, cefazolina, oxacilina, penicilina) e à maioria dos não- $\beta$ -lactâmicos (TABELAS 2, 3 e 4).

A FIGURA 8 exibe a porcentagem de resistência dos 74 isolados frente aos antimicrobianos testados em relação a cada um dos três hospitais. Observou-se que 100% dos isolados eram resistentes aos  $\beta$ -lactâmicos AMP e PEN nos três hospitais. No Hospital RJ-B 100% dos isolados eram também resistentes aos  $\beta$ -lactâmicos SAM, CFZ, OXA. Nos hospitais RJ-A e RJ-C essa taxa foi menor e corresponde aos 3 isolados que foram identificados como MSSA pelo Vitek. No Hospital RJ-A o número de isolados exibindo resistência à maioria dos não- $\beta$ -lactâmicos (CIP, CLI, GEN, TET e SXT) foi ligeiramente maior do que nos outros dois hospitais. A rifampicina foi o que apresentou maior eficácia nos três hospitais apesar do maior número de isolados do Hospital RJ-B ter apresentado resistência a esse antimicrobiano quando comparado aos outros dois hospitais.

A FIGURA 9 compara a porcentagem de suscetibilidade aos antimicrobianos dos 10 MRSA multi-suscetíveis entre os três hospitais. O Hospital RJ-A apresentou maior número de isolados suscetíveis aos  $\beta$ -lactâmicos SAM, CFZ e OXA do que os Hospitais RJ-B e RJ-C. No Hospital RJ-B não foram detectados MRSA multi-suscetíveis com suscetibilidade para aqueles antimicrobianos (SAM, CFZ e OXA). A taxa de isolados suscetíveis aos não- $\beta$ -lactâmicos CIP, CLI, NIT, RIF, TET, SXT e VAN foi a mesma nos três hospitais (100%). O Hospital RJ-B apresentou maior número de isolados sensíveis a gentamicina quando comparados aos outros dois hospitais.

### **5.3. Teste para triagem preliminar de MRSA em ágar contendo metilina**

#### **(Met 25)**

Conforme pode ser verificado através da TABELA 7, quatro (5,40%) dos 74 isolados não cresceram em ágar contendo 25  $\mu$ g/ mL de metilina, o que indicaria que esses isolados não seriam resistentes à metilina, conforme descrito por Rezende e Figueiredo (1997). Dois dos isolados (21/03 RJ-A, 23/03 RJ-A) correspondiam àqueles identificados pelo sistema Vitek como suscetíveis à oxacilina, e os outros dois (18/02 RJ-A e 24/03 RJ-A) tinham sido identificados através do sistema automatizado como resistentes à oxacilina.

#### **5.4. Reação em cadeia da polimerase**

As ampliações dos genes *mecA* e *qacA/B* de alguns isolados estão ilustrados nas FIGURAS 10 e 11.

A presença do gene *mecA* foi detectada em 100% dos isolados, confirmando que se tratavam de 74 isolados de MRSA (TABELA 7), apesar de 4,05% (21/03 RJ-A, 23/03 RJ-A, 67/02 RJ-C) terem sido caracterizadas como suscetíveis – MSSA – através do sistema Vitek (TABELA 6).

Pela PCR verificou-se também a presença do gene *qacA/B* que é um dos responsáveis por conferir resistência aos compostos quaternários de amônio. O gene *qacA/B* foi detectado em 59 (79,73%) dos 74 isolados (TABELA 7). A taxa de *qacA/B* encontrada em cada hospital foi: 100% (33 isolados) no Hospital RJ-A, 100% (15 isolados) no Hospital RJ-C e 42,31% (11 dos 26 isolados) no Hospital RJ-B. Dois isolados de MRSA multi-suscetível (51/03 RJ-B e 57/03 RJ-B) não apresentaram o gene *qacA/B*. O tamanho dos produtos da PCR dos genes *mecA* e *qacA/B* corresponderam ao tamanho informado anteriormente (TABELA 1).

A pesquisa do gene *smr* foi realizada e a amplificação não resultou em bandas inespecíficas, tampouco verificamos qualquer banda no tamanho esperado. Não podemos afirmar ainda que o gene *smr* não foi encontrado, pois estamos em fase de aquisição do microrganismo que será utilizado como controle positivo.

#### **5.5. Seqüenciamento e análise**

As seqüências de nucleotídeos obtidas de 8 produtos de amplificação do gene *qacA/B* foi alinhada com a seqüência de nucleotídeos disponível no GenBank e verificou-se que havia homologia de 99%, confirmando que a maioria dos isolados de MRSA deste estudo carregam o gene *qacA/B*

#### **5.6. Eletroforese de pulsos elétricos alternados (PFGE)**

De acordo com os critérios de Tenover et al (1995) identificou-se inicialmente o perfil com maior número de isolados, o que presumidamente representaria um surto, o qual foi denominado A. Foram então analisadas as diferenças no número de bandas em relação à cepa-surto. Assim, os perfis com diferenças de 2 a 3 bandas e de 4 a 6 bandas foram consideradas como sub-tipos da cepa-surto e denominadas com a letra A seguida de números arábicos (ex. A1, A2). Aqueles que apresentaram

7 ou mais bandas de diferença foram denominados seqüencialmente com as outras letras do alfabeto.

A análise do perfil de fragmentação do DNA através do PFGE dos 74 isolados deste estudo pode ser observada através da FIGURA 12. Foi observado que os 74 isolados estavam distribuídos entre 11 diferentes perfis, e a maioria dos isolados (42), o que corresponde a 56,76% exibiu pouca variação no perfil de PFGE e foram denominados como clone A e sub-tipos A1, A2 e A3. Fazendo parte do clone A foram encontrados somente os isolados dos hospitais RJ-A e RJ-B, coletados tanto no ano de 2002 como de 2003.

O clone do sub-tipo A3, além dos isolados dos hospitais RJ-A e RJ-C, apresentou também 1 isolado do hospital RJ-B (58/03 RJ-B). O sub-tipo A1 estava restrito ao hospital RJ-A.

Quanto aos 10 isolados multi-suscetíveis, considerados como Novos MRSA, apresentaram variados perfis genéticos e pertenciam a 6 diferentes clones (clone A – sub-tipos A2, A10; clones E, F, G, J e K – isolados 67/02 RJ-C, 24/03 RJ-A, 21/03 RJ-A, 39/02 RJ-B, 23/03 RJ-A, 57/03 RJ-B, 51/03 RJ-B, 55/03 RJ-B, 62/02 RJ-C e 64/02 RJ-C, respectivamente (FIGURA 13).

Os representantes de cada clone estão ilustrados nas FIGURAS 14 e 15.

### **5.7. Verificação da qualidade do desinfetante**

O desinfetante utilizado na diluição recomendada pelo fabricante (2000 ppm) foi capaz de destruir os três microrganismos de referência – *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Salmonella choleraesuis* ATCC 10208 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 – o que na análise de rotina, para avaliar a eficácia do produto teria como resultado microbiológico, um laudo satisfatório atestando a atividade antimicrobiana do produto comercializado.

### **5.8. Suscetibilidade ao desinfetante**

Após certificar-se da qualidade em relação a atividade antimicrobiana do desinfetante utilizando os três microrganismos de referência, o mesmo método foi utilizado para avaliar a suscetibilidade dos 09 isolados de MRSA, os quais foram destruídos tanto na diluição de 2000 ppm como na de 1600 ppm.

### **5.9. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do desinfetante**

A CIM para os representantes do clone A foi de 0,9 ppm para o isolado 47/02 RJ-B, e de 1,0 ppm para o 01/02 RJ-A e o 54/03 RJ-B. Os isolados do sub-tipo A3 apresentaram CIM de 0,9 ppm para o 58/03 RJ-B, e de 1,0 ppm para os isolados 66/02 RJ-C e 28/03 RJ-A. No caso dos MRSA multi-suscetíveis a CIM foi de 0,7 ppm para o isolado 24/03 RJ-A e de 1,0 ppm para os isolados 23/03 RJ-A e 57/03 RJ-B.

Portanto, a CIM correspondeu a uma concentração pelo menos 2000 vezes menor quando se considera o CIM de 1,0 ppm, do que a concentração do desinfetante recomendada pelo fabricante, e 1600 vezes menor do que a concentração por nós escolhida no caso de ocorrer um erro no preparo do produto na prática para a desinfecção.

TABELA 1 - Sequências dos oligonucleotídeos (*primers*) usados para as ampliações dos genes *mecA* and *qacA/B* em *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina

Gene	Primer	Sequências dos oligonucleotídeos (5' - 3')	Localização no gene	Produto de PCR tamanho (bp)	Referências
<i>mecA</i>	mecA-R	ACTGCTATCCACCCTCAAAC	1182-1201	163	Mehrotra <i>et al.</i> 2000
	mecA-F	CTGGTGAAGTTGTAATCTGG	1325-1344		
<i>qacA/B</i>	qacA/B-R	CTATGGCAATAGGAGATATGGTGT	1802-1825	417	Mayer <i>et al.</i> 2001
	qacA/B-F	CCACTACAGATTCTTCAGCTACATG	2193-2217		
<i>smr</i>	smr-R	AAACAATGCAACACCTACCACT	1658-1679	157	Mayer <i>et al.</i> 2001
	smr-F	AACGAAACTACGCCGACTATG	1794-1814		

TABELA 2 - Suscetibilidade aos antimicrobianos dos isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina do Hospital RJ-A

Isolados clínicos	ANTIMICROBIANOS													
	AMP	SAM	CFZ	CIP	CLI	ERY	GEN	NIT	OXA	PEN	RIF	TET	SXT	VAN
01/ 02 RJ-A	r	r	r	r	r	r	r	S	r	r	r	r	r	S
02/ 02 RJ-A	r	r	r	r	r	r	r	S	r	r	r	r	r	S
03/ 02 RJ-A	r	r	r	r	r	r	r	S	r	r	l	r	r	S
04/ 02 RJ-A	r	r	r	r	r	r	r	S	r	r	S	r	r	S
05/ 02 RJ-A	r	r	r	r	r	r	r	S	r	r	l	r	r	S
06/ 02 RJ-A	r	r	r	r	r	r	r	S	r	r	l	r	r	S
07/ 02 RJ-A	r	r	r	r	r	r	r	S	r	r	r	r	r	S
08/ 02 RJ-A	r	r	r	r	r	r	r	S	r	r	l	r	r	S
09/ 02 RJ-A	r	r	r	r	r	r	r	S	r	r	r	r	r	S
10/ 02 RJ-A	r	r	r	r	r	r	r	S	r	r	S	r	r	S
11/ 02 RJ-A	r	r	r	r	r	r	r	S	r	r	l	r	r	S
12/ 03 RJ-A	r	r	r	r	r	r	r	S	r	r	S	r	r	S
13/ 03 RJ-A	r	r	r	r	r	r	S	S	r	r	r	S	S	S
14/ 03 RJ-A	r	r	r	r	r	r	r	S	r	r	S	r	r	S
15/ 03 RJ-A	r	r	r	r	r	r	r	S	r	r	l	r	r	S
16/ 03 RJ-A	r	r	r	r	r	r	r	S	r	r	S	r	r	S
17/ 03 RJ-A	r	r	r	r	r	r	r	S	r	r	l	r	r	S
18/ 02 RJ-A	r	r	r	r	r	r	r	S	r	r	l	r	r	S
19/ 03 RJ-A	r	r	r	S	S	r	r	S	r	r	r	r	r	S
20/ 03 RJ-A	r	r	r	r	r	r	r	S	r	r	r	r	r	S
21/ 03 RJ-A	r	S	S	S	S	S	S	S	S	r	S	S	S	S
22/ 03 RJ-A	r	r	r	r	r	r	r	S	r	r	S	r	r	S
23/ 03 RJ-A	r	S	S	S	S	S	S	S	S	r	S	S	S	S
24/ 03 RJ-A	r	r	r	S	S	S	r	S	r	r	S	S	S	S
25/ 03 RJ-A	r	r	r	r	r	r	r	S	r	r	S	r	r	S
26/ 03 RJ-A	r	r	r	r	r	r	r	S	r	r	l	r	r	S
27/ 03 RJ-A	r	r	r	r	r	r	r	S	r	r	S	r	r	S
28/ 03 RJ-A	r	r	r	r	r	r	r	S	r	r	l	r	r	S
29/ 03 RJ-A	r	r	r	r	r	r	r	S	r	r	S	r	r	S
30/ 03 RJ-A	r	r	r	r	r	r	r	S	r	r	S	r	r	S
31/ 03 RJ-A	r	r	r	r	r	r	r	S	r	r	S	r	r	S
32/ 03 RJ-A	r	r	r	r	r	r	r	S	r	r	S	r	r	S
33/ 03 RJ-A	r	r	r	r	r	r	r	S	r	r	r	r	r	S

AMP-ampicilina, SAM-ampicilina/sulbactam, CFZ-cefazolina, CIP-ciprofloxacina, CLI-clindamicina, ERY-eritromicina, GEN-gentamicina, NIT-nitrofurantoina, OXA-oxacilina, PEN-penicilina-G, RIF-rifampicina, TET-tetraciclina, SXT- trimetoprim/ sulfa, VAN-vancomicina.

S - suscetível, r - resistente, l - intermediariamente resistente

TABELA 3 - Suscetibilidade aos antimicrobianos dos isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina do Hospital RJ-B

Isolados clínicos	ANTIMICROBIANOS													
	AMP	SAM	CFZ	CIP	CLI	ERY	GEN	NIT	OXA	PEN	RIF	TET	SXT	VAN
34/ 02 RJ-B	r	r	r	r	r	r	r	S	r	r	S	l	r	S
35/ 02 RJ-B	r	r	r	r	r	r	r	S	r	r	l	r	r	S
36/ 02 RJ-B	r	r	r	r	r	r	r	S	r	r	r	r	r	S
37/ 02 RJ-B	r	r	r	r	r	r	r	S	r	r	r	r	r	S
38/ 02 RJ-B	r	r	r	r	r	r	r	S	r	r	l	r	r	S
39/ 02 RJ-B	r	r	r	S	S	r	S	S	r	r	S	S	S	S
40/ 02 RJ-B	r	r	r	r	r	r	r	S	r	r	S	r	r	S
41/ 02 RJ-B	r	r	r	r	r	r	r	S	r	r	S	r	r	S
42/ 02 RJ-B	r	r	r	r	r	r	r	S	r	r	r	r	r	S
43/ 02 RJ-B	r	r	r	r	r	r	r	S	r	r	l	r	r	S
44/ 02 RJ-B	r	r	r	r	r	r	r	S	r	r	r	r	r	S
45/ 02 RJ-B	r	r	r	r	r	r	r	S	r	r	r	r	r	S
46/ 02 RJ-B	r	r	r	r	r	r	r	S	r	r	r	r	r	S
47/ 02 RJ-B	r	r	r	r	r	r	r	S	r	r	r	r	r	S
48/ 02 RJ-B	r	r	r	r	r	r	r	S	r	r	r	r	r	S
49/ 02 RJ-B	r	r	r	r	r	r	r	S	r	r	r	r	r	S
50/ 03 RJ-B	r	r	r	r	r	r	r	S	r	r	r	r	r	S
51/ 03 RJ-B	r	r	r	S	S	r	S	S	r	r	S	S	S	S
52/ 03 RJ-B	r	r	r	l	S	r	r	S	r	r	r	l	r	S
53/ 03 RJ-B	r	r	r	r	r	r	r	S	r	r	S	r	r	S
54/ 03 RJ-B	r	r	r	r	r	r	r	S	r	r	r	r	r	S
55/ 03 RJ-B	r	r	r	S	S	S	S	S	r	r	S	S	S	S
56/ 03 RJ-B	r	r	r	r	r	r	r	S	r	r	r	r	r	S
57/ 03 RJ-B	r	r	r	S	S	S	S	S	r	r	S	S	S	S
58/ 03 RJ-B	r	r	r	r	r	r	r	S	r	r	l	r	r	S
59/ 03 RJ-B	r	r	r	r	r	r	r	S	r	r	S	r	r	S

AMP-ampicilina, SAM-ampicilina/sulbactam, CFZ-cefazolina, CIP-ciprofloxacina, CLI-clindamicina, ERY-eritromicina, GEN-gentamicina, NIT-nitrofurantoina, OXA-oxacilina, PEN-penicilina-G, RIF-rifampicina, TET-tetraciclina, SXT- trimetoprim/ sulfa, VAN-vancomicina.  
S - suscetível, r - resistente, l - intermediariamente resistente

TABELA 4 - Suscetibilidade aos antimicrobianos dos isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina do Hospital RJ-C

Isolados clínicos	ANTIMICROBIANOS													
	AMP	SAM	CFZ	CIP	CLI	ERY	GEN	NIT	OXA	PEN	RIF	TET	SXT	VAN
60/ 02 RJ-C	r	r	r	r	r	r	r	S	r	r	r	r	r	S
61/ 02 RJ-C	r	r	r	r	r	r	r	S	r	r	S	r	r	S
62/ 02 RJ-C	r	r	r	S	S	r	r	S	r	r	S	S	S	S
63/ 02 RJ-C	r	r	r	r	r	r	r	S	r	r	S	r	r	S
64/ 02 RJ-C	r	r	r	S	S	r	r	S	r	r	S	S	S	S
65/ 02 RJ-C	r	r	r	r	r	r	r	S	r	r	r	r	r	S
66/ 02 RJ-C	r	r	r	r	r	r	r	S	r	r	l	r	r	S
67/ 02 RJ-C	r	S	S	S	S	S	S	S	S	r	S	S	S	S
68/ 02 RJ-C	r	r	r	r	r	r	r	S	r	r	S	r	r	S
69/ 02 RJ-C	r	r	r	r	r	r	r	S	r	r	S	r	r	S
70/ 02 RJ-C	r	r	r	r	r	r	r	S	r	r	l	r	r	S
71/ 02 RJ-C	r	r	r	r	r	r	r	S	r	r	r	r	r	S
72/ 02 RJ-C	r	r	r	r	r	r	r	S	r	r	l	r	r	S
73/ 02 RJ-C	r	r	r	r	r	r	r	S	r	r	l	r	r	S
74/ 02 RJ-C	r	r	r	r	r	r	S	S	r	r	r	S	S	S

AMP-ampicilina, SAM-ampicilina/sulbactam, CFZ-cefazolina, CIP-ciprofloxacina, CLI-clindamicina, ERY-eritromicina, GEN-gentamicina, NIT-nitrofurantoina, OXA-oxacilina, PEN-penicilina-G, RIF-rifampicina, TET-tetraciclina, SXT- trimetoprim/ sulfa, VAN-vancomicina.  
S - suscetível, r - resistente, l - intermediariamente resistente

TABELA 5 - Perfil de resistência aos antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina exibindo o total de isolados resistentes

Antimicrobianos	MRSA Total 74 (100%)
Ampicilina	74 (100%)
Ampicilina/ sulbactam	71 (95,95%)
Cefazolina	71 (95,95%)
Ciprofloxacina	63 (85,13%)
Clindamicina	62 (83,78%)
Eritromicina	68 (91,89%)
Gentamicina	65 (87,84%)
Nitrofurantoina	0 (0,00%)
Oxacilina	71 (95,95%)
Penicilina G	74 (100%)
Rifampicina	43 (58,11%)
Tetraciclina	62 (83,78%)
Trimetoprim	62 (83,78%)
Vancomicina	0 (0,00%)

MRSA – *S. aureus* resistentes a metilina

TABELA 6 - Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos dos 10 isolados de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina multi-suscetíveis aos antimicrobianos não  $\beta$ -lactâmicos

Isolados clínicos	ANTIMICROBIANOS													
	AMP	SAM	CFZ	CIP	CLI	ERY	GEN	NIT	OXA	PEN	RIF	TET	SXT	VAN
21/03 RJ-A	r	S	S	S	S	S	S	S	S	r	S	S	S	S
23/03 RJ-A	r	S	S	S	S	S	S	S	S	r	S	S	S	S
24/03 RJ-A	r	r	r	S	S	S	r	S	r	r	S	S	S	S
39/02 RJ-B	r	r	r	S	S	r	S	S	r	r	S	S	S	S
51/03 RJ-B	r	r	r	S	S	r	S	S	r	r	S	S	S	S
55/03 RJ-B	r	r	r	S	S	S	S	S	r	r	S	S	S	S
57/03 RJ-B	r	r	r	S	S	S	S	S	r	r	S	S	S	S
62/02 RJ-C	r	r	r	S	S	r	r	S	r	r	S	S	S	S
64/02 RJ-C	r	r	r	S	S	r	r	S	r	r	S	S	S	S
67/02 RJ-C	r	S	S	S	S	S	S	S	S	r	S	S	S	S

AMP - ampicilina; SAM – ampicilina/sulbactam; CFZf – cefazolina; CIP – ciprofloxacina;  
 CLI – clindamicina; ERY – eritromicina; GEN – gentamicina; NIT – nitrofurantoina; OXA – oxacilina;  
 PEN– penicilina G; RIF– rifampicina; TET – tetraciclina; SXT – trimetoprim; VAN - vancomicina  
 r – resistente; S – suscetível;

TABELA 7 - Resultados dos testes Met25 e pesquisa dos genes *mecA* e *qacA/B* em *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina.

Isolados clínicos	Met25	<i>mecA</i>	<i>qacA/B</i>	Isolados clínicos	Met25	<i>mecA</i>	<i>qacA/B</i>	Isolados clínicos	Met25	<i>mecA</i>	<i>qacA/B</i>
01/ 02 RJ-A	C	P	P	34/ 02 RJ-B	C	P	N	60/ 02 RJ-C	C	P	P
02/ 02 RJ-A	C	P	P	35/ 02 RJ-B	C	P	N	61/ 02 RJ-C	C	P	P
03/ 02 RJ-A	C	P	P	36/ 02 RJ-B	C	P	N	62/ 02 RJ-C	C	P	P
04/ 02 RJ-A	C	P	P	37/ 02 RJ-B	C	P	N	63/ 02 RJ-C	C	P	P
05/ 02 RJ-A	C	P	P	38/ 02 RJ-B	C	P	P	64/ 02 RJ-C	C	P	P
06/ 02 RJ-A	C	P	P	39/ 02 RJ-B	I	P	P	65/ 02 RJ-C	C	P	P
07/ 02 RJ-A	C	P	P	40/ 02 RJ-B	C	P	P	66/ 02 RJ-C	C	P	P
08/ 02 RJ-A	C	P	P	41/ 02 RJ-B	C	P	P	67/ 02 RJ-C	I	P	P
09/ 02 RJ-A	C	P	P	42/ 02 RJ-B	C	P	N	68/ 02 RJ-C	C	P	P
10/ 02 RJ-A	C	P	P	43/ 02 RJ-B	C	P	P	69/ 02 RJ-C	C	P	P
11/ 02 RJ-A	C	P	P	44/ 02 RJ-B	C	P	P	70/ 02 RJ-C	C	P	P
12/ 03 RJ-A	C	P	P	45/ 02 RJ-B	C	P	P	71/ 02 RJ-C	C	P	P
13/ 03 RJ-A	C	P	P	46/ 02 RJ-B	C	P	P	72/ 02 RJ-C	C	P	P
14/ 03 RJ-A	C	P	P	47/ 02 RJ-B	C	P	P	73/ 02 RJ-C	C	P	P
15/ 03 RJ-A	C	P	P	48/ 02 RJ-B	C	P	P	74/ 02 RJ-C	C	P	P
16/ 03 RJ-A	C	P	P	49/ 02 RJ-B	C	P	P				
17/ 03 RJ-A	C	P	P	50/ 03 RJ-B	C	P	N				
18/ 02 RJ-A	N	P	P	51/ 03 RJ-B	I	P	N				
19/ 03 RJ-A	SC	P	P	52/ 03 RJ-B	C	P	N				
20/ 03 RJ-A	C	P	P	53/ 03 RJ-B	C	P	N				
<u>21/ 03 RJ-A</u>	<u>N</u>	P	P	54/ 03 RJ-B	C	P	N				
22/ 03 RJ-A	C	P	P	55/ 03 RJ-B	I	P	N				
<u>23/ 03 RJ-A</u>	<u>N</u>	P	P	56/ 03 RJ-B	C	P	N				
24/ 03 RJ-A	N	P	P	57/ 03 RJ-B	I	P	N				
25/ 03 RJ-A	C	P	P	58/ 03 RJ-B	C	P	N				
26/ 03 RJ-A	C	P	P	59/ 03 RJ-B	C	P	N				
27/ 03 RJ-A	C	P	P								
28/ 03 RJ-A	SC	P	P								
29/ 03 RJ-A	C	P	P								
30/ 03 RJ-A	C	P	P								
31/ 03 RJ-A	C	P	P								
32/ 03 RJ-A	C	P	P								
33/ 03 RJ-A	C	P	P								

Met25 – ágar contendo 25 µg/ mL de meticilina; *mecA* – pesquisa do gene *mecA*, *qacA/B* – pesquisa do gene *qacA/B*; C – crescimento confluyente; SC – crescimento semi-confluyente; I – crescimento de colônias isoladas; P – positivo; N – negativo.

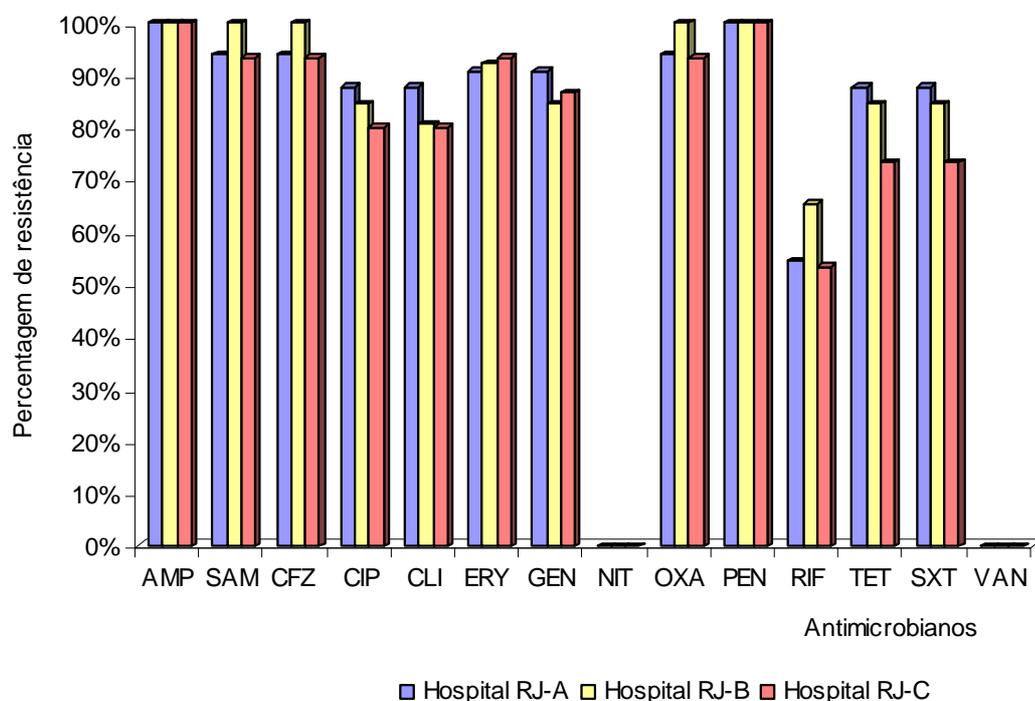


FIGURA 8 - Perfil de resistência aos antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina dos três hospitais do Rio de Janeiro.

AMP-ampicilina, SAM-ampicilina/sulbactam, CFZ-cefazolina, CIP-ciprofloxacina, CLI-clindamicina, ERY-eritromicina, GEN-gentamicina, NIT-nitrofurantoina, OXA-oxacilina, PEN-penicilina-G, RIF-rifampicina, TET-tetraciclina, SXT- trimetoprim/sulfa, VAN-vancomicina.

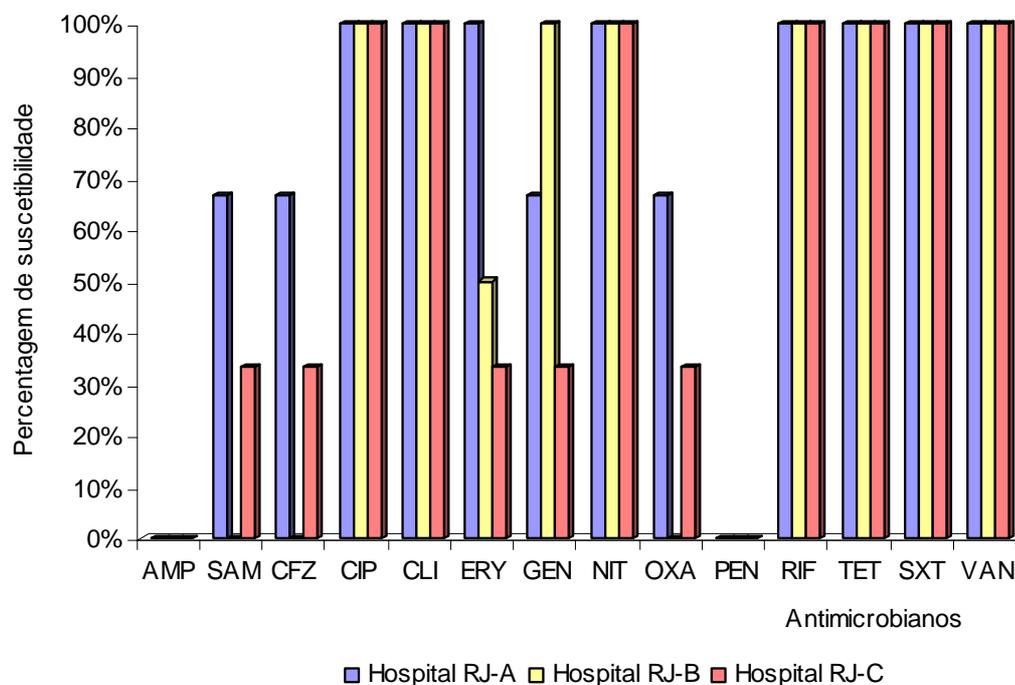


FIGURA 9 - Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos dos 10 isolados de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina e multi-suscetíveis dos três hospitais do Rio de Janeiro.

AMP-ampicilina, SAM-ampicilina/sulbactam, CFZ-cefazolina, CIP-ciprofloxacina, CLI-clindamicina, ERY-eritromicina, GEN-gentamicina, NIT-nitrofurantoina, OXA-oxacilina, PEN-penicilina-G, RIF-rifampicina, TET-tetraciclina, SXT- trimetoprim/sulfa, VAN-vancomicina.

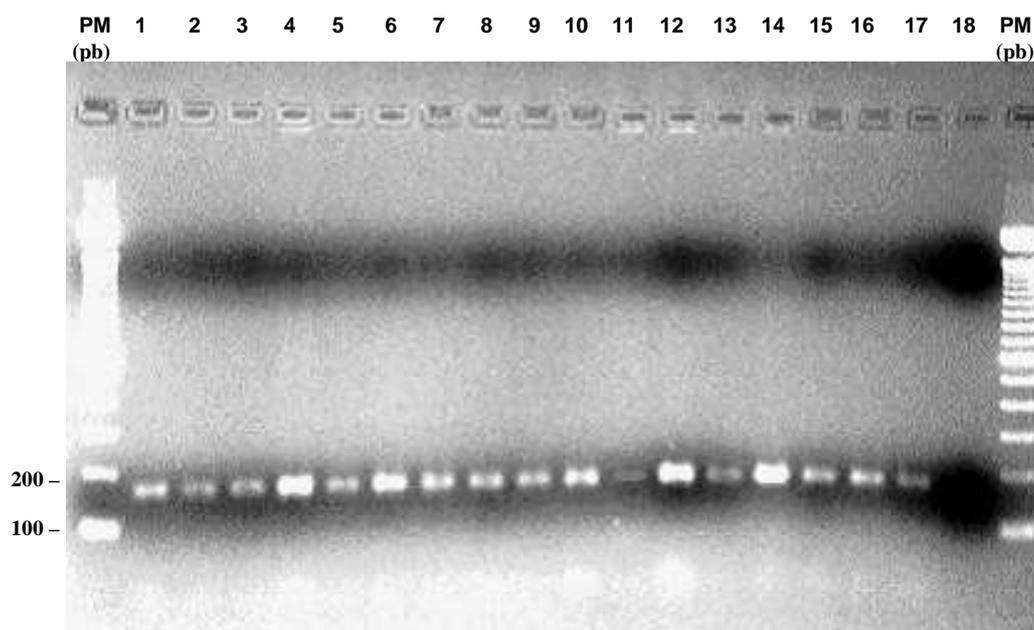


FIGURA 10 – Produto da amplificação do gene *mecA* obtida através da reação em cadeia da polimerase (PCR).

PM (pb) – peso molecular (pares de base); pistas 1 a 16: MRSA *mecA* positivo. Pista 1 – MRSA 05/02 RJ-A, pista 2 – MRSA 11/02 RJ-A, pista 3- MRSA 18/03 RJ-A, pista 4 – MRSA 21/03 RJ-A, pista 5 – MRSA 23/03 RJ-A, pista 6 – MRSA 33/03 RJ-A, pista 7 – 34/03 RJ-B, pista 8 – MRSA 38 RJ-B, pista 9 – 39/02 RJ-B, pista 10 – MRSA 58/03 RJ-B, pista 11 – MRSA 61/02 RJ-C, pista 12 – MRSA 47/02 RJ-B, pista 13 – MRSA 56/02 RJ-B, pista 14 – MRSA 60/02 RJ-C, pista 15 – MRSA 62/02 RJ-C, pista 16 – MRSA 65/02 RJ-C, pista 17 – *S. aureus* ATCC 33591 controle positivo, pista 18 – *S. aureus* ATCC 25923 controle negativo, pista 19 – PM (pb) peso molecular (pares de base).

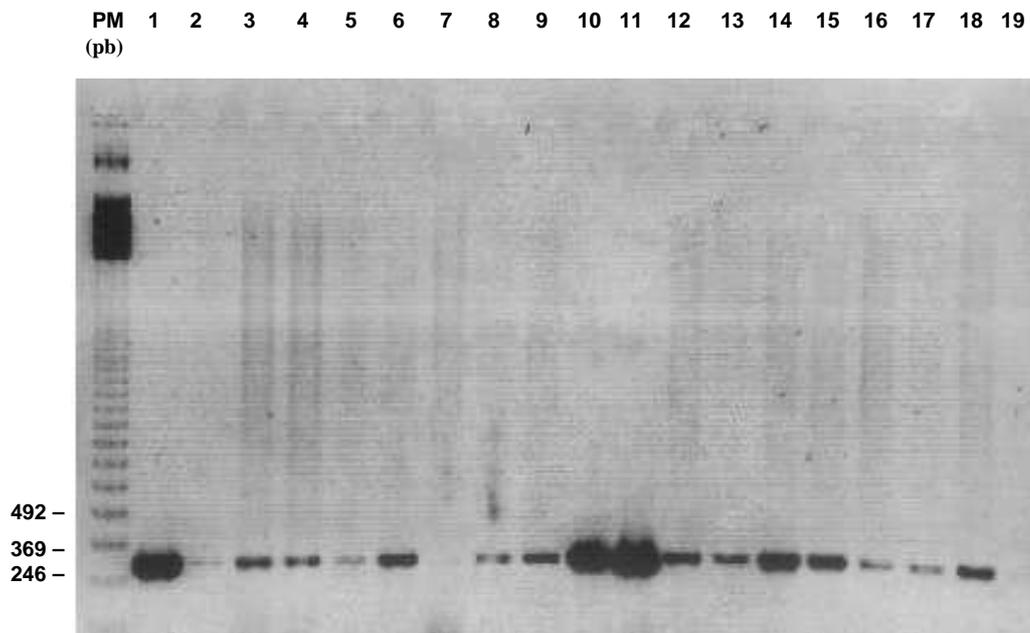


FIGURA 11 – Produto da amplificação do gene *qacA/B* obtida através da reação em cadeia da polimerase (PCR).

PM (pb) – peso molecular (pares de base); pistas 1 a 6 e pistas 8 a 18: *qacA/B* positivo; pista 7: *qacA/B* negativo. Pista 1 – MRSA 05/02 RJ-A, pista 2 – MRSA 11/02 RJ-A, pista 3- MRSA 18/03 RJ-A, pista 4 – MRSA 21/03 RJ-A, pista 5 – MRSA 23/03 RJ-A, pista 6 – MRSA 33/03 RJ-A, pista 7 – 34/03 RJ-B, pista 8 – MRSA 38 RJ-B, pista 9 – 39/02 RJ-B, pista 10 – MRSA 58/03 RJ-B, pista 11 – MRSA 61/02 RJ-C, pista 12 – MRSA 47/02 RJ-B, pista 13 – MRSA 56/02 RJ-B, pista 14 – MRSA 60/02 RJ-C, pista 15 – MRSA 62/02 RJ-C, pista 16 – MRSA 65/02 RJ-C, pista 17 – MRSA 67/02 RJ-C, pista 18 – MRSA 73/02 RJ-C, pista 19 – H<sub>2</sub>O controle negativo.

Dice (Tot 1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]  
**S. aureus**

**S. aureus**

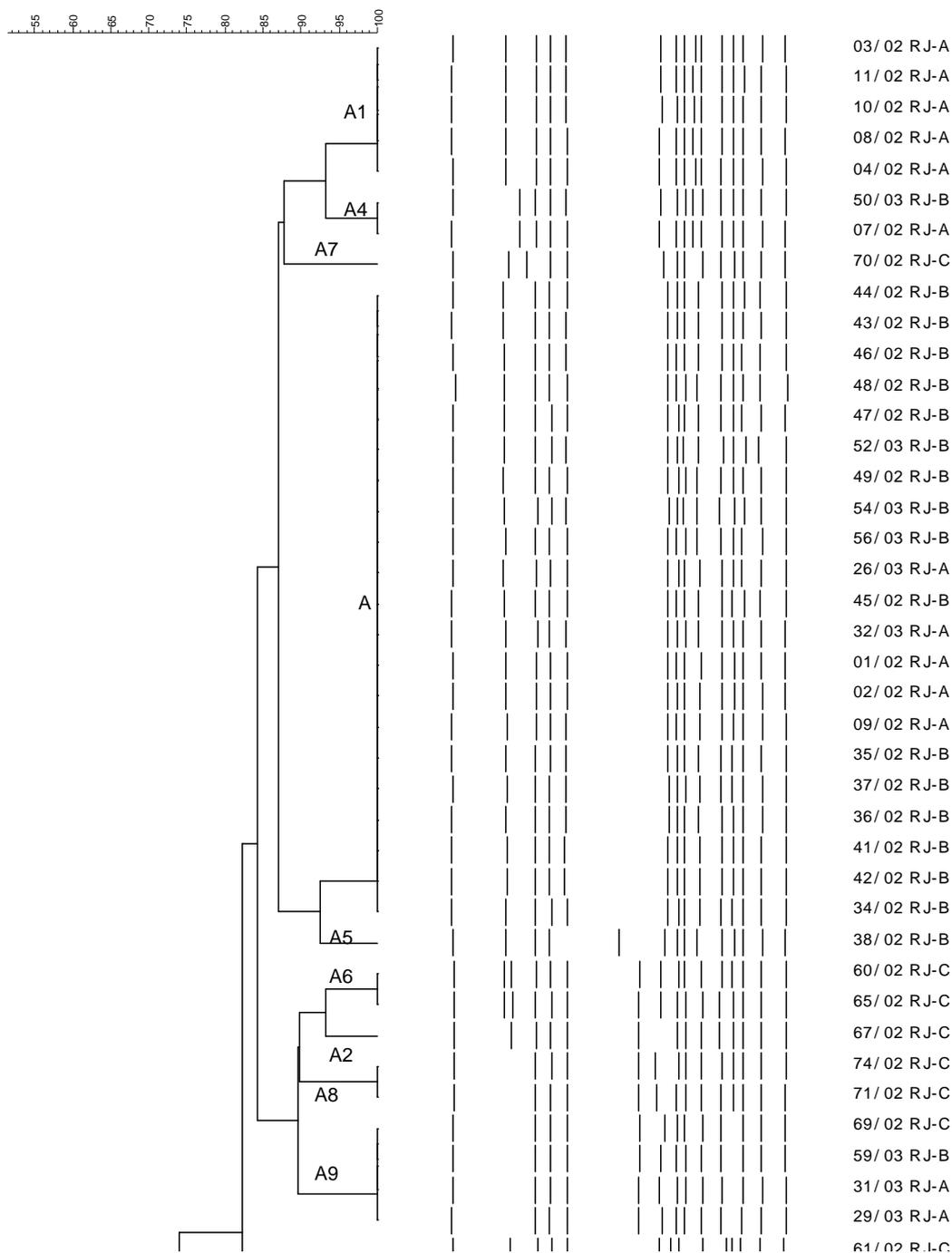


FIGURA 12 - Dendrograma dos 74 isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina

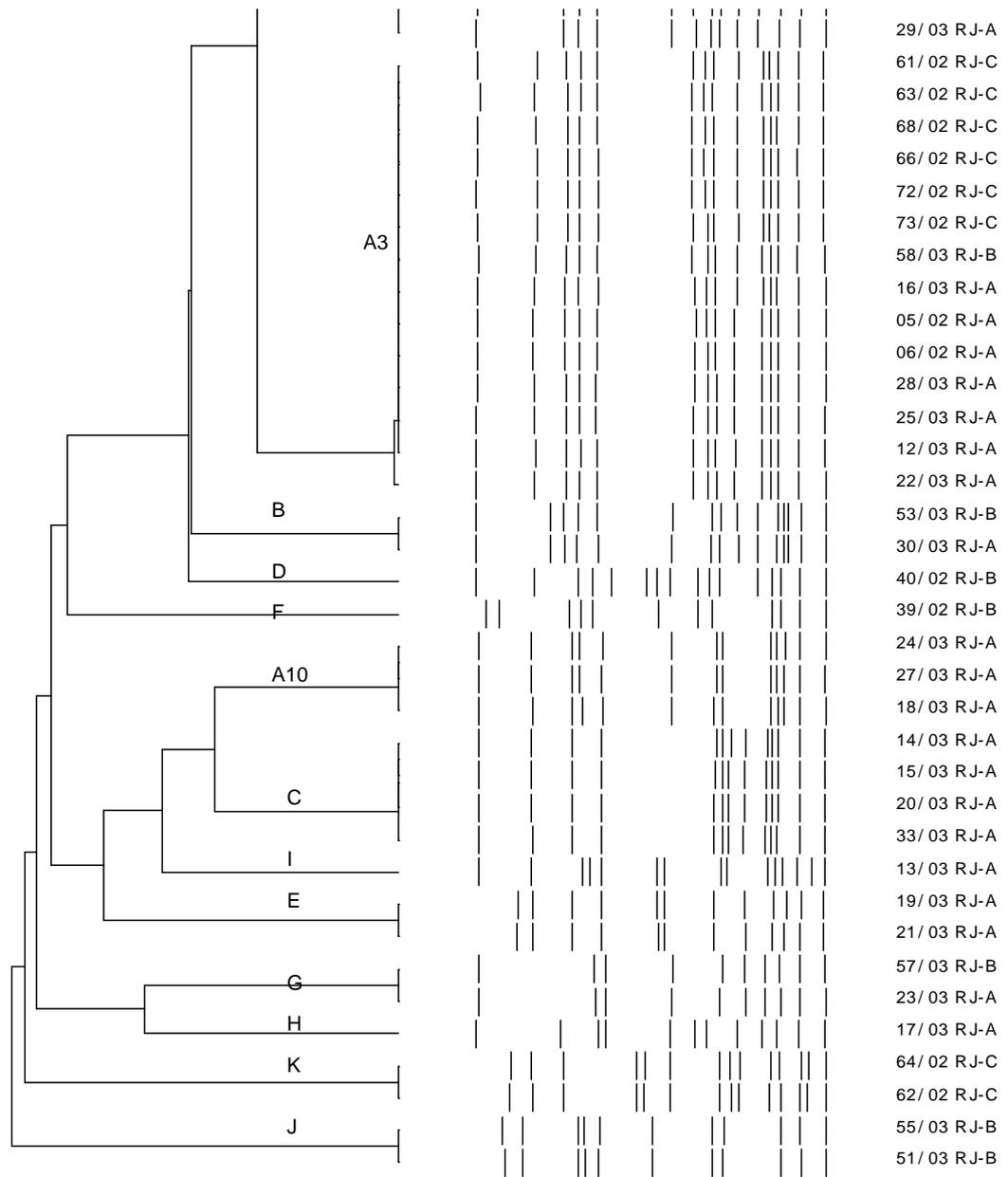


FIGURA 12 - Dendrograma dos 74 isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina (continuação)

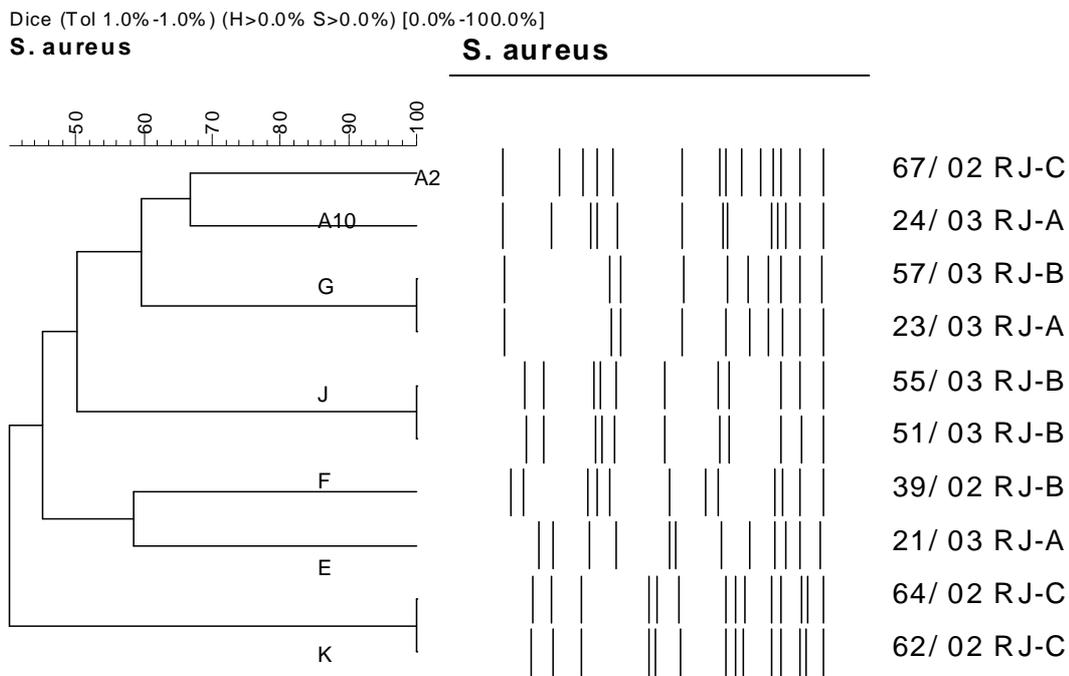


FIGURA 13 - Dendrograma dos Novos *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina multi-suscetíveis aos antimicrobianos não  $\beta$ -lactâmicos

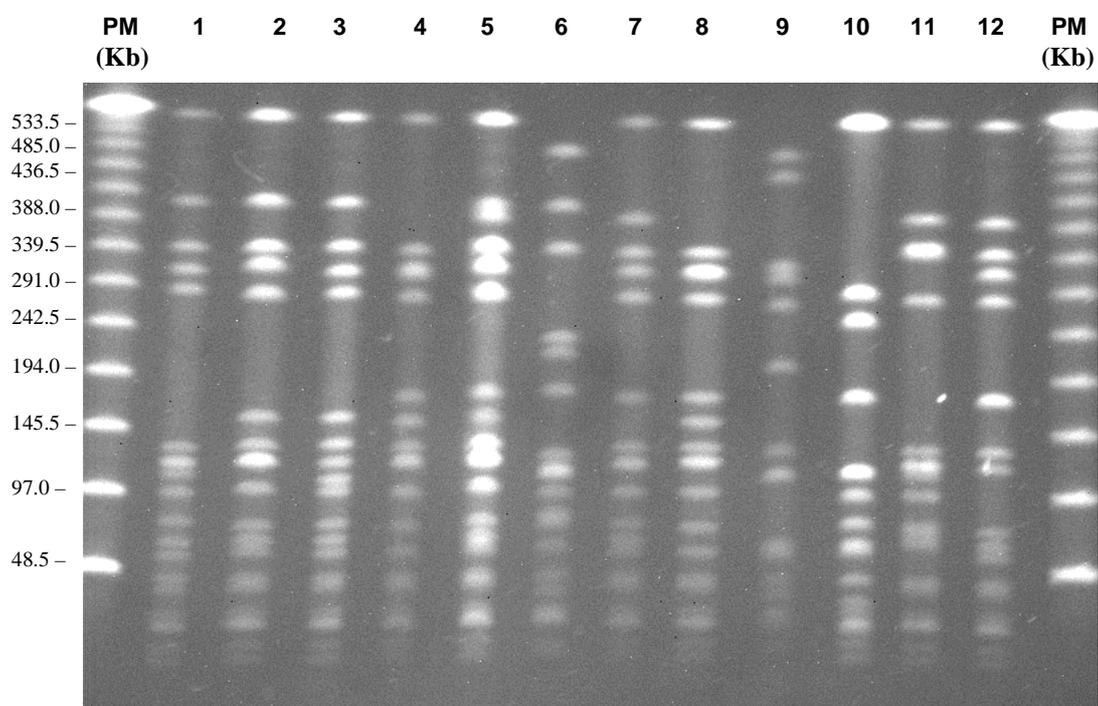


FIGURA 14 – Perfil de fragmentação do DNA dos representantes de cada clone de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina obtido através de eletroforese de campos elétricos alternados, após a digestão com a enzima *Sma*I.

PM (Kb) – peso molecular (kilobase), lambda PFGE marker (New England Biolabs); pista 1 – MRSA 02/02 RJ-A; pista 2 – MRSA 61/02 RJ-C; pista 3 – MRSA 04/02 RJ-A; pista 4 – MRSA 59/03 RJ-B; pista 5 – MRSA 60/02 RJ-C; pista 6 – MRSA 62/02 RJ-C; pista 7 – MRSA 53/03 RJ-B; pista 8 – MRSA 74/02 RJ-C; pista 9 – MRSA 51/03 RJ-B; pista 10 – MRSA 57/03 RJ-B; pista 11 – MRSA 14/03 RJ-A; pista 12 – MRSA 18/02 RJ-A.

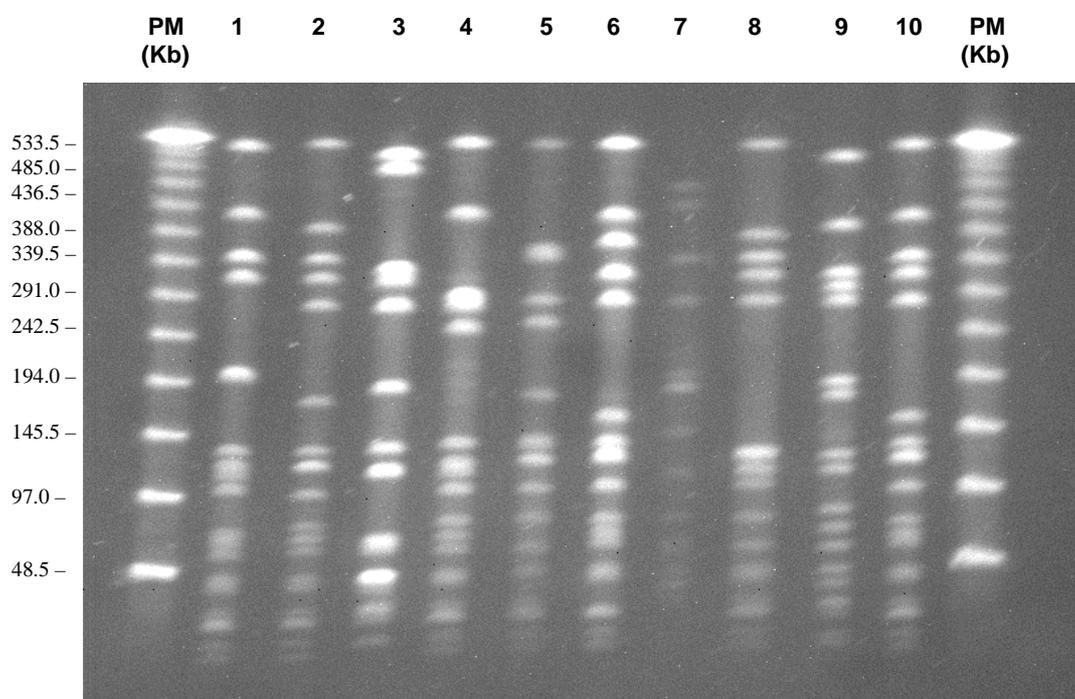


FIGURA 15 – Perfil de fragmentação do DNA dos representantes de cada clone de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina obtido através de eletroforese de campos elétricos alternados, após a digestão com a enzima *Sma*I.

PM (Kb) – peso molecular (kilobase), lambda PFGE marker (New England Biolabs); pista 1 – MRSA 38/02 RJ-B; pista 2 – MRSA 30/03 RJ-A; pista 3 – MRSA 39/02 RJ-B; pista 4 – MRSA 40/02 RJ-B; pista 5 – MRSA 17/03 RJ-A; pista 6 – MRSA 70/02 RJ-C; pista 7 – MRSA 19/03 RJ-A; pista 8 – MRSA 50/03 RJ-B; pista 9 – MRSA 13/03 RJ-A; pista 10 – MRSA 58/03 RJ-B.

## 6. DISCUSSÃO

Resistência é uma resposta natural à pressão antimicrobiana na qual ocorre a ineficácia da quimioterapia. A introdução de um grande número de agentes antimicrobianos na prática clínica gerou cepas de microrganismos que sobrevivem e se multiplicam *in vivo* na presença de altas concentrações de drogas. O *S. aureus* possui uma extensa variabilidade genômica e adquire facilmente as ferramentas para resistir aos antimicrobianos, e este é o caso do MRSA que se constitui em um dos principais patógenos de origem hospitalar causador de alta morbidade e mortalidade (MALLORQUI-FERNANDEZ et al., 2004).

Uma das estratégias de controle de infecções para prevenir a disseminação de MRSA nos hospitais consiste na identificação rápida e confiável desse microrganismo, seja causando infecções em pacientes ou colonizando pacientes e/ou a equipe de saúde.

A detecção do gene *mecA* através de técnicas moleculares como a PCR são consideradas como padrão ouro na caracterização de MRSA. Porém, poucos laboratórios têm capacidade técnica e/ou econômica para realizar esses testes, e assim métodos tradicionais de suscetibilidade antimicrobiana tais como difusão em ágar usando discos impregnados com antimicrobianos, ou diluição em meio líquido ou métodos automatizados são empregados na detecção fenotípica de MRSA.

A expressão de resistência heterogênea a meticilina é uma limitação inerente dos métodos de detecção fenotípica de MRSA (MONSEN et al., 2003). Para tentar aumentar a especificidade e a sensibilidade dos métodos fenotípicos têm sido utilizados meios de cultura especiais, diferentes inóculos e temperaturas de incubação alteradas (NCCLS, 2000; BROWN, 2001).

Em função disso, alguns métodos têm sido propostos, tais como o uso de discos contendo 30 µg de cefoxitina sobre ágar Muller-Hinton com inóculos de 10<sup>6</sup> UFC/mL (FELTEN et al., 2002), ágar suplementado com desferrioxamina (MONSEN et al., 2003), método cromogênico em placa (MERLINO et al., 2000), teste de aglutinação com latex (FELTEN et al., 2002) e o de ágar contendo 25 µg meticilina/mL (RESENDE & FIGUEIREDO, 1997), entre outros.

Para este estudo, dentre os métodos fenotípicos comumente utilizados para a caracterização de MRSA foi escolhido o sistema automatizado Vitek, que é bastante utilizado em vários laboratórios clínicos, para determinar a suscetibilidade de *S.*

*aureus* resistentes a metilicina/ oxacilina. Os resultados obtidos neste trabalho, através do sistema Vitek usando o cartão GPS 105, indicaram que 95,95% dos isolados de MRSA analisados eram MRSA e 4,05% (21/03 RJ-A, 23/03 RJ-A, 67/02 RJ-C) foram detectados erradamente como suscetíveis (MSSA), apresentando CIM de 0,5 µg/ mL para a oxacilina.

O fenótipo de heterogeneidade e as mudanças freqüentes do “software” e diferentes cartões disponíveis para o sistema automatizado Vitek tornam difíceis as comparações entre os dados obtidos nos diversos trabalhos científicos publicados. Por exemplo, Skulnick et al. (1992) comparando os resultados obtidos através de microdiluição em meio líquido e sonda para o gene *mecA* com os obtidos através do Vitek usando cartão GPS-AS, relataram o resultado de falso negativo em 14,2% dos isolados na detecção de MRSA. Em contrapartida, mesmo utilizando o cartão GPS-SA, Knapp et al. (1994) examinando 67 isolados de MRSA encontraram concordância com os resultados de *mecA*. Frebourg et al. (1998) avaliaram que o sistema Vitek empregando o cartão GPS 503 foi aceitável, apesar de ter falhado em detectar 3 (4,7%) dos 67 *S. aureus mecA* positivos, os quais foram determinados como falso suscetíveis. Yamazumi et al. (2001) utilizando o cartão GPS 106 verificaram que 2% dos isolados *mecA* positivos foram caracterizados de forma errada como suscetíveis a oxacilina, mesmo assim os pesquisadores avaliaram e consideraram esse resultado confiável para a detecção de MRSA.

Os resultados do sistema Vitek obtidos com os isolados deste estudo apresentaram falhas na caracterização de MRSA, multi-resistentes ou multi-suscetíveis aos antimicrobianos, com taxas parecidas com as encontradas por Frebourg et al. (1998) e Yamazumi et al. (2001). Apesar dessa falha os resultados foram considerados confiáveis, porém enfatiza-se a necessidade urgente da melhoria na detecção de MRSA através do Vitek, já que mesmo após 4-5 anos em relação aos trabalhos realizados por aqueles pesquisadores, aliado às atualizações dos cartões e dos “softwares” desse sistema automatizado ainda continuam a ocorrer problemas na detecção de MRSA.

Nesta tese observou-se também que dos 74 isolados, 10 (13,51%) correspondiam a um tipo novo de MRSA, os quais são multi-suscetíveis aos antibióticos não β-lactâmicos. Sete (9,45%) dos 74 isolados eram suscetíveis a gentamicina e por essa razão denominados de MRSA-GS, e entre eles encontravam-se os três isolados (4,05%) que foram determinados pelo Vitek como

MSSA - 21/03 RJ-A, 23/03 RJ-A, 67/02 RJ-C – os quais apresentaram-se resistentes somente a ampicilina e a penicilina G.

O fenótipo de MRSA-GS é observado na França desde 1992 representando 3% das cepas de MRSA, e em 1998 já atingia a taxa de 58%. Essas cepas apresentavam outra característica inesperada, que é o da resistência heterogênea a oxacilina (BLANC et al., 2001), já que até 1990 nos países do oeste Europeu predominavam os MRSA multi-resistentes aos antimicrobianos apresentando resistência homogênea a oxacilina (LAURENT et al., 2001).

Um outro método fenotípico usado foi o da triagem em ágar metilina contendo 25 µg/ mL de metilina (Met 25), descrito por Resende & Figueiredo (1997). Através desse método de triagem os autores afirmam que somente os MRSA de qualquer das 4 classes podem ser determinados, já que nem o *S. aureus borderline* nem o suscetível são capazes de crescer no ágar contendo Met 25.

Neste trabalho os 74 isolados foram submetidos ao método de triagem em Met 25. Dentre os 3 MRSA caracterizados pelo Vitek como MSSA apenas 1 (1,35% - amostra 67/02 RJ-C) cresceu nesse meio com alta concentração de metilina e os outros dois não foram capazes de crescer. Uma outra amostra bacteriana (24/03 RJ-A) multi-suscetível aos antibióticos não β-lactâmicos, suscetível à gentamicina e resistente a oxacilina e por isso reconhecido como MRSA pelo Vitek não foi capaz de crescer no ágar Met 25. Entretanto a amostra, 18/02 RJ-A, com perfil de multi-resistência aos antibióticos, inclusive a oxacilina também não exibiu crescimento sobre o ágar Met 25. Contrariamente o estudo realizado por Resende & Figueiredo (1997) que através do teste utilizando ágar Met 25 conseguiu detectar todas as classes heterogêneas de MRSA, nossos resultados indicam que não foi possível demonstrar isso para as amostras aqui estudadas, o que denota que a detecção de MRSA com resistência heterogênea continua a ser um desafio para a sua caracterização nos laboratórios clínicos (FREBOURG et al., 1998), principalmente quando se trata de MRSA-GS.

A detecção do MRSA é complicada não somente em isolados suscetíveis a gentamicina mas também pelo fato da expressão da resistência à metilina ser variável e, normalmente, heterogênea. Essa heterogeneidade é uma limitação inerente para a acurácia dos resultados do teste de suscetibilidade, já que a maioria das células nas cepas heterogêneas são suscetíveis a baixas concentrações de

antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (1 a 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de metilina) com uma pequena proporção de células que crescem em concentrações de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ou mais (TOMASZ, NASCHMAN & LEAF, 1991; CHAMBERS, 1997).

Muitos artigos científicos têm sido publicados abordando sobre as conseqüências dos problemas relativos aos testes de suscetibilidade e sobre as várias recomendações, algumas conflitantes, sobre os métodos rotineiros mais confiáveis (BROWN, 2001), com o intuito de desenvolver uma técnica de detecção rápida e acurada de resistência à metilina em estafilococos. A acurácia na detecção desses microrganismos é importante não somente para proporcionar a escolha apropriada da terapia antimicrobiana como também para o controle endêmico de MRSA (SKOV et al., 2003).

A fim de dirimir dúvidas quanto aos resultados conflitantes da resistência à metilina/ oxacilina pelos dois métodos fenotípicos escolhidos, os 74 isolados foram submetidos à técnica da PCR com oligonucleotídeos específicos para *mecA* (MEHROTRA, WANG & JOHNSON, 2000) e verificou-se que esse gene foi amplificado em 100% dos isolados confirmando serem todos MRSA.

A tipificação molecular tem como objetivo definir se um determinado grupo de cepas de uma mesma espécie tem uma origem clonal, isto é, vêm de um precursor comum. Para os MRSA essa informação é necessária por várias razões, como investigar se em um surto o microrganismo causador pertence a um único clone, ou fornecer dados sobre a população de MRSA após a implementação das medidas de controle ou após a troca de antibióticos, ou ainda para deduzir sobre a evolução e disseminação global das cepas de MRSA.

O aumento da incidência de MRSA durante as últimas décadas tem sido acompanhado pelo aparecimento de clones desses microrganismos os quais tornaram-se endêmicos em muitos países. Algumas cepas de MRSA têm sido designadas como cepas epidêmicas já que estão associadas à alta prevalência e disseminação intra e inter-hospitalar, e até mesmo entre países.

Neste estudo foi utilizada a técnica de PFGE, a qual foi introduzida em 1984 e é atualmente ainda considerada como padrão ouro para tipificar as cepas de MRSA (SALMENLINNA, 2002). Utilizando os critérios de interpretação dos perfis de restrição produzidos pelo PFGE de acordo com Tenover et al. (1995) verificou-se que dentre os 74 isolados, 42 (56,76%) estavam representados dentro de um perfil clonal (A, A1, A2 e A3) de MRSA que estava mais presente. Foi observado que esse

perfil de PFGE corresponde ao clone epidêmico brasileiro detectado em amostras de MRSA isoladas de hospitais entre 1993 e 1994 (TEIXEIRA et al., 1995)

Teixeira et al. (1995) estudaram 85 isolados de MRSA provenientes das regiões Norte, Sudeste e Sul do Brasil e verificaram que 66% dos isolados que estavam presentes nessas regiões se tratavam do mesmo clone, e que foi denominado clone epidêmico brasileiro. Para uma melhor avaliação da incidência de MRSA em relação a este trabalho, verificou-se que ao se re-dimensionar o objeto de estudo de Teixeira et al. (1995) para os MRSA isolados nos hospitais do Rio de Janeiro, observou-se que dos 48 isolados, 23 pertenciam ao clone epidêmico o que representa 47,92%, valor semelhante ao encontrado nesta tese (56,76%).

É surpreendente e preocupante que após 10 anos o mesmo clone persista nos hospitais da cidade do Rio de Janeiro e, esse fato conduz a algumas ponderações. A primeira delas se refere à razão pela qual o clone epidêmico continua a sobrepujar aos outros clones já que é inegável que houve um avanço técnico-científico tais como o desenvolvimento de novos medicamentos e de técnicas cirúrgicas menos invasivas, aliado ainda a implementação do controle de infecções hospitalares com o objetivo de minimizar os problemas relativos aos microrganismos patogênicos, muitas vezes multi-resistentes aos antimicrobianos.

A segunda ponderação incide sobre os fatores de virulência do clone brasileiro que poderiam estar contando com mecanismos mais eficientes possibilitando que não somente sobrevivam como também se multipliquem, mesmo em condições adversas.

A terceira, e última ponderação, diz respeito ao local em que se encontra albergado já que os pacientes portadores desses microrganismos, em condições normais não permanecem hospitalizados por um período de 10 anos e portanto não seriam os disseminadores diretos desse clone. Esse raciocínio nos leva a conjecturar que o clone A e seus sub-tipos estejam colonizando os profissionais de saúde que atendem aos pacientes, e que muitas vezes trabalham em mais do que um hospital, e que como portadores poderiam ser uma das causas da disseminação de tais microrganismos. Além de colonizar os profissionais de saúde, essa cepa pode também estar no ambiente hospitalar, em superfícies fixas como camas, bancadas, mesas de refeição, paredes e chão, entre outros. Sendo assim, as medidas de higiene como a limpeza, a descontaminação e a desinfecção, devem também ser observadas de forma mais crítica.

Em relação aos 10 MRSA multi-suscetíveis aos antibióticos, dentre os 74 isolados, detectados neste estudo verificou-se que esses pertenciam a 6 diferentes clones (clone A, sub-tipos A2, e A10; clones E, F, G, J e K), indicando uma diversidade genética nesses isolados de Novos MRSA, contrastando com estudos realizados na França, que demonstraram a transmissão de um clone epidêmico do novo MRSA (BLANC et al., 2001). Esses MRSA mais suscetíveis aos antibióticos têm sido relatados e são comuns em hospitais da França, onde desde 1992, foi observado o surgimento de um novo fenótipo de MRSA, caracterizado pela expressão heterogênea de resistência à meticilina e suscetibilidade à vários antibióticos como gentamicina, tetraciclina, rifampicina, lincomicina (BLANC et al., 2001; LAURENT et al., 2001).

Laurent et al. (2001) utilizaram 38 cepas de MRSA-GS oriundas de diversos hospitais da França isoladas entre 1996 e 1998, que foram agrupadas de acordo com o perfil de fragmentação de DNA através de PFGE e do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos. Os pesquisadores verificaram dois perfis de PFGE principais – o grupo A1 onde se encontrava a maioria (90%) dos isolados resistentes a eritromicina e o grupo B com a maior incidência (86%) de isolados suscetíveis a eritromicina. Os autores sugeriram que existiria uma ligação entre o padrão genético e o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos.

Diferentemente do resultado encontrado por Laurent et al. (2001) não foi possível fazer qualquer correlação entre os perfis de PFGE e o de suscetibilidade à eritromicina dos isolados de MRSA-GS aqui estudados. Esses microrganismos apresentaram grande variabilidade genética sendo que 6 MRSA-GS estavam distribuídos entre 3 clones distintos: G, J e K. Verificou-se que cada clone apresentou perfis de suscetibilidade diferentes a eritromicina – no clone G os isolados 23/03 RJ-A e 57/ 03 RJ-B eram suscetíveis, no clone J os isolados 62/ 02 RJ-C e 64/ 02 RJ-C apresentaram-se resistentes, e o clone K agrupou 1 isolado suscetível (55/ 03 RJ-B) e o outro resistente (51/ 03 RJ-B) a eritromicina.

Quanto aos 3 isolados que foram caracterizados erradamente como MSSA pelo Vitek, a amostra bacteriana 67/02 RJ-C foi isolada em fevereiro/ 2002 no Hospital RJ-C e 18 meses após, em agosto/ 2003, os outros dois (21/03 RJ-A, 23/03 RJ-A) no Hospital RJ-A. Esses MRSA apresentavam em comum o mesmo perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos, sendo suscetíveis a eritromicina e resistentes somente a ampicilina e a penicilina G. Porém, pertenciam a 3 perfis distintos de

fragmentação de DNA pelo PFGE, o que indica que não são do mesmo clone e portanto não parece ter ocorrido a disseminação entre os hospitais RJ-A e RJ-C, contrariamente do que foi observado nos hospitais franceses por Blanc et al. (2001).

Blanc et al. (2001) estudaram 75 MRSA, entre os resistentes a gentamicina (MRSA-GR) e os MRSA-GS, isolados em 1990, 1995, 1996, 1997 e 1998 e selecionados aleatoriamente no Centro de Referência Nacional para Toxemia Estafilocócica de Lion, de hospitais não Universitários e do Hospital de Perpignan. Nesse estudo foi realizada a análise genética da população de MRSA através do polimorfismo de amplificação randômica de *primers* (RAPD) utilizando múltiplos oligonucleotídeos. Os pesquisadores verificaram que a maioria dos MRSA franceses pertenciam ao mesmo grupo filogenético que compreendiam tanto os MRSA-GR quanto os MRSA-GS. Segundo Blanc et al. (2001) o fato das cepas de MRSA-GS serem proximamente relacionadas sugere que sua emergência na França foi devido a disseminação de um clone específico. Além disso, os autores afirmam que o fato desse clone de MRSA-GS pertencer ao mesmo grupo filogenético originalmente compreendido somente pelas cepas de MRSA-GR sustenta fortemente a hipótese de que o MRSA-GS tenha se originado de cepas resistentes a gentamicina.

Pesquisadores como Aubry-Damon et al. (1997) e Galdbart et al. (2000) especularam que a mudança no uso de antimicrobianos nos hospitais franceses, diminuindo o uso de aminoglicosídeos, poderia ter sido responsável pela emergência e disseminação dessas cepas de MRSA-GS, porém existem algumas evidências de que a mudança no uso de gentamicina não tenha sido o único fator interferente para o surgimento de MRSA-GS, tais como: a diminuição do uso de gentamicina não foi relatada em todos os hospitais; somente a mudança na utilização de aminoglicosídeos não poderia explicar o aumento na suscetibilidade à outros antimicrobianos e o reaparecimento da resistência heterogênea a meticilina/oxacilina observado no fenótipo desses Novos MRSA; a diminuição do uso de aminoglicosídeos teria favorecido também o aparecimento de outras cepas de MRSA-GS ao invés de somente um ou dois determinados clones.

A transmissão de alguns importantes patógenos nosocomiais, incluindo MRSA (RUTALA et al., 2000) tem sido relacionada à contaminação ambiental nos hospitais e instituições de saúde. A utilização de desinfetantes e anti-sépticos é parte essencial das práticas de controle das infecções e auxilia na prevenção das infecções nosocomiais (MCDONNELL & RUSSELL, 1999).

Desinfetantes e anti-sépticos a base de compostos quaternários de amônio (QACs), como por exemplo o cloreto de benzalcônio, cloreto de cetilpiridina, cetrimida são freqüentemente utilizados em hospitais e instituições de saúde com o objetivo de prevenir a disseminação dos patógenos. Tem sido sugerido que o amplo uso dos QACs pode impor uma pressão seletiva e contribuir para a emergência de microrganismos resistentes aos desinfetantes/ anti-sépticos nesses ambientes (SIDHU et al., 2002), através dos genes *qac*.

No presente estudo foram examinadas a distribuição do gene *qacA/B* nos 74 isolados de MRSA dos 3 hospitais localizados na cidade do Rio de Janeiro isolados entre 2002 e 2003. A freqüência do gene *qacA/B* foi de 79,73%, que é muito maior do que a encontrada por Noguchi et al. (1999) e um pouco mais elevada do que a encontrada por Mayer et al. (2001). Neste trabalho observou-se que a mais baixa freqüência de *qacA/B* foi no Hospital RJ-B (42,3%) e nos outros dois hospitais esse gene foi detectado em 100% dos isolados. Noguchi et al. (1999) encontraram que 10% dos MRSA isolados no Japão no ano de 1992 apresentavam o gene *qacA/B*. Mayer et al. (2001) analisaram os MRSA isolados entre 1997 e 1999 de 24 diferentes estudos do European Sentry e encontraram uma freqüência de 63% de *qacA/B*.

Portanto o gene *qacA/B*, que confere resistência ao desinfetante/ anti-séptico, está amplamente disseminado nos 3 hospitais estudados e este é um dado importante e relevante considerando que é a primeira vez que a presença do gene *qacA/B* está sendo relatada nos MRSA isolados no Brasil.

Sessenta e quatro MRSA incluídos neste estudo são resistentes aos diferentes antimicrobianos, e 10 MRSA são multi-suscetíveis aos antimicrobianos não  $\beta$ -lactâmicos, sendo que 7 entre os 10 são amostras de MRSA-GS. O gene *qacA/B* foi detectado indistintamente entre esses isolados e não está relacionado a um determinado perfil clonal além de parecer que não está também relacionado ao perfil de resistência aos antibióticos.

Estudos têm indicado que os genes de resistência *qac* (*qacA/B* e *smr/ qacC*) são geralmente plasmidiais e estão associados a transposons contendo os genes que codificam resistência à gentamicina, trimetoprim, penicilina, kanamicina e tobramicina (SIDHU et al., 2002). A introdução de um grande número de agentes quimioterápicos na prática clínica resultou no desenvolvimento e disseminação de uma variedade de determinantes de resistência aos antibióticos entre as populações

bacterianas, e nos últimos tempos tem ocorrido também uma crescente preocupação no que diz respeito a emergência da co-resistência e da resistência cruzada entre os antibióticos e os desinfetantes que são largamente utilizados nos hospitais.

A co-resistência entre os compostos quaternários de amônio e os antimicrobianos (antibióticos) é de grande interesse, pois os produtos a base de quaternários de amônio são amplamente utilizados em estabelecimentos de saúde e de preparo de alimentos. A utilização dos compostos quaternários de amônio em hospitais pode facilitar a introdução e a disseminação de genes de resistência aos antibióticos assim como a disseminação de resistência aos antibióticos pode introduzir os genes de resistência aos quaternários de amônio (CHAPMAN, 2003).

A resistência aos desinfetantes é um tema controverso já que são usados em concentrações muito mais altas do que o valor da CIM de forma a atingir uma rápida velocidade de morte, o que impossibilita a bactéria em superar os danos de um ataque violento do desinfetante ou mesmo em desenvolver a resistência. No entanto, é provável que ocorram situações nas quais os microrganismos sejam expostos a concentrações mais baixas do desinfetante do que a dose letal, o que pode acarretar no desenvolvimento da suscetibilidade reduzida, seja através da adaptação fenotípica ou de alterações genéticas (Chapman, 2003).

A resistência aos quaternários de amônio é freqüentemente relatada em termos de valores de CIM (Chapman, 2003). O valor da CIM dos representantes de cada um dos principais grupos (A, A3 e MRSA multi-suscetíveis) variou de 0,7 a 1,0 ppm, independentemente da presença do gene *qacA/B*. Somente o *S. aureus* ATCC 6538, utilizado como referência no ensaio da suscetibilidade ao desinfetante e que não contém o gene *mecA*, apresentou o valor de 0,5 ppm para a CIM. O valor da CIM para os MRSA não parece estar relacionado com o perfil de fragmentação de DNA pelo PFGE ou com o perfil de suscetibilidade aos antibióticos ou mesmo com a presença direta do gene *qacA/B*.

O gene *qacA/B* sozinho não parece influenciar a variação nos valores da CIM entre os MRSA, já que os isolados contendo ou não o *qacA/B* não exibiram variações concretas da CIM. Porém, esse determinante aumentou os valores da CIM em MRSA quando comparados com o *S. aureus* ATCC 6538 que não apresenta esse gene.

Os mesmos representantes de MRSA foram avaliados quanto a sua suscetibilidade ao desinfetante através do método oficialmente adotado em nosso

País. Tanto na concentração recomendada pelo fabricante a qual corresponde a 2000 vezes o valor da CIM quanto na concentração 20% abaixo correspondente a 1600 vezes maior do que a CIM e verificamos que esses isolados foram destruídos pelo produto. Apesar dos representantes dos principais clones de MRSA deste estudo terem apresentado CIM 2000 vezes menor do que a diluição recomendada para a desinfecção com aquele produto, a alta prevalência do gene *qacA/B* pode ser o resultado da pressão seletiva imposta pela ampla utilização de desinfetantes a base de quaternários de amônio nos hospitais.

Na prática clínica, uma das medidas de higiene preconizadas para prevenir a disseminação de microrganismos é a descontaminação e desinfecção de quartos potencialmente contaminados, dos utensílios e dos pacientes colonizados. Conseqüentemente, é alarmante que 79,73% dos MRSA estudados carregando o gene de resistência aos desinfetantes/ anti-sépticos tenham sido isolados de amostras clínicas e que o gene *qacA/B* esteja disseminado entre esses hospitais.

Mesmo que a presença dos genes de resistência aos compostos quaternários de amônio não leve a falha da desinfecção, eles certamente aumentam a ocorrência dessa probabilidade além da atenção que deve ser dada quanto ao monitoramento da eficácia da desinfecção já que existe o risco da co-resistência entre os quaternários de amônio e os antibióticos. A presença do gene de resistência aos desinfetantes/ anti-sépticos em *S. aureus* é de especial importância, pois isso pode significar um grande potencial para a sobrevivência desses organismos no ambiente hospitalar (GILLESPIE, MAY & SKURRAY, 1986).

## 7. CONCLUSÕES

1. O sistema Vitek, utilizando o cartão GPS 105, foi capaz de caracterizar as amostras de MRSA multi-resistentes aos antibióticos.
2. Porém, esse mesmo sistema automatizado utilizando o cartão GPS 105, não foi capaz de caracterizar as amostras dos Novos MRSA que são multi-suscetíveis aos antibióticos, já que foram caracterizados como MSSA.
3. Especial atenção deve ser dada com relação às cepas de Novos MRSA (multi-suscetíveis) para que não sejam erradamente identificadas como MSSA, o que reforça a necessidade de aperfeiçoar o sistema Vitek e/ ou de realizar estudos para o desenvolvimento de metodologia rápida e acurada para a caracterização dos MRSA.
4. Os resultados obtidos com os isolados utilizados neste estudo através do método de triagem com ágar Met 25 contradizem os resultados do trabalho realizado por Resende & Figueiredo (1987) pois 4 isolados de MRSA, entre multi-suscetíveis e multi-resistentes, não cresceram nesse meio com alta concentração de antibiótico.
5. A PCR foi a técnica mais confiável na caracterização de MRSA, pois detectou o gene *mecA* em todas as amostras analisadas, inclusive daquelas que foram identificadas erroneamente como MSSA através dos métodos fenotípicos.
6. Os Novos MRSA têm perfis de macro-restrição distintos, pertencendo a 6 diferentes clones, o que indica grande diversidade genética.
7. Pode ter ocorrido a disseminação de MRSA entre os Hospitais RJ-A, RJ-B e RJ-C já que o clone mais presente (A, e os sub-tipos A1 e A2) foi encontrado nesses hospitais em 2002 e em 2003.
8. Os valores das CIMs variaram entre 0,7 ppm e 1,0 ppm para os representantes dos 2 clones mais presentes e do grupo de MRSA multisuscetíveis
9. As CIMs não parecem estar relacionadas com o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos e com o perfil de fragmentação de DNA por PFGE.
10. As variações nos valores das CIMs não parecem estar correlacionadas somente com a presença do gene *qacA/B* entre os MRSA já que os isolados

contendo ou não esse determinante não exibiram variações concretas da CIM.

11. Entretanto o gene *qacA/B* aumentou os valores da CIM em MRSA quando comparadas com o *S. aureus* ATCC 6538 que não apresenta esse gene.
12. Os MRSA apresentaram-se suscetíveis ao desinfetante a base de cloreto de benzalcônio tanto na concentração recomendada pelo fabricante, que correspondia a 2000 vezes o valor da CMI quanto na concentração 20% abaixo, ou seja 1600 vezes o valor da CMI.
13. A alta prevalência do gene *qacA/B* em isolados de MRSA do Brasil pode ser devido ao pressão seletiva imposta pela ampla utilização dos produtos a base de quaternários de amônio em hospitais e em estabelecimentos de preparo de alimentos.
14. O gene *qacA/B* está amplamente disseminado entre os MRSA (79,73%) analisados, o que é alarmante pois a presença desse gene de resistência aos desinfetantes e anti-sépticos pode conferir a esses microrganismos um significativo potencial para sobreviver no ambiente hospitalar.
15. A presença do gene *qacA/B* não parece estar relacionado com um determinado perfil de suscetibilidade aos antibióticos e tampouco com um determinado perfil clonal.

## 8. REFERÊNCIAS

AKIMITSU, N.; HAMAMOTO, H.; INOUE, R.; SHOJI, M.; AKAMINE, A.; TAKEMORI, K.; HAMASAKI, N.; SEKIMIZU, K. Decrease in resistance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to  $\beta$ -lactams caused by mutations conferring resistance to benzalkonium chloride, a disinfectant widely used in hospitals. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 43, p. 3042-3043, 1999.

ALQURASHI, A.M., DAY, M.J. AND RUSSEL, A.D. Susceptibility of some strains of enterococci and staphylococci to antibiotics and biocides. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 38, p. 279-290, 1996.

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

ANDERSON, R.L.; CARR, J.H.; BOND, W.W. et al. Susceptibility of vancomycin-resistant enterococci to environmental disinfectants. **Infect. Control. Hosp. Epidemiol.**, v. 18, p.195-199, 1997.

ARCHER, G.L.; PENNELL, E. Detection of methicillin resistance in staphylococci by using a DNA probe. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 34, p.1720-1724, 1990.

ARCHER, G.L.; THANASSI, J.A.; NIEMEYER, D.M.; PUCCI, M.J. Characterization of IS1272, an insertion sequence-like element from *Staphylococcus haemolyticus*. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v. 40, p. 924-929, 1996.

AUBRY-DAMON, H; LEGRAND, P.; BRUN-BUISSON, C.; ASTIER, A.; SOUSSY, C-J.; LECLERCQ, R. Reemergence of gentamicin-susceptible strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: roles of an infection control program and changes in aminoglycoside use. **Clin. Infect. Dis.**, v. 25, p. 647-653, 1997.

ATLAS, R.M. **Control of microbial growth**. In: Wm. C. Brown Publishers. Principles of microbiology. 2 ed. Iowa, 1997. p. 455-460.

BELOIAN, A. Disinfectants. In: Association of Official Analytical Chemists (AOAC). OFFICIAL methods of analysis. 15. ed. Arlington: Cap. 6, 1990.

BERGER-BÄCHI, B. Genetic basis of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 56, p. 764-770, 1999. Disponível em: <http://www.springerlink.com/media/253x5250daqxxvd0b5b0/contributionS/E/0/8/B/E08BVBEVB6wQDYT.pdf>. Acesso em: 05 abr. 2004.

BERGER-BÄCHI, B.; STRÄSSLE, A.; GUSTAFSON, J.E.; KAYSER, F.H. Mapping and characterization of multiple chromosomal factors involved in methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 36, p. 1367-1373, 1992.

BLANC, D.S.; GRANCIOLI, P.; LE COUSTOMIER, A.; GAZAGNE, L.; LECAILLON, E.; GUEUDET, P.; VANDENESCH, F.; ETIENNE, J. Reemergence of gentamicin-susceptible strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in France: a phylogenetic approach. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, p. 2287-2290, 2001.

BLOCK, S.S. Definition of terms. In: Disinfection, sterilization, and preservation. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Williams (ed), 2001. p. 19.

BRADLEY, C.R.; FRAISE., A.P. Heat and Chemical resistance in enterococci. **J. Hosp. Infect.**, v. 34, p.191-196, 1996.

BROWN, D.F.J. Detection of methicillin/ oxacillin resistance in staphylococci. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 48, suppl. S1, p. 65-70, 2001.

BRASIL. Decreto nº 79094 de 5 de Janeiro de 1977. Regulamenta a Lei nº 6360 de 23 de setembro de 1976. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, p. 114-141, 5 set. 1977.

BRASIL. Lei nº 6360 de 23 de setembro de 1976. Dispões sobre a vigilância a que ficam submetidos os medicamentos, as drogas, os insumo farmacêuticos e

correlatos, cosméticos, saneantes e outros produtos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, p. 90-102, 24 set. 1976.

BRASIL. Lei nº 6437 de 20 de agosto de 1977. Configura as infrações à legislação sanitária federal, estabelece as sanções respectivas. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, p. 193-200, 5 set. 1977.

BRASIL. Lei nº 9782 de 26 de janeiro de 1999. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária e cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, configura infrações à legislação sanitária federal e estabelece as sanções respectivas. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, p. 1-6, 27 jan. 1999.

BRASIL. Portaria nº 15 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 anexas à presente. Estabelecer o prazo até as respectivas revalidações dos registros para que os produtos aqui abrangidos e anteriormente registrados se adequem ao novo regulamento. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, p.17041-3, 5 set. 1988, Seção I.

BRASIL. LEI Nº 8080 de 19 de setembro de 1990. Dispões sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 20 set. 1990. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/legis/leis/8080\\_90.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/leis/8080_90.htm). Acesso em: 30 jun. 2006.

BROWN, D.F.J. Detection of methicillin/ oxacillin resistance in staphylococci. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 48, S 1, p. 65-70, 2001

BULGER, R.; SHERRIS, J.C. Decrease incidence of antibiotic resistance among *Staphylococcus aureus* study in a university hospital over a nine years period. **Ann. Intern. Med.**, v. 69, p.1099-1108, 1968.

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

CHAPMAN, J.S. Disinfectant resistance mechanisms, cross-resistance, and co-resistance. **Int. Biodet. Biodeg.**, v. 51, p. 271-276, 2003.

CHAPMAN, J.S. Characterizing bacterial resistance to preservatives and disinfectants. **Int. Biodet. Biodeg.**, v. 41, p.241-245, 1998.

CHAPMAN, J.S.; DIEHL, M.A.; FEARNSTIDE, K.J. Preservative tolerance and resistance. **Int. J. Cosmet. Sci.**, v. 19, p.1-10,1998.

COSTA, E. A., ROZENFELD, S. Fundamentos da Vigilância Sanitária. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2000. 304 p.

CRISÓSTOMO, M.I.; WESTH, H.; TOMASZ, A.; CHUNG, M.; OLIVEIRA, D.C. DE LENCASTRE, H. The evolution of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: similarity of genetic backgrounds in historically early methicillin-susceptible and – resistant isolates and contemporary epidemic clones. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 98, p. 9865-9870, 2001. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.gov/picrender.fcgi?artid=55544&blobtype=pdf>. Acesso em: 03 jul. 2004.

DE JONGE, B.L.M.; YOON-SEOK, C.; GAGE, D.; TOMASZ, A. Peptidoglycan composition of a highly methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain. **J. Biol. Chem.**, v. 267, p.11248-11254, 1992.

DE LENCASTRE, H.; FIGUEIREDO, A.M.S.; URBAN, C.; RAHAL, J.; TOMASZ, A. Multiple mechanisms of methicillin resistance and improved methods for detection in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 35, p. 632-639, 1991.

DE LENCASTRE, H.; FIGUEIREDO, A.M.S.; TOMASZ, A. Genetic control of population structure in heterogeneous strains of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **Eur. J. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 12, suppl. 1, S 13, p. 13-18, 1993.

DE LENCASTRE, H.; TOMASZ, A. Reassessment of the number of auxiliary genes essential for expression of high-level methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 38, p. 2590-2598, 1994.

DE LENCASTRE, H.; COUTO, I.; SANTOS, I.; MELO-CRISTINO, J.; TORRES-PEREIRA, A.; TOMASZ, A. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* disease in a Portuguese hospital; characterization of clonal types by a combination of DNA typing methods. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 13, p. 64-73, 1994.

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

FELTEN, A.; GRANDRY, B.; LAGRANGE, P.H.; CASIN, I. Evaluation of three techniques for detection of low-level methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a disk diffusion method with cefoxitin and moxalactam, the Vitek 2 system, and the MRSA-screen latex agglutination test. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, p.2766-2771, 2002.

FITZGERALD, J.R.; STURDEVANT, D.E.; MACKIE, S.M.; GILL, S.R.; MUSSER, J.M. Evolutionary genomics of *Staphylococcus aureus*: insights into the origin of methicillin-resistant strains and the toxic shock syndrome epidemic. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 98, p.8821-8826, 2001. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.gov/picrender.fcgi?artid=37519&blobtype=pdf>. Acesso em: 04 jul. 2004.

FREBOURG, N.B.; NOUET, D.; LEMÉE, L.; MARTIN, E.; LEMELAND, J-F. Comparison of ATB Staph, rapid ATB Staph, Vitek, and E-test methods for detection of oxacillin heteroresistance in staphylococci possessing *mecA*. **J. Clin. Microbiol.**, v.36, p. 52-57, 1998.

GALDBART, J-O.; MORVAN, A.; SOLH, N.E. Phenotypic and molecular typing of nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains susceptible to gentamicin isolated in France from 1995 to 1997. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p. 185-190, 2000.

GILLISPIE, M.T.; MAY, J.W.; SKURRAY, R.A. Antibiotic susceptibility and plasmid profiles of nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a retrospective study. **J. Med. Microbiol.**, v. 17, p. 295-310, 1984.

GOLDMANN, D.A. 1992. Library of Congress (ed). *In*: Hospital Infections. USA. 982 p. p 767.

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

HANSEN, A-M.; SOLLID J.U.E. SCC*mec* in staphylococci: genes on the move. **Fems Immunol. Med. Microbiol.**, v. 46, p. 8-20, 2006.

HARTMAN, B.J.; TOMASZ, A. Expression of methicillin resistance in heterogeneous strains of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 29, p. 85-92, 1986.

HIRAMATSU, K.; CUI, L. KURODA, M. ITO, T. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Trends in Microbiol.**, v. 9, p. 486-493, 2001.

HÜRLIMANN-DALEL, R.L.; RYFFEL, C.; KAYSER, F.H.; BERGER-BÄCHI, B. Survey of the methicillin resistance-associated genes *mecA*, *mecR1-mecI*, and *femA-femB* in clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v. 36, p. 2617-2621, 1992.

ITO, T.; KATAYAMA, Y.; HIRAMATSU, K. Cloning and nucleotide sequence determination of the entire *mec* DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 43, p.1449-1458, 1999.

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

KIKUCHI, K. Genetic basis of neonatal methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Japan. **Pediat. Intern.**, v. 45, p. 223-229, 2003.

KNAPP, C.C.; LUDWIG, M.D.; WASHINGTON, J.A. Evaluation of differential inoculum disk diffusion method and Vitek GPS-SA card for detection of oxacillin-resistant staphylococci. **J. Clin. Microbiol.**, v. 32, p. 433-436, 1994.

KREISWIRTH, B.; KORNBLUM, J.; ARBEIT R.D.; EISNER, W.; MASLOW, J.N.; MCGEER, A.; LOW, D.E.; NOVICK, R.P. Evidence for a clonal origin of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Science**, v. 259, p. 227-230, 1993.

LA FORCE, F.M. The control of infections in hospitals: 1750 to 1950. In: Wenzel, R.P. **Prevention and control of nosocomial infections**. 2. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1993. p. 136-148.

LAURENT, F.; LELIÈVRE, H.; CORNU, M.; VANDENESCH, F.; CARRET, G.; ETIENNE, J.; FLAUDROIS, J-P. Fitness and competitive growth advantage of new gentamicin-susceptible MRSA clones spreading in French hospitals. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 47, p. 277-283, 2001.

LELIÈVRE, H.; LINA, G.; JONES, M.E., OLIVE, C.; FOREY, F.; ROUSSEL-DELVALLEZ, M.; NICOLAS-CHANOINE, M-H.; BÉBÉAR, C.M.; JARLIER, V.; ANDREMONT, A.; VANDENESCH, F.; ETIENNE, J. Emergence and spread in French hospitals of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with increasing susceptibility to gentamicin and other antibiotics. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, p. 3452-3457, 1999.

LESKI, T.A. ; TOMASZ, A. Role of penicillin-binding protein 2 (PBP2) in the antibiotic susceptibility and cell wall cross-linking of *Staphylococcus aureus*: evidence for the cooperative functioning of PBP2, PBP4, and PBP2a. **J. Bacteriol.**, v. 187, p.1815-1824, 2005.

LITTLEJOHN, T.G.; DIBERNARDINO, D.; MESSEROTTI, L.J.; SPIERS, S.J.; SKURRAY, R.A. Structure and evolution of a family of genes encoding antiseptic and disinfectant resistance in *Staphylococcus aureus*. **Gene**, v. 101, p. 59-66, 1990.

LIVERMORE, D.M. Antibiotic resistance in staphylococci. **Intern. J. Antimicrob. Agents**, v. 16, p. S3-S10, 2000.

LYON, B.R.; SKURRAY, R. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* : genetic basis. **Microbiol. Rev.**, v. 51, p. 88-134, 1987.

LOFTI, C.J.; SILVA, J.F.; MACHADO, A.M.O. Comparação da suscetibilidade aos antimicrobianos das bactérias isoladas de infecção hospitalar entre os anos de 1986-1987, no Hospital São Paulo. In: 25º CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL, 28 fev. a 3 mar. Anais. Manaus (AM), Brasil, 1988; Resumo A105.

LOUREIRO, M.M.; DE MORAES, B.A.; MENDONÇA, V.L.; QUADRA, M.R.; PINHEIRO, G.S.; ASENSI, M.D. *Pseudomonas aeruginosa*: study of antibiotic resistance and molecular typing in hospital infection cases in a neonatal intensive care unit from Rio de Janeiro City, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 97, p.387-394, 2002.

LUZ, C.A.; MIYAZAKI, N.H.T.; BÔAS, M.H.S.V. Comparação do perfil de resistência de *Staphylococcus coagulase-positiva* aos antibióticos e quaternários de amônio. In: XIII REUNIÃO ANUAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 07 a 10 nov. Anais. Rio de Janeiro (RJ), Brasil, 2005; Resumo.

MALORQUÍ-FERNÁNDEZ, G.; MARRERO, A.; GARCÍA-PIQUÈ, S.; GARCÍA-CASTELLANOS, R.; GOMIS-RÜTH, F.X. Staphylococcal methicillin resistance: fine focus on folds and functions. **Fems Microbiol. Letters**, v. 235, p. 1-8, 2004.

MAYER, S.; BOOS, M.; BEYER, A.; FLUIT A.D.C.; SCHMITZ, F-J. 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, p. 896-897, 2001.

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

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, p. 1032-1035, 2000.

MERLINO, J.; LEROI, M.; BRADBURY, R.; VEAL, D.; HARBOUR, C. New chromogenic identification and detection of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p.2378-2380, 2000.

MITCHELL, B.A.; BROWN, M.H.; SKURRAY, R.A. QacA multidrug efflux pump from *Staphylococcus aureus*: comparative analysis of resistance to diamidines, biguanidines, and guanylhydrazones. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 42, p. 475-477, 1998.

MONSEN, T.; OLOFSSON, C.; GRANSTRÖM, S.; WISTRÖN, J. A preliminary evaluation of a new selective agar supplemented with desferrioxamine for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **J. Hosp. Infect.**, v. 54, p. 216-221, 2003.

MÉTODO da Diluição de Uso. In: MANUAL da Qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, ANO. seção 10. 21p. (65.3210.007).

MONGKOLRATTANOTHAI, K.; BOYLE, S.; MURPHY, T.V.; DAUM, R.S. Novel non-*mecA*-containing staphylococcal chromosomal cassette composite island containing *pbp4* and *tagF* genes in a commensal staphylococcal species: a possible reservoir for antibiotic resistance islands in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 48, p. 1823-1836, 2004.

MUSSER J.M.; KAPUR, V. Clonal analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from intercontinental sources: association of the *mec* gene with divergent phylogenetic lineages implies dissemination by horizontal transfer and recombination. **J. Clin. Microbiol.**, v. 30, p. 2058-2063, 1992.

NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards 2000. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; approved standard – Seventh edition. Document M2-A7 (ISBN 1-56238-393-0). Pennsylvania. USA.

NNIS System. 2004. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, Data Summary from January 1992-June 2004, Issued October 2004. **Am. J. Infect. Control.**, v. 29, p. 404-421.

NOGUCHI, N.; HASE, M.; KITTA, M.; SASATSU, M.; DEGUTI, K.; KONA, M. Antiseptic susceptibility and distribution of antiseptic-resistance genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **FEMS Microbiol. Letters**, v. 172, p. 345-353, 1999.

NORTH, E. A.; CHRISTIE, R. Acquired resistance of staphylococci to the action of penicillin. **Med. J. Australia**, v. 1, p 176-179, 1946.

NOVICK, R.P.; SCHLIEVERT, P.; RUZIN, A. Pathogenicity and resistance islands of staphylococci. **Microbes Infect.**, v. 3, p. 585-594, 2001.

O'HARA, D.; HARRINGTON, C.R.; REYNOLDS, P.E. Immunological detection of penicillin-binding protein 2' in clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. **Fems Microbiol. Letters**, v. 57, p. 97-104, 1989.

PANNUTI, C.S.; GRINBAUM, R.S. An overview of nosocomial infection control in Brazil. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, v. 16, p. 170-174, 1995.

PEREIRA, M.L.G.; HANNA, G.; RICHTMANN, R.; KUSAKANO, E.J.U.; SHIMATAI, Y.; MENDONÇA, J.S. Perfil atual de sensibilidade das bactérias aos antimicrobianos

usuais: análise de 1841 amostras de secreções, sangue, urina e líquido. In: 25º CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL; 28 fev. a 3 mar. Anais. Manaus (AM), Brasil, 1988; Resumo 102.

PINHO, M.G.; FILIPE, S.R.; DE LENCASTRE, H.; TOMASZ, A. Complementation of the essential peptidoblycan transpeptidase function of penicillin-binding protein 2 (PBP2) by the drug resistance protein PBP2a in *Staphylococcus aureus*. **J. Bacteriol.**, v. 183, p. 6525-6531, 2001.

PUTTMANN, M.; VAN VEEN, H.; KONINGS, W.N. Molecular properties of bacterial multidrug transporters. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 64, p. 672-693, 2000.

RESENDE, C.A.; FIGUEIREDO, A.M.S. Discrimination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from borderline-resistant and susceptible isolates by different methods. **J. Med. Microbiol.**, v. 46, p. 145-149, 1997.

ROSSI, L.; TONIN, E.; CHENG, Y.R.; FONTANA, R. Regulation of Penicillin-Binding Protein activity: description of a methicillin-inducible PBP in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 27, p. 828-831, 1985.

RUSSELL, A.D. Principles of antimicrobial activity. In: Disinfection, sterilization, and preservation. Pennsylvania: 1991. p 29.

RUSSELL, A.D. Mechanism of microbial resistance to disinfectant and antiseptic agents. In: Rutala W.A. **Chemical germicides in health care**. Washington: APIC, 1994. p. 255-269.

RUSSELL, A.D. Mechanism of bacterial resistance to biocides. **Int. Biodet. Biodeg.**, v. 36, p. 247-265, 1996.

RUSSELL, A.D. Mechanism of bacterial resistance to biocides. **Prog. Med. Chem.**, v. 35, p.133-197, 1998.

RUSSELL, A.D. Bacterial resistance to disinfectants: present knowledge and future problems. **J. Hosp. Infect.**, v. 43, p. S 57-S 68, 1999.

RUSSELL, A.D. Do biocides select for antibiotic resistance? **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 52, p. 227-233, 2000.

RUSSEL, A.D. Principles of antimicrobial activity and resistance. In: Block. S.S. Disinfection, sterilization, and preservation. Philadelphia: Lippincott Williams & Williams, 2001. p 31.

RUSSELL, A.D.; HAMMOND, S.A.; MORGAN, J.R. Bacterial resistance to antiseptics and disinfectants. **J. Hosp. Infect.**, v. 7, p. 213-225, 1986.

RUSSELL, A.D.; SULLER, M.T.E.; MAILLARD, J.Y. Do antiseptics and disinfectants select for antibiotic resistance? **J. Med. Microbiol.**, v. 48, p. 1-3, 1999.

RUSSELL, A.D.; MAILLARD, J.Y. Response. **Am. J. Infect. Control**, v. 28, p. 204-206, 2000.

RUTALA, W.A.; STIEGEL, M.M.; SARUBBI, F.A.; WEBER. D.J. Susceptibility of antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant hospital bacteria to disinfectants. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, v. 18, p. 417-421, 1997.

RUTALA, W.A.; BARBIE, S.L.; AGUIAR, N.C.; SOBSEY, M.D.; WEBER, D.J. Antimicrobial activity of home disinfectants and natural products against potential human pathogens. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, v. 21, p. 33-38, 2000.

SADER, H.S.; GALES, A.C.; PFALLER, M.A.; MENDES, R.E.; ZOCCOLI, C.; BARTH, A.; JONES, R.N. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY antimicrobial surveillance program. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 5, p. 200-214, 2001.

SALMENLINNA, S. **Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Finland.** Helsinki: National Public Health Institute,

Department of Microbiology; University of Helsinki, Faculty of Medicine, 2002. 89 p.  
Academic dissertation – University of Helsinki, Haartman Institute, Helsinki.  
Disponível em:  
<http://ethesis.helsinki.fi/julkaisut/1aa/kansa/vk/salmenlinna/molecula.pdf>. Acesso em:  
12 fev. 2004.

SALYERS, A.A.; WHITT, D.D. Host defenses against bacterial pathogens: defenses of body surfaces. In: Bacterial pathogenesis. ASM Press. Washington, D.C. 1994. p 3.

SCHLEIFER, K.H. Gram-positive cocci. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. v.2. Baltimore, USA. : Williams & Wilkins, 1986. p. 999.

SIDHU, M.S.; HEIN, E.; LEEGARD, T.; WIGER, K.; HOLCK, A. Frequency of disinfectant resistance genes and genetic linkage with  $\beta$ -lactamase transposon *Tn552* among clinical staphylococci. **Antimicro. Agents Chemother.**, v. 46, p. 2797-2803, 2002.

SKOV, R.; SMYTH, R.; CLAUSEN, M.; LARSEN, A.R.; FRIMODT-MØLLER, N.; OLSSON-LILJEQUIST, B.; KAHLMETER, G. Evaluation of a cefoxitin 30  $\mu$ g disk on Iso-Sensitest agar for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 52, p. 204-207, 2003.

SKULNICK, M.; SIMOR, A.E.; GREGSON, D.; PATEL, M.; SMALL, G.W.; KREISWIRTH, B.; HATHOWAY, D.; LOW, D.E. Evaluation of commercial and standard methodology for determination of oxacillin susceptibility in *Staphylococcus aureus*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 30, p. 1985-1988, 1992.

SOUSA, M.A.; DE LENCASTRE, H. Bridges from hospitals to the laboratory: genetic portraits of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones. **FEMS Immun. Med. Microbiol.**, v. 40, p. 101-111, 2004.

TEIXEIRA, L.A.; RESENDE, C.A.; ORMONDE, L.R., ROSENBAUM, A.M.S.; DE LENCASTRE, H.; TOMASZ, A. Geographic spread of epidemic multiresistant *Staphylococcus aureus* in Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, p. 2400-2404, 1995.

TENOVER, F.C.; ARBEIT, R.D.; RICHARD, V.G.; MICKELSEN, P.A.; MURRAY, B.E.; PERSING, D.H.; SWAMINATHAN, B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, p. 2233-2239, 1995.

TOMASZ, A.; DRUGEON, H.B.; DE LENCASTRE, H.; JABES, D.; MCDOUGALL, L.; BILLE, J. New mechanism for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: clinical isolates that lack the *PBP2a* gene and contain normal penicillin-binding proteins with modified penicillin-binding capacity. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 33, p. 1869-1874, 1989.

TOMASZ, A.; NACHMAN, S.; LEAF, H. Stable classes of phenotypic expression in methicillin-resistant clinical isolates of staphylococci. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 35, p. 124-129, 1991.

TOWNSEND, D.E.; ASHDOWN, N.; GREED, L.C.; GRUBB, W.B. Transposition of gentamicin resistance to staphylococcal plasmids encoding resistance to cationic agents. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 14, p.115-124, 1984.

VAN WAMEL, W.J.B.; FLUIT, A.C.; WADSTRÖM, T.; VAN DIJK, H.; VERHOEF, J.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C.M.J.E. Phenotypic characterization of epidemic versus sporadic strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, p. 1769-1774, 1995.

YAMAZUMI, T.; MARSHALL, S.A.; WILKE, W.W.; DIEREMA, D.J.; PFALLER, M.A.; JONES, R.N. Comparison of the Vitek Gram-positive susceptibility 106 card and the MRSA-screen latex agglutination test for determining oxacillin resistance in clinical bloodstream isolates of *Staphylococcus aureus*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, p. 53-36, 2001.

## 9. ANEXO 1

A fim de homogeneizar o entendimento a respeito de alguns termos utilizados neste trabalho foram adotadas as definições indicadas por Tenover et.al (1995):

- Isolado: é um termo geral para uma cultura pura de bactérias obtidas por subcultivo de uma colônia isolada a partir de um isolamento primário em placa, sendo presumidamente derivada de um único organismo, do qual além do gênero e da espécie não se dispõe de outra informação relacionada.
- Isolados epidemiologicamente relacionados: são isolados cultivados a partir de espécimes coletados de pacientes ou de ambientes durante um determinado tempo ou de uma área bem definida como parte de uma investigação epidemiológica que sugere que os isolados possam ser originados de uma fonte em comum.
- Cepa: é um isolado ou um grupo de isolados que podem ser distinguidos de outros isolados do mesmo gênero e espécie através das características fenotípicas, ou genotípicas, ou ambas. Uma cepa é uma subdivisão representativa de uma determinada espécie.
- Clones: ou isolados geneticamente relacionados são isolados indistinguíveis entre si quando analisados por testes genotípicos, como PFGE e ribotipagem entre outros, ou que por serem tão similares entre eles são considerados presumidamente serem derivadas de um mesmo ancestral.
- Surto: é o aumento da incidência de uma doença infecciosa em um local específico durante um determinado período de tempo.
- Cepa surto: são os isolados da mesma espécie que estão relacionados epidemiologicamente (como exemplo tempo, local, fonte de infecção) e geneticamente (genótipos indistinguíveis).