

PRISCILA DA NOBREGA RITO

CARACTERIZAÇÃO DE CEPAS DE *STAPHYLOCOCCUS* RESISTENTES À METICILINA QUANTO A PRODUÇÃO DE BIOFILME, RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS E REALIZAÇÃO DO PERFIL E DA TIPIFICAÇÃO CLONAL.

PPGVS/ INCQS
FIOCRUZ
2008

Caracterização de cepas de *Staphylococcus* resistentes à metilina quanto a produção de biofilme, resistência a antimicrobianos e realização do perfil e da tipificação clonal

Priscila da Nobrega Rito

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

Orientadores: Verônica Viana Vieira
Lenise Arneiro Teixeira

Rio de Janeiro

2008

FOLHA DE APROVAÇÃO

Caracterização de cepas de *Staphylococcus* resistentes à metilina quanto a produção de biofilme, resistência a antimicrobianos e realização do perfil e da tipificação clonal

Priscila da Nobrega Rito

Dissertação 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 Mestre.

Aprovado:

_____ (INCQS/FIOCRUZ)

Prof. Dra. Maria Helena Simões Vilas Bôas

_____ (INCQS/FIOCRUZ)

Prof. Dra. Neide Hiromi Tokumaru Miyazaki

_____ (UERJ)

Prof. Dr. Raphael Hirata Júnior

_____ (INCQS/FIOCRUZ)

Orientadora: Prof. Dra. Verônica Viana Vieira

_____ (UFF)

Orientadora: Prof. Dra. Lenise Arneiro Teixeira

Rio de Janeiro

2008

FICHA CATALOGRÁFICA

Rito, Priscila da Nobrega

Caracterização das cepas de *Staphylococcus* resistentes à meticilina quanto a produção de biofilme, resistência a antimicrobianos e a realização da tipificação clonal/ Priscila da Nobrega Rito. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2008.

xvi., 68 p., il., tab.

Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro, 2008.

Orientador: Verônica Viana Vieira/ Lenise Arneiro Teixeira

1. *Staphylococcus aureus* 2. *Staphylococcus epidermidis* 3. Multirresistência
4. Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE). I. Título.

Título em Inglês: Characterization of *Staphylococcus* methicillin resistant strains compared to biofilm production, antimicrobials resistance and clonal typing profile.

Dedico esta dissertação a minha mãe, Márcia e ao meu pai, Francisco, por todo amor e apoio incondicional que sempre me deram. A minha irmã, Patrícia, e a minha afilhada, Isabelle, por toda a compreensão e pelo ensinamento da partilha. Ao meu avô, Jesus, pelo exemplo de sabedoria, simplicidade e força. E a minha querida avó, e grande amiga Clotilde (In memoriam), pelo grande amor e devoção.

Ao meu namorado e grande
companheiro, Alessandro, por todo
amor, ajuda, compreensão, carinho e
momentos mágicos!

“Todas as situações em que passamos, inclusive as mais adversas, serve para que nos tornemos pessoas mais sábias durante nossa caminhada”.

Priscila da Nobrega Rito.

AGRADECIMENTOS:

Agradeço primeiramente ao meu Criador, por toda ajuda e fortaleza me dada até nos momentos em que pensei que não seria capaz de suportar. E principalmente, por colocar pessoas maravilhosas na minha caminhada para me ajudar a enfrentar de frente os obstáculos surgidos no decorrer desta dissertação.

Agradeço à toda minha família por todo apoio e amor, fatores essenciais para que eu chegasse até o final deste trabalho.

Ao meu namorado, Alessandro, por toda ajuda e compreensão nos momentos difíceis que passei.

As minhas orientadoras, Verônica e Lenise, pelos ensinamentos, paciência, por me ajudarem e me apoiarem em minhas decisões.

A todos os meus amigos por me tranquilizarem e compreender a minha ausência e de uma maneira especial aos amigos do Laboratório de Identificação Bacteriana, INCQS, Carmen, João, Paulo, Vanda por toda paciência, técnicas ensinadas e carinho que me deram.

As pessoas do Laboratório da Prof. Agnes Marie Sá Figueiredo da Universidade Federal do Rio de Janeiro, pela ajuda nos experimentos para o término da minha dissertação.

Ao funcionário do HUAP Sílvio José de Mello, pela ajuda na coleta das cepas usadas nesta dissertação.

A Simone e Ana Maria por contribuir de maneira importante para esta dissertação.

Aos amigos do INCQS, principalmente do Departamento de Microbiologia, por todo apoio na realização dos meus experimentos.

E ao departamento de Assuntos Regulatórios da L'Óreal pela compreensão por minha ausência para que eu pudesse terminar esta dissertação.

RESUMO:

Staphylococcus aureus e *Staphylococcus* Coagulase negative(CNS) são reconhecidos como causadores de infecções hospitalares e comunitárias em todas as regiões do mundo. Nós estudamos a produção de biofilme em 43 cepas de *Staphylococcus aureus* metilina resistente (MRSA) e em 21 isolados de *Staphylococcus epidermidis* metilina resistente (MRSE) e a susceptibilidade a antibióticos destas cepas que foram obtidas de pacientes infectados do Hospital Universitário Antônio Pedro (HUAP), localizado na cidade de Niterói no estado do Rio de Janeiro. Foi realizado também a Eletroforese em campo pulsado (PFGE) de fragmentos de macrorestrição de *Sma*I do DNA genômico, bem como a tipificação do cassete cromossômico estafilocócico *mec* (SCC*mec*). Os isolados que carregavam *mecA* foram usados para estudar a distribuição do tipo clonal entre 43 cepas de MRSA colhidas no HUAP de 2003 a 2006. Nossos resultados demonstraram que a maioria das cepas de MRSA (83.7%) e MRSE (52,4%) produziram biofilme, e altas taxas de resistência de MRSA e MRSE à eritromicina, à clindamicina e ao ciprofloxacino foram observadas. Dois tipos clonais predominantes (A e B) foram identificados por PFGE, tendo ambos compreendendo a maioria das cepas (32,6% cada um). De acordo com a tipificação de SCC*mec*, o SCC*mec* tipo IV foi o que prevaleceu (51,2%). Porém, o mais interessante em nosso estudo foi a mudança observada no background genético dos MRSA isolados do HUAP, pois o Clone Epidêmico Brasileiro(CEB) que era o clone predominante neste hospital, está sendo substituído pelo USA-400, um clone que a princípio foi denominado de clone comunitário *Staphylococcus aureus* metilina resistente (CA-MRSA).

ABSTRACT:

Staphylococcus aureus and coagulase-negative staphylococci (CNS) are recognized as causing nosocomial and community-acquired infection in every region of the world. We study biofilm production in 43 isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and 21 isolates methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* (MRSE) and the antibiotics susceptibilities of these strains that were obtained from infected patients at Antônio Pedro University Hospital (HUAP) located in Niterói city, Rio de Janeiro. In addition, Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) of *SmaI* macrorestriction fragments of genomic DNA as well as staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) typing for *mecA*-carrying isolates were used to study the distribution of clonal types among 43 MRSA recovered in HUAP between 2003 and 2006. Our results demonstrated that the majority strains of MRSA (83.7%) and MRSE (52,4%) produced biofilm and high resistance of MRSA and MRSE to erythromycin, clindamicin and ciprofloxacin were observed. The two major clones types (A and B) were identified by PFGE, with both them comprising the majority of strains (32,6% each). According to SCC*mec* typing, SCC*mec* type IV were the most prevalent type, showing 51,2% . But the most interesting in our study is a changed observed in the genetic background of MRSA isolates from HUAP, because of Brazilian clone, which was the major clone in this hospital, was replaced by the USA-400, one type of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA).

LISTA DE SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BAP	Biofilm-Associated Protein
CA-MRSA	Community Acquired Methicillin Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
CCIH	Controle de Infecção Hospitalar
CEB	Clone Epidêmico Brasileiro
CTI	Centro de Terapia Intensiva
CGLAB	Coordenação Geral de laboratórios em Saúde
ECN	Estafilocococ Coagulase Negativo
E-MRSA	European <i>Staphylococcus aureus</i>
HUAP	Hospital Universitário Antônio Pedro
HA-MRSA	Hospital Acquired Methicillin Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
MLST	Multilocus Sequence Typing
MRSA	Methicillin Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
MRSE	Methicillin Resistant <i>Staphylococcus epidermidis</i>
MSCRAMM	Microbial surface componentes recognizing adhensive matrix molecules
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
OSPC	Oceania Southwest Pacific Clone
PCIH	Programa de Controle de Infecção Hospitalar
PFGE	Pulsed-Field Gel Electrophoresis
PIA	Polysaccharide Intercellular Adhesin
PVL	Panton Valentin Leucocidina
RM	Rede de Monitoramento
SCIH	Serviço de Saúde de Controle de Infecção Hospitalar

SENTRY	Programa Internacional de Vigilância Epidemiológica
SINAIS serviços	Sistema Nacional de Informações para o Controle de Infecções em de saúde.
SUS	Sistema Único de Saúde
SWPC	Southwest Pacific Clone
UCISA	Unidade de Controle de Infecções em Serviços de Saúde
USA	United State of America
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
WA-MRSA	Western Austrália Methicillin Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição da seqüência dos iniciadores utilizados neste trabalho e o tamanho do amplicon	24
Tabela 2. Resultados da clonalidade, tipagem do SCC <i>mec</i> e produção de biofilme e perfil de resistência das cepas de MRSA	35
Tabela 3. Resultados da produção de biofilme e perfil de resistência de MRSE	37

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Perfil de resistência de 43 cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à meticilina frente aos antimicrobianos usados na clínica	30
Figura 2. Perfis eletroforéticos obtidos pela metodologia de PFGE	31
Figura 3. Amplificação dos genes Rif 5(414 Kb) e Mec I (209 Kb) que codifica SCCmec tipo III, Dcs (342 Kb) e Mec A(600Kb) que codificam SCCmec tipo IV	32
Figura 4. Amplificação do gene <i>lukF</i> , que codifica para PVL	33
Figura 5. Perfil de resistência de 21 cepas de <i>Staphylococcus epidermidis</i> resistentes à meticilina frente aos antimicrobianos usados na clínica	34

LISTA DE ESQUEMA

Esquema 1- Classes do complexo *mec* em estafilococcus. *mecI* gen repressor, *mec R*, gen indutor e as setas indicam a direção da transcrição

SUMÁRIO

Folha de Aprovação	ii
Ficha catalográfica	iii
Dedicatória	iv
Agradecimento	vi
Resumo	vii
Abstract	i ix
Lista de siglas	x
Lista de Tabelas	xii
Lista de figuras	xii
Lista de esquema	xi
Sumário	xv
Introdução	01
Controle das Infecções Hospitalares e Vigilância Sanitária	01
<i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Staphylococcus epidermidis</i>	03
Biofilme	05
Resistência a antimicrobianos	09
Tipagem Genotípica de <i>Staphylococcus</i>	12
Objetivo Geral	18
Objetivos específicos	18
Materiais e métodos	19
1. Coleta e identificação das amostras	19
2. Teste de susceptibilidade a antimicrobianos (teste de difusão em meio sólido)	19
3. Teste de aderência e formação de biofilme	20

4. Caracterização molecular dos <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à meticilina	21
4.1. Extração do DNA total	21
4.2. PCR multiplex para tipagem da ilha de resistência SCCmec e PCR para a detecção do gen para a Leucocidina Panton Valentine	21
4.3. Análise dos Perfis de Fragmentação do DNA Cromossômico através de Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE)	22
5. Análise estatística	23
Resultados	24
1. Identificação das cepas estafilocócicas resistentes à meticilina	25
2. Resultados das cepas de MRSA	25
2.1 Susceptibilidade dos MRSA aos antimicrobianos utilizados na clínica	25
2.2 Produção de biofilme	26
2.3 Análise dos Perfis de Fragmentação do DNA Cromossômico e Clonalidade Através de Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE)	26
2.4 Tipagem da ilha <i>mec</i>	27
2.5. Detecção genotípica da leucocidina Panton-Valentine (PVL) em cepas de MRSA USA 400	27
3.0 Caracterização dos <i>Staphylococcus epidermidis</i> resistentes à meticilina	28
3.1 Susceptibilidade dos MRSE aos antimicrobianos utilizados na clínica.	28
3.2 Produção de Biofilme	28
4. Análise Estatística na comparação da produção de biofilme	29
Discussão	38
Conclusão	46
Referências bibliográficas	47

INTRODUÇÃO

Controle das Infecções Hospitalares e Vigilância Sanitária

Infecção Hospitalar é definida como a infecção não evidenciada na admissão hospitalar, adquirida durante o período de internação, podendo, entretanto, se manifestar após a alta do paciente. Este tipo de infecção pode ser detectado em até 30 dias após a cirurgia sem a colocação de prótese ou um ano ou mais após a colocação desta (BENNET & BRANCHMAN, 1998).

Embora grande parte das infecções hospitalares seja de origem endógena e de difícil prevenção, o número de infecções hospitalares que podem ser evitadas é considerável. Para tal, normas de controle que atuem na melhoria da qualidade dos serviços prestados pelos hospitais devem ser implantadas, visando reduzir ao máximo a incidência de infecções neste ambiente.

No Brasil, a Lei nº 9.431 de 06 de janeiro de 1997 (BRASIL, 1997) dispõe sobre a obrigatoriedade dos hospitais em manterem um Programa de Controle de Infecções Hospitalares (PCIH) e criarem uma Comissão de Controle de Infecções Hospitalares (CCIH). Adicionalmente, uma portaria definindo as diretrizes e normas para a prevenção e controle dessas infecções foi publicada em maio de 1998 (BRASIL, 1998). De acordo com esta portaria, as CCIHs devem ser compostas por membros consultores e executores, sendo estes últimos representantes do Serviço de Controle de Infecção Hospitalar (SCIH) e responsáveis pela operacionalização das ações de controle programadas.

Atualmente, as diretrizes gerais para o controle das infecções em serviços de saúde são delineadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), na Gerência Geral de Tecnologia em Serviços de Saúde, através da Unidade de Controle de Infecções em Serviços de Saúde (UCISA) (BRASIL, 2004). As ações e serviços voltados para a prevenção e controle das infecções hospitalares devem ser organizados de maneira a obedecerem a princípios, diretrizes e normas de organização, direção e gestão do Sistema Único de Saúde (SUS), definidos através da lei nº 8.080 de 19 de setembro de 1990 (BRASIL, 1990). Esta lei conceitua como Vigilância Sanitária o conjunto de ações capazes de eliminar, diminuir ou prevenir riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e da circulação de bens e da prestação de serviços de

interesse da saúde.

Entre as atividades voltadas para o controle de infecções, consta a implantação do Sistema Nacional de Informação para o Controle de Infecções em Serviços de Saúde (SINAIS) e formação de uma rede de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde (BRASIL, 1990). O objetivo deste sistema é auxiliar a identificação e monitoramento das infecções, contribuir para a priorização das ações de controle e organizar as diretrizes políticas nas esferas municipal, estadual e federal. Assim, em junho de 2000, a diretoria colegiada da ANVISA adotou a resolução RDC nº 48 com o intuito de verificar se o controle das infecções hospitalares estava, de fato, se concretizando.

O monitoramento da resistência microbiana, em grande parte do mundo, é feito desde janeiro de 1997, pelo programa Internacional de Vigilância Epidemiológica – SENTRY. Este programa tem analisado dados sobre a resistência de patógenos bacterianos, tanto de origem hospitalar quanto comunitária (PFALER et al., 1998). Existem oitenta centros de monitoramento vinculados ao SENTRY em todo mundo; entre eles dez se encontram na América Latina. No Brasil, estes centros estão localizados em São Paulo, Rio de Janeiro, Florianópolis, Porto Alegre e Distrito Federal (SADER et al., 2004).

Encontra-se em operação, desde 2004, o projeto “Monitoramento e Prevenção da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde”, resultado de uma parceria entre a ANVISA, a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) e a Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública (CGLAB) do Ministério da Saúde (ANVISA, 2007). Tem por objetivo controlar e reduzir o surgimento e a disseminação da resistência aos antimicrobianos em serviços de saúde de nosso país. Em agosto de 2006, os hospitais participantes da Rede de Monitoramento da Resistência Microbiana (RM) começaram a transmitir dados sobre a ocorrência de infecções e respectivos agentes causadores (ANVISA, 2007). Atualmente a rede conta com 114 hospitais em todo o território brasileiro, com estudos focados nas infecções primárias da corrente sanguínea, confirmadas laboratorialmente, em pacientes de unidade de terapia intensiva (UTI) (ANVISA, 2007).

Dentre os microrganismos prioritários nos estudos epidemiológicos e de disseminação do programa da Rede de Monitoramento da Resistência Microbiana, os estafilococos estão entre os patógenos que mais apresentam infecções relacionadas a cepas resistentes. Assim, de acordo com os dados iniciais deste

programa relativos ao período de julho de 2006 a março de 2007, foi verificado que a taxa de sensibilidade ao antibiótico oxacilina dos *Staphylococcus aureus* oriundos de infecções primárias da corrente sanguínea ocorria em 38% dos casos, considerando os hospitais que enviaram notificação (ANVISA, 2006). Nos Estados Unidos da América, a ocorrência de infecções por MRSA (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) adquiridas em unidades hospitalares é da ordem de 60%, de acordo com Griffin (2007) ou 77%, segundo [Patel e colaboradores \(2008\)](#).

Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis

Muitas bactérias do gênero *Staphylococcus* fazem parte da microbiota anfibiótica da pele e superfícies mucosas de humanos, principalmente da cavidade nasal, axilas, boca, vagina e intestino. Talvez por isto, esses microrganismos estejam associados à ampla variedade de infecções oportunistas, podendo causar bacteremias, endocardites, osteomielites, peritonites, infecções do trato urinário, endocardites e septicemia entre outras. Neste gênero, duas espécies são especialmente descritas como determinantes de infecções nosocomiais - *S. aureus* e *S. epidermidis* (LOWY, 1998).

Levantamentos epidemiológicos recentes sugerem que os *S. aureus* representem o principal agente etiológico das infecções nos setores de emergência nos Estados Unidos (VANDECASTELLE et al., 2003; MORAN et al., 2006). Infecções causadas por estas bactérias podem apresentar quadros agudos ou crônicos (MASSEY et al., 2006). Estas bactérias produzem diversos fatores de virulência, como várias toxinas, adesinas e componentes de evasão imunológica (GILL et al., 2005), podendo também ser equipadas por pequenas ilhas de patogenicidade denominadas SaPis. Tais ilhas podem carrear superantígenos e outros genes de virulência que são responsáveis por algumas moléstias, entre as quais a síndrome do choque tóxico (UBEDA et al., 2007).

Muitos fatores de virulência dos estafilococos estão ligados à parede celular e são geralmente mencionados como fatores de superfície ou somáticos. Tais fatores são importantes, principalmente, na interação do microrganismo com o hospedeiro durante o processo inicial de colonização (adesão e invasão), nos mecanismos de evasão (fuga) das defesas do hospedeiro e na modulação da resposta imune. Além disso, esses microrganismos podem secretar uma ampla variedade de proteínas conhecidas como exoproteínas (SALYERS & WHITT,

2002). Como exemplo de um produto de superfície, podemos citar as diversas proteínas que se ligam às moléculas de adesão que reconhecem a matriz extracelular, as quais são agrupadas sob a sigla MSCRAMM (do inglês: *microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*) (TON-THAT & SCHNEEWIND, 1999). Uma função importante das MSCRAMM é promover a aderência bacteriana às proteínas solúveis presentes no plasma, como fibrinogênio, fibronectina, colágeno e outras. Como muitas proteínas plasmáticas podem se ligar a superfícies de material plástico e outras superfícies lisas, a ligação da bactéria a estas proteínas possibilita, por sua vez, sua fixação a biomateriais durante a infecção no hospedeiro. Tal propriedade é importante em processos patogênicos associados a infecções de natureza nosocomial, envolvendo, por exemplo, o uso de cateteres e próteses médicas, podendo levar a processos infecciosos graves, como bacteremias e infecções disseminadas, principalmente no caso de cateteres endovenosos (TON-THAT & SCHNEEWIND, 1999).

É conhecido também que as toxinas superantigênicas são detectadas em clones de MRSA adquiridos em hospitais (FERRY et al., 2005) e funcionam como fatores que garantem a patogenicidade destes microrganismos. A leucocidina Panton-Valentine é uma toxina citolítica que atinge células mononucleares e polimorfonucleares, causando morte celular por necrose ou apoptose (BOYLE-VAVRA & DAUM 2007). Esta toxina resulta do sinergismo de duas proteínas, LukS-PVL e LukF-PVL codificada pelos genes *lukS* e *lukF*, respectivamente, ambos com os genes carregados por bacteriófagos (SAID-SALIM et al., 2005). A PVL é responsável pela necrose do tecido pulmonar e inflamação rara, freqüentemente fatal e causadora da pneumonia necrosante (LABANDEIRA et al., 2007). Este fato alertou a população mundial quando, em 1982 e no início dos anos 90, foram relatadas mortes de quatro crianças com pneumonia necrosante sem qualquer contato com o ambiente hospitalar (SAID-SALIM et al., 2003).

Por outro lado, um dos grandes problemas da medicina moderna é a utilização crescente de procedimentos cada vez mais invasivos e agressivos, como, por exemplo, dispositivos médicos implantáveis. Neste caso, não são apenas os *S. aureus* - bactéria que apresenta uma grande variedade de fatores de virulência, os responsáveis pelas infecções crônicas associadas a biopolímeros. Outros estafilococos, principalmente os *S. epidermidis*, além de colonizarem, também infectam pacientes fisiologicamente imunocomprometidos, como recém-natos

prematturos, pacientes idosos ou pacientes que apresentam doença de base causadora de imunossupressão, além de usuários de drogas ilícitas injetáveis e pacientes submetidos à terapia imunossupressora. Estudos demonstraram que os *S. epidermidis* estão entre os microrganismos que mais causam septicemia em neonatos dentre os estafilococos coagulase negativa - ECN (CUNHA et al., 2002; RAIMUNDO et al., 2002; BRADFORD et al., 2006).

Biofilme

Para muitos pacientes, a implantação de materiais médicos, como válvulas e próteses, pode salvar vidas. Contudo, tal procedimento acarreta considerável risco de infecção e, embora o risco de infecção varie entre 1 e 7%, o impacto deste implante pode ser ainda maior, já que infecções a ele associadas estão diretamente ligadas a cirurgias de repetição e terapia prolongada com antibióticos (SAGINUR et al., 2006). No Brasil, esse risco é ainda maior, conforme relatado por Rosenthal e colaboradores (2006), que observaram que as taxas de infecção associadas a dispositivos médicos em Centros de Terapia Intensiva (CTI) em países em desenvolvimento são mais altas do que em países desenvolvidos (ROSENTHAL et al., 2006).

Tanto os *S. aureus* quanto os *S. epidermidis* são as espécies patogênicas mais significantes dentre as bactérias gram-positivas que formam o biofilme (PARSEK & SENGH, 2002). A chave para a patogenicidade deste tipo de infecção associada a materiais médicos é a aderência bacteriana à superfície de próteses e a formação de biofilme (SAGINUR et al., 2006).

O biofilme pode ser definido como uma estrutura comunitária de células bacterianas protegida por uma matriz polissacarídica ou protéica, auto-fabricada pelas cepas e aderente tanto a superfícies inertes como a vivas. As bactérias se comunicam dentro desta estrutura através da elaboração e do reconhecimento de pequenas moléculas; tal mecanismo é conhecido como *quorum sensing* (SAGINUR et al. 2006). Este sistema de interação entre as bactérias é regulado pelo locus *agr* (CAFISO et al., 2007).

O sistema *agr*, observado inicialmente em *S. aureus*, funciona como um sensor de densidade populacional (VUONG et al., 2004). O locus *agr* em *S. aureus* é composto por genes acessórios *agrA*, *agrB*, *agrC* e *agrD* e de uma região de

transcrição para o RNA III, molécula reguladora do locus, a qual também codifica para a δ -toxina (*hld*) (VAN WAMEL et al., 1998). Esse operon é muito similar em *S. epidermidis*, apresentando tamanho entre três e cinco Kb e 68 % de similaridade. O sistema *agr* em *S. epidermidis* pode estar envolvido na formação do biofilme através da regulação da expressão da autolisina *atlE*, que parece estar relacionada à adesão primária da superfície de polímeros (LI et al., 2004).

Outro fator modulador da virulência estafilocócica é a proteína reguladora transcricional SarA. Esta proteína está intimamente relacionada ao desenvolvimento do biofilme em *S. aureus*. Experimentos realizados com mutantes do gene *sarA* em *S. aureus* demonstraram diminuição na transcrição do operon *ica*, que codifica enzimas para síntese do polissacarídeo conhecido como PIA (*polysaccharide intercellular adhesin*), principal componente do biofilme (CHEUNG & MANA, 2005). Da mesma forma, estudos com uma cepa mutante de *S. epidermidis* apresentando inativação por inserção no gene *sarA*, observaram uma diminuição da transcrição do operon *icaADBC* (CONLON, HUMPHREYS & O'GARA, 2004). Conseqüentemente, a mutação do *sarA* provocou significativo decréscimo da produção de PIA, demonstrando sua influência na produção de biofilme.

Enquanto o microambiente sem biofilme pode ser heterogêneo onde as cepas competem por espaço em condições variáveis, com limitação nutricional, dessecação, exposição a agentes químicos tóxicos, radiação UV e mudanças de pH e temperatura, no ambiente do biofilme elas encontram proteção e estabilidade ambiental. Assim, a formação de biofilme apresenta-se como uma estratégia fácil para a sobrevivência do microrganismo em ambiente hostil (STOODLEY & STOODLEY, 2005).

Até o momento, a regulação da formação de biofilme é pouco entendida, mas sabe-se que é complexa multifatorial e didaticamente dividida em duas fases. Na fase inicial, as cepas estafilocócicas se aderem a superfícies, o que é mediado por vários fatores: alteração do ácido teicóico, como a redução da esterificação da D-alanina, provocando aumento da estabilidade de aderência ao poliestireno (GROSS et al., 2001). Assim, logo após a implantação de um dispositivo médico, o material composto de polímeros é rapidamente recoberto por proteínas plasmáticas e pela matriz extracelular como fibronectina, fibrinogênio, vitronectina e trombospondina (VUONG & OTTO, 2002). Este material, depositado na

superfície do polímero, facilita a colonização pelos patógenos. Além desta ligação bacteriana indireta ao polímero, ligações diretas não específicas da bactéria ao polímero também podem ocorrer, principalmente devido a interações eletrostáticas e hidrofóbicas, como interações de Van der Waals, promovidas por proteínas bacterianas de superfície e pelo PIA (ZIEBUHR et al., 2000).

Várias proteínas parecem estar envolvidas nessa etapa inicial de formação de biofilme, dentre elas as autolisinas, AtlE para os *S. epidermidis* e Atl para os *S. aureus* (FITZPATRICK, HUMPHERYS & O'GARA, 2005 a). Estas proteínas apresentam alta similaridade, sendo codificadas por gene cromossômico específico (HEILMAN et al., 1997). A proteína AtlE possui 1.335 aminoácidos e é composta por um peptídeo N-terminal simples, um pró-peptídeo (PP), um domínio amidase de 60 kDa, três ligações catiônicas fortes e um domínio glicosaminidase de 52 kDa. Estudos complementares demonstraram que apenas a produção da amidase foi suficiente para restaurar o fenótipo positivo do biofilme e a separação completa da célula, sugerindo ser a amidase uma proteína que pode estar envolvida na produção de biofilme em *S. epidermidis* (VANDECASTELLE et al., 2003). Ainda não foi completamente esclarecido como a proteína AtlE possui esta capacidade de ligação específica a superfícies, mas estudos com mutantes do gene *atlE* mostraram que estes apresentaram reduzida aderência primária ao poliestireno, baixa atividade de ligação à vitronectina *in vitro* e reduzida hidrofobicidade. Provavelmente, por este motivo, estas cepas não formaram biofilme no poliestireno, demonstrando redução na virulência (TAKAHASHI et al., 2002).

Uma proteína de superfície que também parece estar associada à produção de biofilme é a chamada Bap (*biofilm-associated protein*), observada em cepas de *S. aureus* envolvidas em infecções de glândulas mamárias bovinas. O gene *bap* está contido em uma ilha de patogenicidade (SaPIbov2) e codifica para uma proteína com 2.276 aminoácidos que atua na primeira fase de aderência à superfície (CUCARELLA et al., 2004). A proteína Bhp (*Bap homologue protein*) de 258 kDa parece exercer uma função semelhante em cepas humanas de *S. epidermidis*, ou seja, ligação célula a célula, aderência a superfícies lisas e produção de biofilme (TORMO & KNECHT, 2005).

Na segunda fase, a bactéria ligada (direta ou indiretamente) à superfície do polímero produz e acumula um material polissacarídico, extracelular, amorfo e mucóide: o biofilme (GOTZ, 2002). Além do PIA, aparentemente proteínas

também estão envolvidas nesta fase de acumulação. Um importante exemplo é a proteína de 140 kDa associada à acumulação-Aap (*accumulation-associated protein*). Estudos com cepas de *S. epidermidis* mutantes, que não expressam o gene *aap*, demonstraram que sua ausência reduz drasticamente esta fase (HUSSAIN et al., 1997). Adicionalmente, foi verificado que o tratamento de *S. epidermidis* com anticorpos monoclonais anti-Aap levou à redução na espessura do biofilme formado (SUN, ACCATIVVI & BRYERS, 2005). Outro trabalho ressaltou a importância do gene *aap* na produção de biofilme juntamente com o gene *atlE*, mostrando que a maior parte das cepas de MRSE (*S. epidermidis* resistentes à meticilina) produtoras de biofilme possuía estes dois genes além do operon *ica*, sendo que todas as cepas deste estudo classificadas como fortemente aderentes possuíam o gene *aap* (DE ARAUJO et al., 2006).

O glicocálix bacteriano desempenha papel preponderante na fase de formação do biofilme. É referido como PIA e composto por um polímero de N-acetilglucosamina. A biossíntese do PIA é controlada pelo operon *ica* (MAIRA-LÍTRAN et al., 2002), que é composto pelos genes *icaADBC*, responsáveis pela síntese propriamente dita e pelo gene *icaR* (gene repressor). Além do operon *ica*, outros genes também parecem estar envolvidos na regulação da síntese do biofilme em *S. epidermidis*, entre eles o *TcaR*, regulador associado ao locus de teicoplanina (KNOBLOCH et al., 2004), reguladores adicionais como *SarA*, já descrito anteriormente e o fator σ^B (fator relacionado ao estresse bacteriano). Tais fatores parecem ser menos importantes em *S. aureus* (VALLE et al., 2003; KNOBLOCH et al., 2004).

Além dos mecanismos de regulação descritos acima, outros mecanismos também podem afetar a biossíntese do PIA. Assim, a variação fenotípica na produção de biofilme é causada por diferentes mecanismos como o controle da síntese do PIA pela alternância da inserção e excisão do elemento *IS256*, que pode levar à regulação no nível de transcrição do *ica* (*dow-regulation*) ou através de uma mutação randômica em cepas estafilocócicas com *IS256* negativa (NILSDOTTER-AUGUSTINSSON et al., 2007), que pode explicar o encontro de cepas que possuem o operon *ica* e não produzem biofilme. (DE ARAUJO et al., 2006; NILSDOTTER-AUGUSTINSSON et al., 2007).

Antigamente a presença do operon *ica* era relacionada como o principal fator de produção de biofilme; entretanto, estudos recentes demonstram que

mesmo cepas estafilocócicas que não possuem o complexo *icaADBC* conseguem produzir biofilme. Assim, acredita-se que, embora o complexo *ica* desempenhe um importante papel na produção de PIA, sua presença não é condição necessária à formação de biofilme. Estes dados levam à proposta da existência de duas vias para a produção de biofilme: a via *ica*-dependente e a via *ica*-independente (FITZPATRICK, HUMPHREYS & O’GARA, 2005 b; ROHDE et al., 2005).

Fatores ambientais também estão associados à formação de biofilme, entre eles a glicose, cujo aumento induz a produção de biofilme (DOBINSKY et al., 2003); a limitação de oxigênio (CRAMTON et al., 2001), pois sabe-se que o crescimento anaeróbico estimula a formação deste polímero aderente; a depleção de ferro, apontada como estímulo à produção de biofilme, visto que, sob baixas concentrações de ferro, todas as amostras estudadas produziram biofilme e, à medida que foi adicionado ferro ao meio, houve uma significativa diminuição da formação deste polissacarídeo (JOHNSON et al., 2005). Outro fator estimulante que tem sido descrito é a presença de heparina, que aumenta a interação célula a célula (SHANKS et al., 2005). Além disso, a ativação do operon *ica* pelo etanol é *icaR* dependente, pois o etanol, em altas concentrações, age direta e indiretamente na repressão, regulando tanto a transcrição como a pós-tradução do *icaR* (CONLON, HUMPHREYS & O’GARA, 2002).

Foi sugerido anteriormente que a proximidade entre as bactérias dentro do biofilme maduro poderia facilitar as trocas horizontais de informações genéticas, incluindo genes com resistência a antimicrobianos e determinantes de virulência (KLINGENBERG et al., 2005). Estudos têm também sugerido que o acúmulo de biofilme poderia ainda afetar a resistência bacteriana aos antimicrobianos por dificultar o acesso da droga (KLINGENBERG et al., 2005). Por outro lado, dados indicam que a ação do sistema imune em bactérias, no ambiente do biofilme, encontra-se da mesma forma dificultada (GOTZ, 2002).

Resistência a antimicrobianos

Nas décadas de 80 e 90, a prevalência dos MRSA em infecções nosocomiais aumentou em vários países (TEIXEIRA et al., 1995; CHAMBERS, 1997). Desde então, o MRSA tem representado um grave problema de saúde pública devido à multirresistência aos antimicrobianos e, inclusive, à resistência aos antissépticos e desinfetantes frequentemente associada a estas cepas (AL-

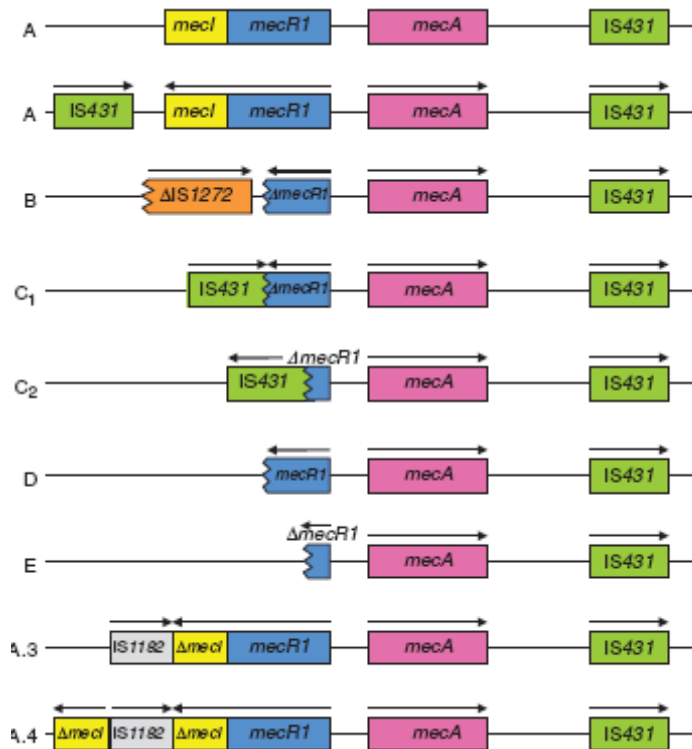
MASSAUD, DAY & RUSSEL, 1991; MIYAZAKI et al, 2007).

Pouco tempo depois da introdução da penicilina na terapêutica das infecções estafilocócicas, surgiram cepas de *Staphylococcus* resistentes a este antibiótico pela produção de β -lactamases, enzimas capazes de hidrolisar o anel β -lactâmico dessa classe de antimicrobiano. Diante da necessidade de se aperfeiçoar novas drogas resistentes à ação das β -lactamases, foram desenvolvidas as penicilinas semi-sintéticas (JEVONS, COE & PARKER, 1963). Desta forma, dois são os principais mecanismos de resistência aos antibióticos β -lactâmicos apresentados pelos estafilococos clinicamente significantes: (i) a inibição da penicilina pela produção de β -lactamase e (ii) a resistência intrínseca, que envolve a produção de uma nova PBP (penicillin-binding protein), a PBP2a, que apresenta uma diminuição de sua afinidade à maioria dos antibióticos β -lactâmicos. A PBP2a catalisa a transpeptidação e carboxipeptidação do peptidoglicano da parede celular bacteriana, assumindo as funções das PBPs normais dos estafilococos, quando a bactéria resistente se encontra na presença de antibióticos β -lactâmicos (HIRAMATSU et al., 2002). Esta PBP2a é codificada pelo gene *mecA*, o qual confere resistência à meticilina ou a outras penicilinas semi-sintéticas, como a oxacilina. O *mecA* é um segmento de DNA de 2,1 kb, que se encontra inserido em um grande bloco de DNA exógeno (ITO et al., 2001) conhecido como elemento *mec* ou cassete cromossômico estafilocócico *mec* (SCC*mec*; *staphylococcal cassette chromosome mec*).

O SCC*mec* é um elemento genético móvel, integrado ao cromossomo dos MRSA em um sítio específico (*attB_{sc}*), localizado próximo à origem de replicação dos *S. aureus*, flanqueado por seqüências diretas e repetidas. Este segmento de DNA, variando entre 21 e 67 kb, carrega o gene *mecA* e os genes *mecR1* e *mecI*, que codificam o indutor MecR e a proteína repressora MecI. Outros genes múltiplos de resistência, além da meticilina, também podem ser aí encontrados (OLIVEIRA et al., 1998). Ito e colaboradores, em 2003, descreveram cinco diferentes tipos de SCC*mec* (I-V) definidos pela combinação de duas partes: o complexo *ccr* e o complexo *mec*. Os cinco alótipos do complexo *ccr* têm sido nomeado como *ccrAB1*, *ccrAB2*, *ccrAB3*, *ccrAB4* e *ccrC*. Cinco classes do complexo *mec* também têm sido descritas. As diferentes estruturas são: Classe A, *mecI-mecR-mecA-IS431*; Classe B, *IS1272-mecRI-mecA-IS431*; Classe C1e C2, *IS431-mecR1-mecA-IS431*; Classe D, *mecR1-mecA-IS431*; Classe E, *mecR1-*

mecA-IS431(existe uma deleção de 967- bp na membrana do domínio do *mecR1* comparado com a classe D).

O esquema abaixo é uma representação ilustrativa das diferentes estruturas do complexo *mec* descrito por HANSSSEN & SOLLID, 2005



Esquema 1. Classes do complexo *mec* em estafilococo: *mecI* gene repressor, *mecR* gene indutor. As setas indicam a direção da transcrição (HANSSSEN & SOLLID, 2005).

De acordo com Ito e colaboradores (2003), os cinco diferentes tipos de SCC*mec* são denominados SCC*mec* tipo I (classe B do complexo *mec* e *ccrAB* tipo I); SCC*mec* tipo II (classe A do complexo *mec* e *ccrAB* tipo 2); SCC*mec* tipo III (classe A do complexo *mec* e *ccrAB* tipo 3); SCC*mec* tipo IV (classe B do complexo *mec* e *ccrAB* tipo 2) e SCC*mec* tipo V (classe C2 do complexo *mec* e *ccrC*). Adjacente a estas duas regiões (*mec* e *ccr*), está a região J, parte não essencial dos componentes do SCC*mec*. Variantes de cada tipo de SCC*mec* são definidas pela diferença na região J (HANSSSEN & SOLLID, 2005).

No final de 2006, outro tipo SCC*mec* foi proposto - o tipo VI. Cepas características deste tipo possuem o complexo *mecB*, o *ccrAB* alótipo 4 e uma

região específica J1. Quinze cepas de MRSA contendo SCCmec tipoVI foram inicialmente descritas no hospital Dona Estefânia (Lisboa) e outras quatro cepas foram encontradas em outros três hospitais, sendo dois também situados em Lisboa e outro em Coimbra (OLIVEIRA, MILHEIRIÇO & DE LENCASTRE, 2006).

Os SCCmec tipos I, IV e V não contêm nenhum outro gene de resistência a antibióticos, exceto o *mecA*. Porém, um subtipo do SCCmec tipo IV, subtipo IVc carrega o *Tn4001*, que confere resistência à maioria dos aminoglicosídeos; o SCCmec tipo II carrega o transposon *Tn554*, que confere resistência à eritromicina (*ermA*); o *pUB110* substituído por um par de elementos *IS431* confere resistência à kanamicina e à tobramicina; o SCCmec tipo III contém *Tn554*, pseudo Ψ *Tn554* e uma cópia integrada do *pT181* (*tetK*, resistência à tetraciclina) e também *pI 258*, que carrega resistência ao mercúrio (HANSSEN & SOLLID, 2005).

Tipagem Genotípica de *Staphylococcus*

A análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico através da eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) é amplamente utilizada em estudos epidemiológicos de infecções causadas por várias espécies bacterianas que possuem importância clínica. Este método é uma excelente fonte de identificação da emergência e do subsequente espalhamento de novos clones. Cabe ressaltar que essa técnica possui uma grande reprodutibilidade interlaboratorial que pode ser utilizada para identificação do mesmo clone em diferentes lugares (CARRIÇO et al., 2005).

Por outro lado, a técnica de Multilocus Sequence Typing (MLST) foi recentemente desenvolvida e tem sido usada com sucesso para análise clonal epidemiológica de *Neisseria meningitidis* (FEIL et al., 1999), *Streptococcus pneumoniae* (ENRIGHT & SPRATT, 1988), *Staphylococcus aureus* (ENRIGHT et al., 2000), *Streptococcus pyogenes* (ENRIGHT et al., 2001), *Campylobacter jejuni* (DINGLE et al., 2002), *Salmonella enterica* (KOTRETISHIVILLE et al., 2002) e *Enterococcus faecium* (HOMAN et al, 2002).

Em diversos países do mundo estão disseminadas cepas de MRSA geneticamente muito semelhantes ou até mesmo iguais quanto ao padrão de PFGE (*pulsed-field gel electrophoresis*), MLST tipo SCCmec, polimorfismos *coa* (que codifica para coagulase) e *spa* (que codifica para proteína A).

Os principais clones encontrados causando infecções nosocomiais são:

clone Ibérico (ou USA-500), inicialmente detectado em um surto no Hospital Bellvitge em Barcelona, Espanha, em 1989 (DOMINGUES et al., 1994). Posteriormente, este mesmo clone foi detectado em hospitais em Portugal, além de hospitais na Escócia, Itália, Bélgica, Finlândia, Eslovênia, Suécia, França, Alemanha e na cidade de Nova York, EUA (ROBERTS et al., 1998; SÁ-LEÃO et al., 1999; GOMES et al., 2001; MURCHAN et al., 2003). Em 1999, Sá-Leão e colaboradores descreveram a disseminação de outro clone específico de MRSA (clone pediátrico ou USA-800) em pacientes pediátricos internados em hospitais em Portugal, Polônia, Argentina, Colômbia e em Nova York, EUA (GOMES et al., 2001; DA SILVA COIMBRA et al., 2003). Outro clone de MRSA, denominado clone Nova York/Japonês (ou USA-100), geneticamente relacionado ao clone pediátrico, mas apresentando um SCC mec tipo II, foi descrito inicialmente como disseminado em Nova York e Tóquio e posteriormente detectado em vários hospitais localizados em diferentes estados norte-americanos (DA SILVA COIMBRA et al., 2003). Atualmente, este é o clone de MRSA mais encontrado em hospitais nos EUA (BERGLUND et al., 2005). Outro clone também bastante disseminado nos EUA e na Europa é o EMRSA-16 ou USA-200 (DEURENBERG et al., 2006).

No Brasil foi relatado um clone multirresistente de *S. aureus*, nomeado clone epidêmico brasileiro (CEB). Foi encontrado inicialmente em extensa área geográfica, abrangendo de Manaus a Porto Alegre - 5.300 km (TEIXEIRA et al., 1995). Posteriormente, este clone também foi encontrado em hospitais de outros países como Argentina, Uruguai, Paraguai, Polônia, Chile, Portugal, Itália, República Tcheca e China (DA SILVA COIMBRA et al., 2000; AIRES DE SOUZA et al., 2001; MELTER et al., 1999; AIRES DE SOUZA et al., 2001; CAMPINILE et al., 2001).

Infelizmente, a resistência bacteriana não está restrita apenas ao ambiente hospitalar. Recentemente observou-se a presença de clones de MRSA causando infecções em pacientes da comunidade. Os primeiros relatos de MRSA comunitário (CA-MRSA) foram descritos na Austrália, na década de 80, em pacientes de comunidades remotas (UDO et al., 1993). As amostras foram isoladas de pacientes aborígenes que haviam sido hospitalizados e residiam em uma comunidade isolada a centenas de quilômetros de qualquer cidade ou hospital e diferiam das amostras de MRSA previamente isoladas em hospitais do oeste

australiano e conseqüentemente denominadas WA-MRSA (*Western Australian* MRSA) (UDO et al., 1993). Hoje este clone é também conhecido como WA-1, apresenta SCC*mec* IV, ST-1 e não carrega os genes que codificam para leucocidina Pantón-Valentine (PVL). Riley e colaboradores, em 1995, descreveram uma mudança na epidemiologia das cepas de MRSA isoladas na Austrália, atualmente conhecidas pelas siglas OSPC ou SWPC (*Oceania Southwest Pacific Clone* ou *Southwest Pacific Clone*), SCC*mec* IV e ST-30. Em 1998, Herold e colaboradores observaram que o número de crianças hospitalizadas devido a infecções por CA-MRSA nos Estados Unidos estava aumentando. Em 1999 surgiram relatos de infecções causadas por CA-MRSA na França.

As cepas de CA-MRSA são geralmente susceptíveis a antibióticos outros que os β -lactâmicos. Análises feitas através de géis de PFGE mostraram que cepas de CA-MRSA pertencem a tipos clonais não relacionados a clones isolados em hospitais (NAIMI et al., 2001). Além disso, a técnica de MLST demonstrou que os CA-MRSA têm maior diversidade clonal que os HA-MRSA (ENRIGHT et al., 2002). Embora cepas de CA-MRSA geralmente possuam SCC*mec* tipos IV ou V (ITO et al., 2003), estudos com cepas de HA-MRSA possuindo tipo SCC*mec* tipo IV já foram relatados (TRINDADE et al., 2005).

A primeira reportagem de infecções causadas por cepas de CA-MRSA isoladas no Brasil foi publicada em 2005 (RIBEIRO et al., 2005). Neste artigo, foram isoladas três cepas; duas obtidas de dois pacientes da comunidade, presentes na pele e em infecções associadas a tecidos moles, incluindo furunculose e a outra cepa foi obtida de fluido de um paciente com artrite séptica. Os três pacientes não tiveram contato com o hospital antes de apresentarem estas infecções, não possuíam história anterior de isolados de MRSA, hospitalização ou cirurgia no ano anterior, o que poderia ser justificado se as cepas pertencessem a um clone comunitário. Estas cepas apresentaram SCC*mec* tipo IV, genes para a codificação da PVL, da enterotoxina e da gama-hemolisina, que estreita a semelhança entre estas cepas com as CA-MRSA, classificadas como WA-1, encontradas no EUA, no Pacífico e em alguns países da Europa (RIBEIRO et al., 2005).

Um dado interessante que tem sido observado é que clones descritos em cepas do tipo SCC*mec* IV, oriundas de indivíduos sãos da comunidade, estão sendo encontrados em vários isolados hospitalares (LAPLANA et al., 2007). Estudos epidemiológicos de infecção com CA-MRSA têm mostrado uma rápida

disseminação global destes clones. Em anos recentes, alguns laboratórios ligados a hospitais começaram a isolar tipos de CA-MRSA em ambiente hospitalar. Na Espanha, clones de MRSA USA-300 e USA-400 foram descritos como causadores de infecção hospitalar (WENZEL, BEARMAN & EDMOND, 2007).

Atualmente tem sido relatada uma grande resistência de MRSA à clindamicina e à eritromicina. Um exemplo deste fato é que cepas de MRSA apresentaram na Colômbia uma resistência de 94% tanto para eritromicina quanto para clindamicina, ao passo que para MRSE a taxa é de 78,6% para eritromicina e de 60,7% para clindamicina (REYES et al., 2007). Sabe-se que a resistência à clindamicina pode ser induzida pela eritromicina. Este fato pode ser visualizado *in vitro* através da realização do teste D, que consiste numa deformação do halo de inibição da clindamicina (o halo apresenta o formato da letra D) na presença de eritromicina. Um estudo do ano de 2007 mostrou que, dentre os estafilococos estudados resistentes à eritromicina e sensíveis à clindamicina, 70,9% apresentaram indução na resistência à clindamicina quando da realização do teste D (YILMAZ et al., 2007).

O uso intensivo, e por vezes abusivo, de antimicrobianos tem sido a principal força evolucionária a impelir a emergência e ampla disseminação dos MRSA como patógenos hospitalares (HA-MRSA) e, mais recentemente, como agentes de infecções comunitárias (CA-MRSA). É interessante ressaltar que os HA-MRSA freqüentemente apresentam SCC_{mec} tipo II ou III maiores e carregam vários genes de resistência; por isso, devem ter sido selecionados pelo intenso “bombardeio” de antimicrobianos nos hospitais (OLIVEIRA, MILHEIRIÇO & DE LENCASTRE, 2002). Assim, está se tornando cada vez mais difícil combater infecções por MRSA, restando para tal poucas opções terapêuticas. Como conseqüência, a vancomicina tem sido utilizada para o tratamento de infecções por HA-MRSA causadas por alguns poucos clones específicos, uma vez que cepas pertencentes a estes clones de MRSA freqüentemente apresentam múltipla resistência aos antimicrobianos (CHANG et al., 2003; SAID-SALIM, MATHEMA & KREISWIRTH, 2003). Outra droga usada no combate às cepas multirresistentes é a linezolida. Trata-se de um antibiótico da classe das oxazolidinonas, que age inibindo a síntese das proteínas bacterianas por ligar-se à subunidade 50s e que, geralmente, apresenta excelente atividade contra gram-positivos, inclusive os resistentes à meticilina e à vancomicina (CHANG et al., 2003; SAID-SLIM et al.,

2003). Apesar de serem drogas de uso exclusivamente hospitalar, a resistência de MRSA à linezolida e à vancomicina já foi descrita (PEETERS & SARRIA, 2005; TOH et al., 2007).

O primeiro clone de MRSA que apresentou resistência intermediária à vancomicina (VISA) foi identificado em pacientes no Japão, em 1996. Em junho de 2002, oito infecções por VISA foram identificadas nos Estados Unidos. Nesta mesma data, o primeiro clone de *Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina (VRSA) foi identificado em Michigan, EUA (CHANG et al., 2003). No Brasil, a primeira cepa de MRSA resistente à vancomicina foi relatada em 2005 (PALLAZO, ARAUJO & DARINI, 2005). A base genética para a resistência estafilocócica à vancomicina ainda não foi claramente elucidada.

Da mesma forma que os *S. aureus*, os ECN passaram a apresentar resistência aos antimicrobianos. Cerca de 68% de cepas de ECN coletadas em pacientes com quadro de septicemia, entre 1999 e 2006, num hospital da Turquia, apresentou resistência à meticilina (KOKSAL, YASAR & SAMATSI, 2007). Dentre os ECN, os *Staphylococcus epidermidis*, que são os microrganismos mais envolvidos em infecções hospitalares, também apresentam alta resistência à meticilina, podendo chegar a valores que variam entre 60 e 80% (SANTOS et al., 2000).

Em estudo recentemente realizado em um hospital em Niterói (Hospital Universitário Antônio Pedro - HUAP), verificou-se que os MRSE também são bastante resistentes a outros antimicrobianos que não os β -lactâmicos (De ARAUJO et al., 2006). Estudos realizados por KOKSAL e colaboradores (2007) descrevem os ECN com elevadas taxas de resistência, sendo que algumas cepas apresentaram resistência também à vancomicina e à teicoplanina.

Vale a pena ressaltar que o uso da terapia diária intravenosa de linezolida e de quinupristin-dalfopristina, antibióticos alternativos contra cepas estafilocócicas resistentes aos glicopeptídeos, pode chegar a US\$ 320,00 por paciente, tornando o tratamento contra infecções por MRSA cada vez mais caro e difícil (MELO SASAKI & GRINBAUM, 2007).

Conforme as considerações expostas anteriormente, as mudanças nos perfis de sensibilidade aos antimicrobianos e as alterações na epidemiologia das infecções causadas por MRSA e MRSE mostram a necessidade de estudos destas cepas nos hospitais. Estes estudos devem avaliar o relacionamento genético, além

de certas características, como a produção de fatores de virulência (a produção de biofilme e da PVL) e a resistência destas cepas frente aos antimicrobianos mais utilizados na clínica médica.

OBJETIVO GERAL

Estudar as cepas de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* encontradas no Hospital Universitário Antônio Pedro quanto ao perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos, ao relacionamento genético e à capacidade de formar biofilme.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar a susceptibilidade das cepas bacterianas frente aos antimicrobianos utilizados na prática clínica contra infecções estafilocócicas, através da técnica de difusão da droga em ágar a partir de discos;
2. Estudar a expressão de biofilme nas cepas de *S. aureus* e *S. epidermidis* através do método fenotípico quantitativo de aderência a placas de poliestireno;
3. Avaliar o relacionamento genético das cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina utilizando a técnica de eletroforese em campo pulsado (PFGE);
4. Classificar o elemento de resistência genética SCC *mec* nas cepas de *S. aureus*;
5. Verificar a expressão de leucocidina Pantón-Valentine nas cepas comunitárias de *S. aureus*.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Coleta e identificação das amostras

Foram obtidas 120 cepas de *Staphylococcus* do Hospital Universitário

Antônio Pedro (HUAP) oriundas de pacientes internados. Destas, foram estudadas 64 cepas de *Staphylococcus* resistentes à meticilina, sendo 43 classificadas como *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) e 21 como *Staphylococcus epidermidis* resistentes à meticilina (MRSE). Dentre as cepas de MRSA, 7 eram de colonização da nasofaringe, enquanto as outras 36 foram coletadas de processos infecciosos, das quais 23 eram da corrente sanguínea, 4 de ponta de cateter, 2 de secreções cutâneas e 1 de cada um dos seguintes locais: lavado brônquico, urina, escarro, ferida cirúrgica, cordão umbilical, secreção de lesão óssea e aspirado traqueal.

Entre os MRSE, todas as 21 cepas eram de processos infecciosos, sendo 16 provenientes da corrente sanguínea, 3 de pontas de cateter, 1 de secreção purulenta e 1 de lavado brônquico.

Todas as cepas foram previamente identificadas pelo método automatizado VITEK (BioMérieux Vitek, Inc.). A confirmação da identificação inicial realizada no HUAP foi feita no Laboratório de Identificação Bacteriana (INCQS, Fiocruz), onde inicialmente os testes de catalase e coagulase (SLIDEX STAPH PLUS, BioMérieux, França) foram realizados. Em seguida, as amostras foram submetidas ao teste semi-automatizado Api Staph (20500/20509; Lab. BioMérieux, La Balmeles-Grottes, França).

2. Teste de susceptibilidade a antimicrobianos (teste de difusão em meio sólido)

A susceptibilidade a antimicrobianos foi verificada utilizando a técnica de difusão em meio sólido a partir de discos impregnados com antimicrobianos, de acordo com as recomendações do CLSI (2006). Para tal, as amostras foram cultivadas em 3 mL de TSB (Tryptone Soy Broth) por 18 h a 37 °C. A partir dessa cultura, preparou-se um inóculo em salina estéril, com turvação equivalente a 0,5 da escala McFarland (10^8 UFC/mL). O inóculo padronizado foi espalhado homogeneamente com auxílio de um *swab* estéril, em placas contendo ágar Mueller-Hinton (Merck, USA), de modo a se obter crescimento confluyente. Em seguida, os discos contendo os antimicrobianos foram aplicados sobre a superfície semeada e as placas incubadas por 18 h a 35 °C. A leitura do diâmetro do halo de inibição de crescimento formado pelos discos contendo oxacilina, cefoxitina e vancomicina foi realizada após 24 h de incubação. Foram utilizados discos

contendo os seguintes antimicrobianos: penicilina G (10U), trimetropina (1,25µg) + sulfametoxazol (23,75µg), gentamicina (10µg), tetraciclina (30µg), eritromicina (15µg), clindamicina (2µg), cloranfenicol (30µg), oxacilina (1µg), ciprofloxacino (5µg), rifampicina (5µg), teicoplanina (30µg), cefoxitina (30µg) e vancomicina (30µg) (Cecon Ltda., São Paulo, SP, Brasil) e mupirocina (5µg) (Oxoid, Fisher Scientific International, Inc). Para o controle do teste, a cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25925 foi utilizada como padrão.

3. Teste de aderência e formação de biofilme

Para a detecção de biofilme foram utilizadas placas para microtitulação de fundo plano, compostas de poliestireno inerte, contendo 96 poços (Nunclon; Nunc InterMed). As cepas analisadas foram semeadas por esgotamento em meio TSA (Tripsine Soy Agar) e incubadas por 24 h a 37 °C. Após esse período, as colônias foram repicadas para tubos contendo TSB suplementado com 1% (p/v) de glicose e incubadas por 18/24 h com agitação. Em seguida, as culturas foram diluídas em TSB suplementado com 1% (p/v) de glicose e em cada 4 poços foram aplicados 200 µL de uma mesma cultura. Posteriormente, as placas foram incubadas por 20 h a 37 °C. A densidade ótica provocada pelo crescimento bacteriano (DO_c) foi determinada em leitor de ELISA a 595nm. Após esta leitura, a placa foi lavada duas vezes com solução salina e as bactérias fixadas à placa a 65 °C por 1 h. Em seguida, 200 µL de solução de cristal violeta para gram foram adicionados a cada poço, por 1 min. A placa foi então lavada duas vezes com água destilada estéril e a água evaporada a 60 °C. A densidade ótica do biofilme (DO_b) foi medida a 595 nm e as cepas classificadas segundo Amaral, Coelho & Flores, 2005. *S. epidermidis* 70D e *Streptococcus pyogenes* 75194 foram usados como controle positivo e negativo do teste, respectivamente. O critério para classificação da produção de biofilme foi baseado nos resultados obtidos para o controle negativo (*S. pyogenes*). A unidade de biofilme (UB) foi calculada usando a fórmula DO_b/DO_c . Assim, tomando-se por base a medida de UB para o *S. pyogenes* como 0,115, as cepas de *S. aureus* e *epidermidis* que apresentaram $UB < 0,230$ foram definidas como não aderentes e as que apresentaram resultados iguais ou maiores que 0,230 foram classificadas como aderentes e discriminadas conforme segue: $0,230 \leq UB < 0,460$ como fracamente aderentes; $0,460 \leq UB < 0,920$ como moderadamente aderentes e $UB \geq 0,920$ como fortemente aderentes (AMARAL , COELHO &

FLORES, 2005).

4. Caracterização molecular dos *Staphylococcus aureus* resistentes à metilicina

4.1. Extração do DNA total:

A extração de DNA total foi realizada como descrito por Pacheco (1997). Após incubação por 24 h a 37 °C, algumas colônias isoladas em placas com TSA foram removidas e diluídas em 3 mL de TE (1,0 ml de Tris 1mM pH 7,4; 0,2 mL de EDTA 1mM pH 8,0; 98,8 mL de água bidestilada). A seguir, 400 µL desta suspensão foram adicionados a 3,6 mL de água bidestilada (diluição 1:10) e a densidade ótica (DO_{600nm}) medida. Com auxílio da fórmula abaixo, obteve-se o volume necessário da suspensão de células para a fervura.

$$\text{Fórmula: DO encontrada} \frac{\text{---} \times 200 \mu\text{L}}{0,4 \text{---} \times}$$

O volume calculado da suspensão de células em TE foi transferido para um Eppendorff e centrifugado em seguida por 2 min a 12.000 xg. Posteriormente, o sobrenadante foi removido e o sedimento ressuspense em 200 µL de TE. A amostra foi então fervida por 10 min e após centrifugação por 1 min a 12.000 xg, o sobrenadante foi removido e transferido para outro Eppendorff, para ser estocado a – 20 °C.

4.2. Polimerase Chain Reaction (PCR) multiplex para tipagem da ilha de resistência SCC_{mec} e PCR para a detecção do gene para Leucocidina Pantone Valentine (PVL).

Para a amplificação de regiões específicas do genoma das cepas estudadas, a PCR foi realizada em um volume final de 25 µL. As reações individuais foram compostas de água esterilizada (qsp 25 µL), 2,5 µL tampão de reação 10 vezes concentrado, 0,625 µL de enzima Taq DNA polimerase (0,125 U, Gibco), 2 µl de mistura de dNTPs (200 µM concentração final de cada), 1 µL de cada iniciador envolvido na reação (0,01 µM, concentração final de cada) e 5 µL do DNA . Os iniciadores utilizados nestes experimentos estão descritos na tabela 1. A reação de amplificação foi realizada em um termociclador GeneAmp PCR System 2400 (*PE Applied Biosystems*), programado para desnaturação inicial de 95 °C por 5 min, 30

ciclos de 94 °C por 30 seg, 55 °C por 1 min, 72 °C por 1 min e extensão final de 72 °C por 7 min. Os fragmentos de DNA amplificados foram submetidos à eletroforese convencional, em gel de agarose a 1,5% (p/v), utilizando tampão TAE 1X (Tris-acetato, 40 mM; EDTA 1 mM, pH 8,0) a 90 V por 1 h e 30 min. A uma alíquota de 2 µL do marcador de corrida “123 ladder” (Invitrogen) foi adicionado um volume igual do corante de corrida contendo glicerol (azul de bromofenol a 0,25% (p/v); xileno-cianol FF a 0,25% (p/v); glicerol a 30% (p/v) em água), sendo o volume total aplicado em uma canaleta do gel. A cada alíquota de 10 µL do produto da PCR foram acrescentados, separadamente, 5 µL do corante de corrida para DNA. As diluições foram então aplicadas em diferentes canaletas e submetidas à eletroforese, em gel de agarose a 1,5% (p/v) em tampão TAE 1x (Tris-acetato, 40 mM; EDTA 1mM, pH 8,0), a 90 V por 1 h e 30 min. Após este período, o gel foi tratado com brometo de etídio a 0,5% (p/v) e os fragmentos de DNA visualizados em transiluminador de luz ultravioleta. O registro do padrão de bandas produzidas pela eletroforese foi feito através de fotografia, empregando-se o filme Polaroid 667 (SAMBROOK, FRITSCH & MANIATIS, 1989).

As reações em cadeia da polimerase multiplex foram realizadas de acordo com Oliveira, Tomasz & De Lencastre (2002) para os seguintes loci pertencentes aos diferentes SCC*mec* descritos (Tabela 1): locus A, específico para o SCC*mec* do tipo I; locus B, identificado especificamente no SCC*mec* do tipo II; locus C, encontrado nos SCC*mec* dos tipo II e III; locus D, presente nos SCC*mec* dos tipos I, II e IV; locus E, específico para o SCC*mec* do tipo III; locus F, também específico para o tipo III; locus G e locus H utilizados para diferenciar os SCC*mec* dos tipos I e III dos tipos IA e IIIA, respectivamente. Finalmente, o gene *mecA* foi utilizado como controle interno da reação de PCR. Os *primers* utilizados para amplificar essas regiões foram anteriormente descritos por Oliveira, Tomasz & De Lencastre (2002).

4.3. Análise dos Perfis de Fragmentação do DNA Cromossômico através de Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE)

O DNA cromossômico foi preparado pela técnica de uso *in situ*, em blocos de agarose. Resumindo, uma alíquota de 2 mL do crescimento bacteriano

em fase exponencial foi centrifugada em 9000 rpm por 5 min. Foi adicionada à suspensão de células 250 µL de agarose (*low melting*, FMC) a 2% (p/v) em tampão PIV (NaCl 1M; TRIS-HCl 10 mM pH 7,6) a 50 °C. A mistura foi homogeneizada e distribuída em moldes. Os blocos foram então transferidos para tubos contendo 4 ml de solução de lise (NaCl 1 M; TRIS-HCl 6 mM pH 7,6; EDTA 100 mM pH 8,0; BRIJ-58 0,5% (p/v), desoxicolato 0,2% (p/v); sarcosina 0,5% (p/v), lisozima 1 mg/mL e lisostafina 10 U por cepa e incubados a 37 °C por 24 h. Em seguida, o tampão de lise foi substituído pelo tampão ESP (EDTA 0,5 M pH 8,0; sarcosina 1% p/v) contendo 0,1 mg/mL de proteinase K (Sigma) e os blocos incubados por 18 h a 50 °C. Os blocos foram lavados 4 vezes com tampão TE (TRIS-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 0.1 mM pH 8,0) a 37 °C e então incubados com 10 U da enzima de restrição *SmaI* (Amersham) durante 24 h a 25 °C. Os fragmentos de restrição foram separados em gel de agarose (Amersham) a 1,1% (p/v), preparado em tampão TBE 1x (TRIS 44,5 mM; ácido bórico 44,5 mM; EDTA 1 mM, pH final 8,3) através da eletroforese de campo pulsado, usando o aparelho CHEF-DR III (Bio-Rad, Richmond, USA). Foram utilizadas as seguintes condições para a eletroforese: tempo de pulso crescente de 5 a 35 segundos, por 24 h a 6 V/cm, na temperatura de 13 °C, com ângulo de 120° para *S. aureus*. Após a eletroforese, os géis foram corados com brometo de etídio (0,5 µg/mL), observados e fotografados no Image Master VDS (Pharmacia Biotech).

As cepas que apresentaram o mesmo perfil eletroforético com diferença de até seis bandas foram assinaladas como pertencentes a um único clone e receberam uma letra maiúscula única. As cepas apresentando mais de seis bandas de diferença foram consideradas clones diferentes e receberam letras maiúsculas diferentes (TENOVER, 1995).

5. Análise estatística

A análise estatística utilizada para testar as hipóteses formuladas a partir dos resultados obtidos neste trabalho foi o teste de hipóteses do qui-quadrado. Adotamos como nível de confiança 95% ($\alpha= 0,05$).

Tabela 1. Descrição da seqüência dos iniciadores utilizados neste trabalho e o tamanho do amplicon

LÓCUS	INICIADOR	TAMANHO DO AMPLICON (pb)	SEQUÊNCIA	TIPO DO SCC <i>mec</i>
A	CIF2 F2 CIF 2 R2	495	TTCGAGTTGCTGATGAAGAAGG ATTTACCACAAGGACTACCAGC	I
B	KDP F1 KDP R1	284	AATCATCTGCAATTGGTGATGC CGAATGAAGTGAAAGAAAGTGG	II
C	MECI P2 MECI P3	209	ATCAGACTTGCATTCAGGC GCGGTTTCAATTCACCTTGTC	II, III
D	DCS F2 DCS R1	342	CATCCTATGATAGCTTGGTG GCGGTTTCAATTCACCTTGTC	I, II, IV
E	RIF4 F3 RIF4 R9	243	GTGATTGTTTCGAGATATGTGG CGCTTTATCTGTATCTATCGA	III
F	RIF5 F10 RIF5 R13	414	TTCTTAAGTACACGCTGAATCG GTCACAGTAATTCCATCAATGC	III
G	IS431 P4 Pub110 R1	381	CAGGTCTCTTCAGATCTACG GAGCCATAAACACCAATAGCC	I A
H	IS431 P4 PT181 R1	303	CAGGTCTCTTCAGATCTACG GAAGAATGGGGAAAGCTTCAC	III A
<i>Mec A</i>	MECA P4 MECA P7	162	TCCAGATTACAACCTTCACCAGG CCACTTCATATCTTGTAACG	Padrão Interno
<i>luK</i>	PVL-1 NPVL-2	406	ATCCGAGAGACTATTTTGTGC CATCAACCTTTTCTCACTTAC	Em geral, IV e V

Lócus A específico para o SCC*mec* do tipo I; lócus B específico para SCC*mec* do tipo II; lócus C encontrado nos SCC*mec* dos tipo II e III; lócus D presente nos SCC*mec* dos tipos I, II e IV; lócus E específico para o SCC*mec* do tipo III; lócus F também específico para o tipo III; lócus G e lócus H utilizados para diferenciar os SCC*mec* dos tipos I e III dos tipos IA e IIIA, respectivamente. O gene *mecA* foi utilizado como controle interno da reação de PCR. O gene *luK* foi verificado nas cepas comunitárias de MRSA.(Oliveira, Tomasz & De Lencastre (2002)).

RESULTADOS

1. Identificação das cepas estafilocócicas resistentes à meticilina

Neste estudo, foram utilizadas apenas as cepas de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* que apresentaram ter a mesma identificação tanto no Api Staph quanto no Vitek. Todas as cepas de MRSA utilizadas nesta dissertação também apresentaram resultado positivo para coagulase e catalase. Já as cepas de MRSE apresentaram resultado positivo para catalase e negativo para coagulase. Desta forma, das 120 cepas obtidas do laboratório de microbiologia do HUAP, apenas 64 foram classificadas como MRSA (43 cepas) e MRSE (21 cepas).

2. Caracterização dos *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina.

2.1. Susceptibilidade dos MRSA aos antimicrobianos utilizados na clínica

Na análise do perfil de susceptibilidade antimicrobiana dos 43 MRSA analisados, foi observado que a resistência à eritromicina estava presente na maioria das cepas de MRSA estudadas (40/43 ou 93%), seguida da resistência à clindamicina (38/43 ou 88%), à ciprofloxacino (35/43 ou 81 %), à gentamicina (33/43 ou 77 %), ao cloranfenicol (26/43 ou 61 %), ao sulfametoxazol + trimetoprima (17/43 ou 40 %), à tetraciclina (10/43 ou 23 %), à mupirocina (3/43 ou 7%) e à rifampicina (1/43 ou 2%) (Figura 1).

Todas as cepas apresentaram sensibilidade à vancomicina, à linezolida e à teicoplanina. Uma resistência intermediária foi verificada em 13 (30%) cepas, sendo 7 (16%) à tetraciclina, 4 ao ciprofloxacino (9%) e 3 ao cloranfenicol (7%). Cabe ressaltar que as cepas 13/04, 90/05 e 102/05 apresentaram resistência intermediária a dois ou mais antibióticos concomitantemente.

Também foi verificado que a maioria das cepas estudadas apresentou resistência a três ou mais classes de antimicrobianos além dos β -lactâmicos (38/43 ou 88%; Tabela 2).

A resistência à meticilina foi verificada através dos discos de oxacilina 1 μ g e cefoxitina 30 μ g. Foi observada a presença de colônias bacterianas dentro do halo de sensibilidade em 4 cepas (133/05, 52/06, 57/06 e 84/06) quando usado disco de oxacilina. Quando a resistência à oxacilina foi constatada através de discos com 30 μ g de cefoxitina, os diâmetros dos halos de inibição de crescimento variaram entre 0 e 18 mm.

Não foi verificada indução da resistência à clindamicina pela eritromicina na cepa 48/06, única cepa de *S. aureus* que era resistente à eritromicina e sensível à clindamicina.

2.2. Produção de biofilme

Os resultados sobre a expressão de biofilme pelas cepas de MRSA provenientes de pacientes infectados ou colonizados do HUAP são apresentados na tabela 2. Das 43 cepas de MRSA testadas, 7 (16%) foram classificadas como não aderentes, ou seja, não produtoras de biofilme. Assim, as 36 (84%) cepas de MRSA utilizadas neste estudo foram consideradas produtoras de biofilme e classificadas como: (i) fracamente aderentes: 23% ou 10/43; (ii) moderadamente aderentes: 26% ou 11/43 e (iii) fortemente aderentes: 35% ou 15/43.

Das 7 cepas de MRSA isoladas de colonização da nasofaringe, 2 não produziram biofilme (29%), 3 foram classificadas como fracas produtoras (43%), 1 como produtora moderada (14%) e 1 como forte produtora (14%). Das 36 cepas isoladas de quadros infecciosos, apenas 5 (14%) foram classificadas como não produtoras, sendo 2 cepas oriundas da corrente sanguínea, 1 de urina, 1 de ponta de cateter e 1 de aspirado traqueal. Dentre as 31 cepas restantes, 7 (23%) foram classificadas como produtoras fracas e foram obtidas de infecção de corrente sanguínea, 10 (32%) cepas foram classificadas como produtoras moderadas sendo obtidas dos seguintes sítios: sangue (6), escarro (1), secreção cutânea (1), secreção de lesão óssea (1) e ferida na pele (1). As 14 cepas de MRSA restantes (45%) foram classificadas como fortemente produtoras de biofilme; destas, 9 cepas foram obtidas de corrente sanguínea, 3 de ponta de cateter, 1 de *swab* umbilical e 1 de lavado brônquico.

2.3. Análise dos Perfis de Fragmentação do DNA Cromossômico e Clonalidade Através de Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE)

Através da técnica de PFGE, foram detectados dentre as 43 cepas de *S. aureus* 14 clones, identificados como A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, L, M, N e O. Os complexos clonais A e B foram predominantes, ambos com 14 representantes (32,6%). As cepas pertencentes ao complexo clonal A apresentavam padrão de PFGE semelhante ao apresentado pela amostra representativa do clone epidêmico brasileiro (CEB), clone largamente disseminado nos hospitais brasileiros e em diversos outros países.

As cepas do clone B se diferenciaram por mais de 6 bandas do complexo clonal A, apresentando relação clonal com cepas designadas como USA-400,

amplamente disseminado nos EUA, causando infecções tanto em hospitais como em pele e tecidos moles de indivíduos saudáveis da comunidade. As cepas deste estudo pertencentes ao clone B diferiram do padrão USA-400 por apresentarem 4 bandas diferentes. Estas cepas não apresentaram subtipos conforme os critérios de Tenover (1995).

As amostras 20/06, 48/06, 52/06 e 57/06 foram alocadas no clone C (Figura 2) por se diferenciarem em mais de 6 bandas do Complexo clonal A e do Clone B. Estes padrões de PFGE apresentam relação clonal aparentemente com o clone pediátrico (Figura 2).

Outras 11 cepas foram identificadas como cepas esporádicas por não apresentarem semelhança no padrão de PFGE com nenhum outro clone já descrito.

2.4. Tipagem da ilha *mec*

Das 43 amostras de MRSA, apenas 2 cepas (4,7%) foram classificadas como SCC*mec* tipo I e pertenciam a clones esporádicos; 1 cepa (2,35%) apresentou SCC*mec* tipo II, sendo classificada também como clone esporádico; 18 cepas (41,9%) foram classificadas como SCC*mec* tipo III, pois os genes *rif5* (414 pb), *rif4* (243 pb) e *mecI* (209 Kb) foram amplificados (Figura 3). As outras 22 cepas restantes foram tipificadas como SCC*mec* tipo IV. Destas, 4 eram esporádicas, 14 pertenciam ao complexo clonal USA-400, clone descrito inicialmente como causador de infecções comunitárias e 4 pertenciam ao suposto complexo clonal pediátrico. Na figura 2 pode ser verificado o fragmento de 342 pares de base (pb) referente ao locus DCS. A ausência dos produtos de PCR para os locus KDP (284 pb) e CIF2 (495 pb) também foi verificada, confirmando que estas cepas possuem SCC*mec* tipo IV. O *mec A* foi utilizado como padrão interno da reação.

2.5. Detecção genotípica da leucocidina Panton-Valentine (PVL) em cepas de MRSA USA-400

Pelo fato do gene *lukF*, que codifica para a subunidade F da PVL, ser descrito na maior parte das vezes em cepas comunitárias, sua detecção foi realizada nas cepas pertencentes ao clone USA-400. Não foi verificada a amplificação do gene *lukF* em nenhuma das 15 cepas pertencentes ao clone B analisadas (Figura 4).

3.0. Caracterização dos *Staphylococcus epidermidis* resistentes à meticilina.

3.1. Susceptibilidade dos MRSE aos antimicrobianos utilizados na clínica.

Ao se estudar o perfil de susceptibilidade antimicrobiana dos MRSE analisados, foi observada grande resistência à eritromicina (19/21 ou 90%), seguida de clindamicina (14/21 ou 67%), ciprofloxacino (9/21 ou 43 %), sulfametoxazol + trimetoprima (8/21 ou 31%), gentamicina (7/21 ou 33%), mupirocina e cloranfenicol (6/21 ou 29%), tetraciclina (3/21 ou 14%) e rifampicina (1/21 ou 5%). Nenhuma cepa resistente à vancomicina, à linezolida e à teicoplanina foi detectada (Tabela 3).

Resistência intermediária foi observada em 13 (62%) cepas, sendo 7 (33%) ao cloranfenicol, 5 (24%) à gentamicina, 2 (10%) ao ciprofloxacino, 2 (10%) ao sulfametoxazol + trimetoprima e 1 à eritromicina (5%). Cabe ressaltar que as cepas 51/04, 15/05, 24/05, 110/05, 08/06, 43/06 apresentaram resistência intermediária a dois ou mais antibióticos concomitantemente. Também foi verificado que a maioria das cepas estudadas apresentou resistência a três ou mais classes de antimicrobianos além dos β -lactâmicos (16/21 ou 76%) (Tabela 3).

A resistência à meticilina foi verificada através de discos de oxacilina 1 μ g e cefoxitina 30 μ g. Quando a resistência à oxacilina foi constatada através de discos com 30 μ g de cefoxitina, o diâmetro dos halos variou entre 0 e 19 cm.

Através do teste do qui-quadrado verificou-se que não há diferença estatisticamente significativa entre as cepas de MRSA e MRSE e a multirresistência.

3.2. Produção de Biofilme

Os resultados sobre a expressão de biofilme pelas cepas de MRSE provenientes de pacientes infectados ou colonizados do HUAP estão apresentados na tabela 3. Das 21 cepas de MRSE testadas, 10 (48%) foram classificadas como não aderentes, ou seja, foram consideradas como não produtoras de biofilme. Assim, 11 (52 %) cepas do HUAP foram produtoras de biofilme, recebendo a seguinte classificação: fracamente aderente 14% (3/21), moderadamente aderente 10% (2/11) e fortemente aderente 28 % (6/11).

Das 10 cepas não produtoras de biofilme, todas foram coletadas de infecções da corrente sanguínea. Entre as outras 11 cepas restantes, 3 foram

classificadas como produtoras fracas e oriundas de sangue (2) e de lavado brônquico (1). 2 cepas foram classificadas como produtoras moderadas e colhidas 1 da ponta de cateter e uma da corrente sanguínea. Dentre as 6 restantes que foram classificadas como produtoras fortes, 3 vieram da corrente sanguínea, 2 de ponta de cateter e 1 de secreção purulenta.

4. Análise Estatística na comparação da produção de biofilme

Ao se utilizar o teste do qui-quadrado no intervalo de confiança de 95% para comparar se há diferença entre os MRSA e os MRSE no que diz respeito à produção de biofilme constatou-se que há uma diferença estatisticamente significativa entre a produção de biofilme dos 2 grupos ($p= 0,0077$). No entanto, se compararmos a aderência entre os principais clones de MRSA deste trabalho, o USA-400 e o CEB, vemos que não há diferença estatisticamente significativa entre as cepas que produzem e as que não produzem biofilme nestes 2 grupos, aparentando ter ambos clones uma significativa produção de biofilme.

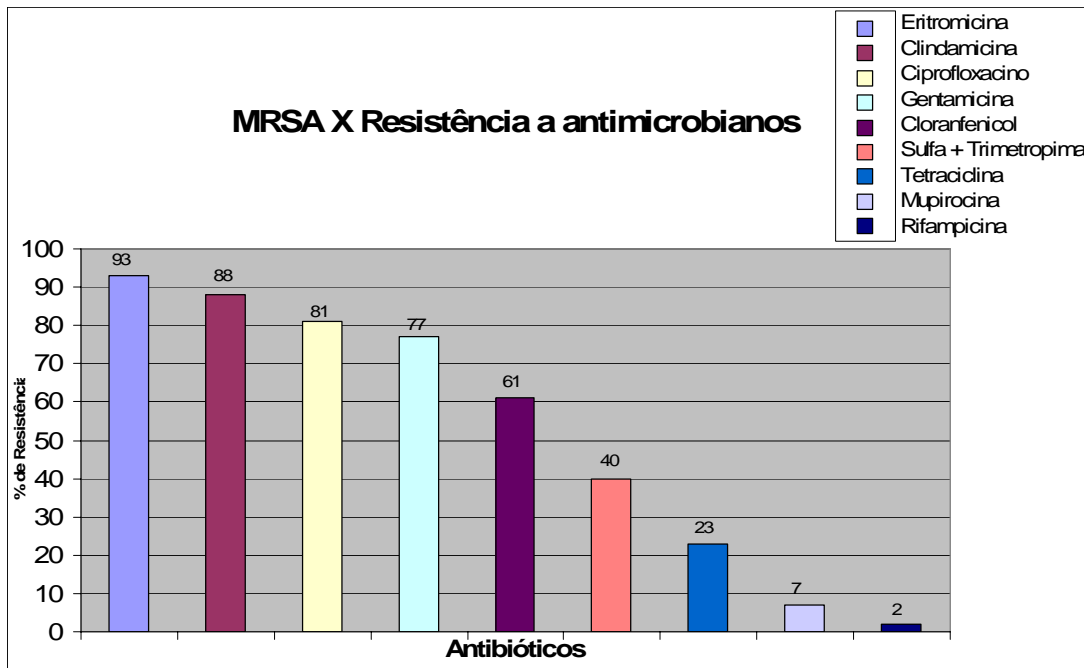


Figura 1. Perfil de resistência de 43 cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina frente aos antimicrobianos usados na clínica.

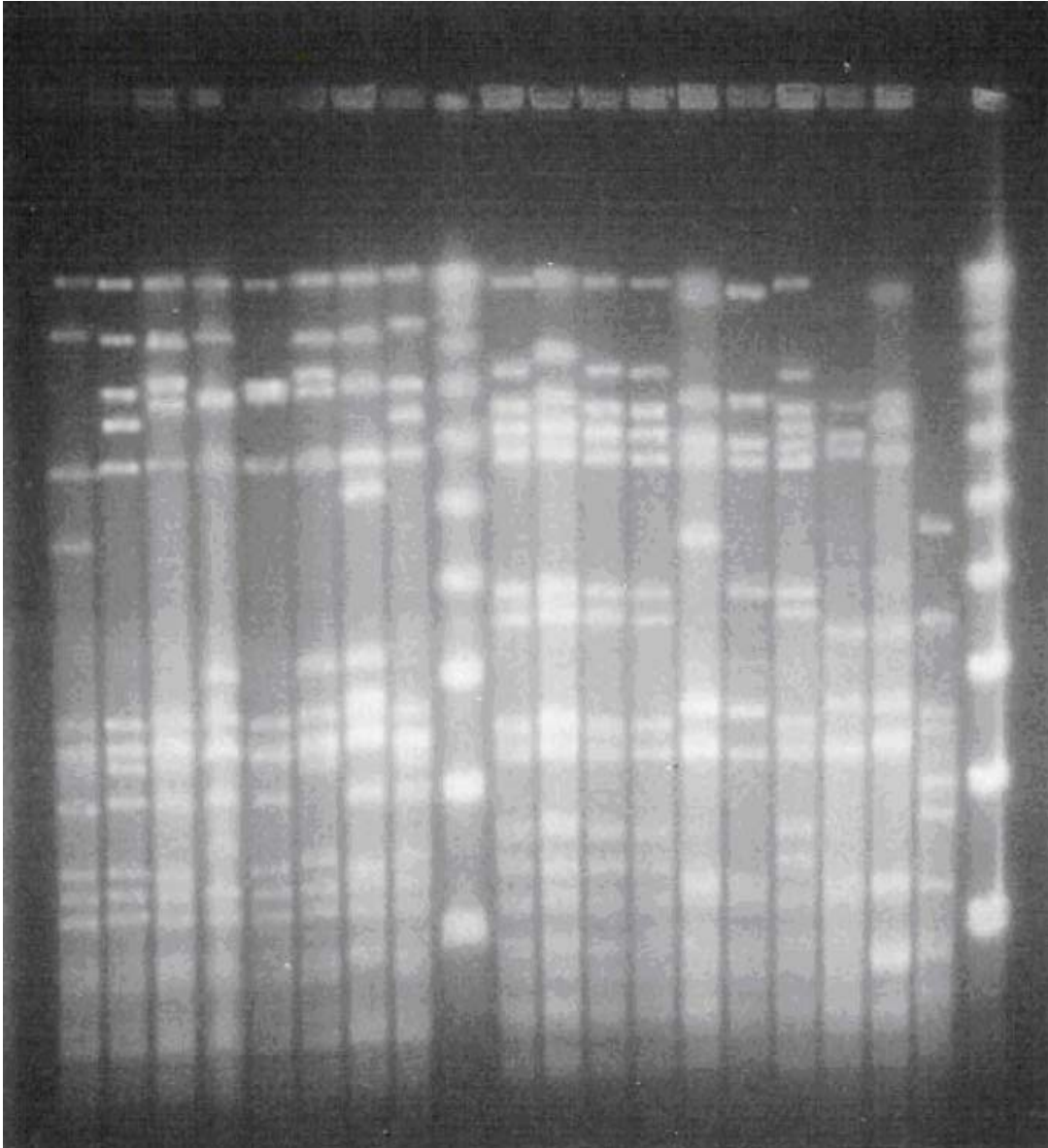


Figura 2. Perfis eletroforéticos obtidos pela metodologia de PFGE mostrando o complexo clonal A (CEB), o Clone B (USA-400), o clone C (possivelmente relacionado com o clone pediátrico) e o Clone H (esporádico). Linha 1, 54/04, clone A; linha 2, 90/05, clone A; linha 3, 32/04, clone A; linha 4, 21/04, clone A; linha 5, 74/05, clone A; linha 6, 27/06, clone A; linha 7, 04/05, clone A; linha 8, Padrão do CEB(A1,9393); linha 9, Peso molecular (Lambda ladder); linha 10, 96/05, clone B; linha 11, Padrão USA-400; linha 12, 101/05, clone B; linha 13, 97/05, clone B ; linha 14, Padrão USA-100; linha 15, 20/06, clone C; linha 16, 48/05, clone C ; linha 17 , 52/06, clone C; linha 18, 57/06, clone C; linha 19 , 02/06, clone H; linha 20, Peso molecular (Lambda ladder).

1 2 3 4 5 6 7 8

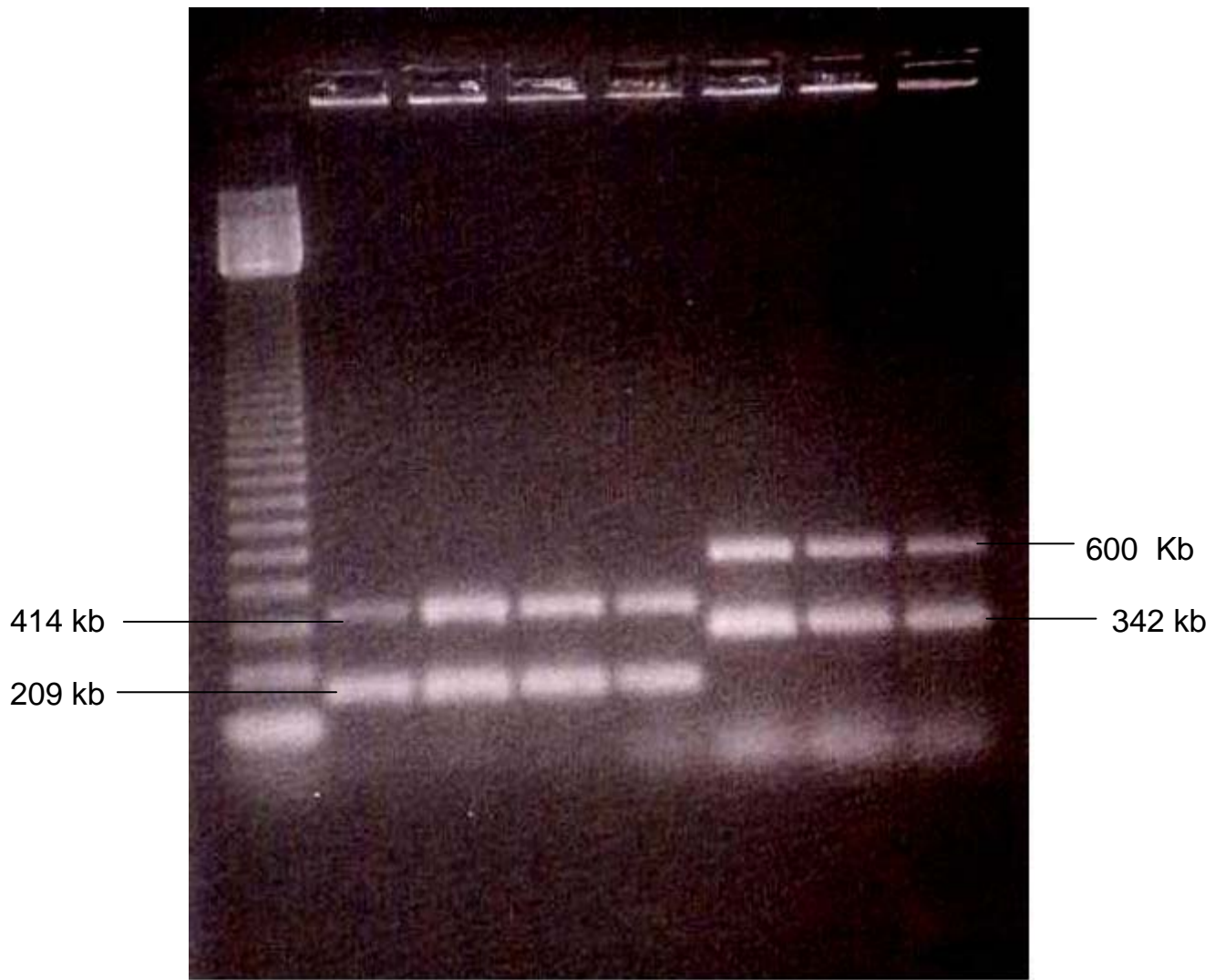


Figura 3. Amplificação dos genes Rif 5 (414 Kb) e Mec I (209 Kb) que codificam SCCmec tipo III, Dcs (342 Kb) e Mec A(600Kb) que codificam SCCmec tipo IV . Linha 1: Padrão de peso molecular (*low mass*); linha 2: 13/04, tipo III; linha 3: 29/04, tipo III; linha 4: 30/04, tipo III; linha 5: 32/04, tipo III; linha 6: 69/05; tipo IV; linha 7: 89/05, tipo IV; linha 8: 02/06, tipo IV.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

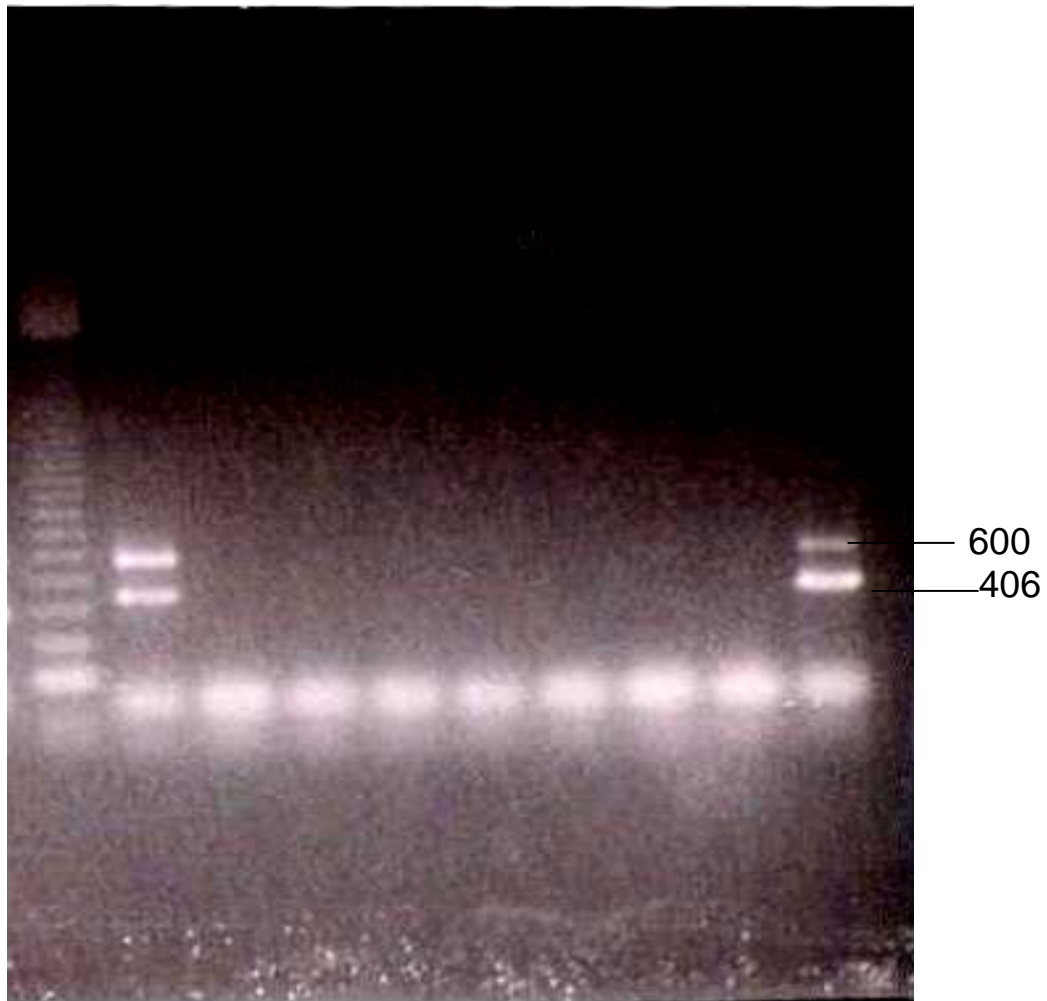


Figura 4. Amplificação do gene *lukF* que codifica para PVL.

Linha 1: Padrão de peso molecular (*low mass*); linha 2: Padrão USA-400; linha 3: 107/05; linha 4: 117/05; linha 5: 133/05; linha 6: 106/05; linha 7: 105/05; linha 8: 96/06; linha 9: 6505; linha 10: WB69 (padrão positivo).

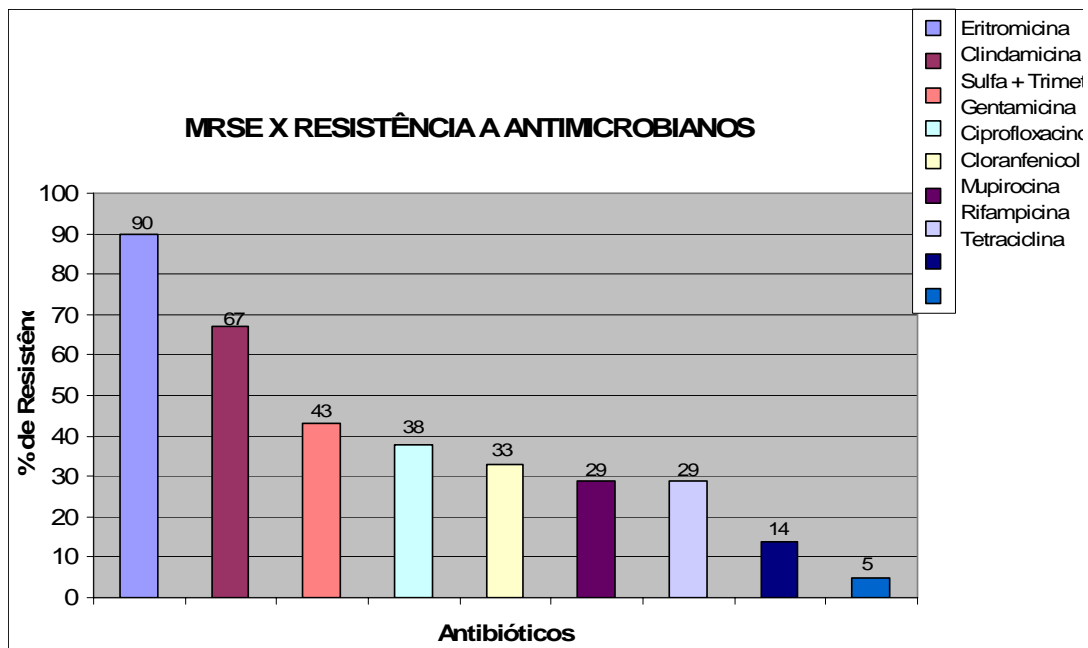


Figura 5. Perfil de resistência de 21 cepas de *Staphylococcus epidermidis* resistentes à meticilina frente aos antimicrobianos usados na clínica.

Tabela 2. Resultados da clonalidade, tipagem do SCC *mec* e produção de biofilme e perfil de resistência das cepas de MRSA

CEPA	ORIGEM	CLONE	SCC <i>mec</i> tipo	UB	Classificação	Resistência
13/04	Lavado brônquico	A	III	2.130	Produtora forte	CLO, GENT, ERI, SUT, FOX, CLIND

21/04	Escarro	A	III	0.460	Produtora moderada	CIP, CLO, GENT, ERI, FOX, CLIND, TETRA
29/04	Cateter	A	III	1.880	Produtora forte	CIP, CLO, GENT, ERI, SUT, FOX, CLIND
30/04	Swab umbilical	A	III	1.750	Produtora forte	CIP, CLO, GENT, ERI, SUT, FOX, CLIND, TETRA
32/04	Sangue	A	III	0.240	Produtora fraca	CIP, CLO, GENT, ERI, SUT, FOX, CLIND, TETRA
54/04	Sangue	A	III	1.060	Produtora forte	CIP, CLO, GENT, ERI, SUT, FOX, CLIND, TETRA
55/04	Sangue	A	III	0.510	Produtora moderada	CIP, CLO, GENT, ERI, SUT, FOX, CLIND, TETRA
04/05	Sangue	A	III	1.090	Produtora forte	CIP, GENT, MUP, ERI, SUT, FOX, CLIND
74/05	Sangue	A	III	1.970	Produtora forte	CIP, CLO, GENT, ERI, SUT, FOX, CLIND, TETRA
90/05	Sangue	A	III	2.152	Produtora forte	CLO, GENT, ERI, SUT, FOX, CLIND
102/05	Cateter	A	III	1.64	Produtora forte	GENT, RI, SUT, FOX, CLIND, TETRA
130/05	Sangue	A	III	0.440	Produtora fraca	CIP, GENT, RIF, ERI, SUT, FOX, CLIND, TETRA
24/06	Sangue	A	III	0.720	Produtora moderada	CIP, GENT, ERI, SUT, FOX, CLIND
27/06	Sangue	A	III	0,750	Produtora moderada	CIP, GENT, ERI, SUT, FOX, CLIND
65/05	Sangue	B	IV	1.440	Produtora forte	CIP, CLO, GENT, ERI, FOX, CLIND
69/05	Sangue	B	IV	0.770	Produtora moderada	CIP, CLO, GENT, ERI, FOX, CLIND
89/05	Sangue	B	IV	2.222	Produtora forte	CIP, CLO, ERI, FOX, CLIND
96/05	Cateter	B	IV	0.90	Produtora forte	CIP, CLO, GENT, ERI, FOX, CLIND
105/05	Swab de nasofaringe	B	IV	0.380	Produtora fraca	CIP, GENT, ERI, FOX, CLIND
106/05	Swab de nasofaringe	B	IV	0.390	Produtora fraca	CIP, CLO, GENT, ERI, FOX, CLIND
107/05	Cateter	B	IV	0.110	Não produtora	CIP, CLO, GENT, ERI, SUT, FOX, CLIND

A complexo clonal do CEB, B complexo clonal do USA-400 e C parece ser o complexo clonal do clone Pediátrico e de D-O clones esporádicos.

Considerando U.B. < 0,230 não produtor, 0,230 ≤ U.B. < 0,460 produtor fraco, 0,460 ≤ U.B. < 0,920 produtor moderado e U.B. ≥ 0,920 produtor forte. Sendo UB Unidade de Biofilme.

CIP: ciprofloxacino, CLO: cloranfenicol, GENT: gentamicina, RIF: rifampicina, MUP: mupirocina, ERI: eritromicina, SUT: Sulfametazol+Trimetropim, FOX: cefoxitina, TET: tetraciclina, CLIN: clindamicina.

117/05	Sangue	B	IV	0.360	Produtora fraca	CIP, CLO, GENT, ERI, FOX, CLIND
133/05	Aspirado traqueal	B	IV	0.100	Não produtora	CIP, FOX
35/06	Sangue	B	IV	0.690	Produtora moderada	CIP, CLO, ERI, FOX, CLIND
50/06	Sangue	B	IV	0.450	Produtora fraca	CIP, CLO, ERI, FOX, CLIND

58/06	Secreção cutânea	B	IV	0.260	Produtora fraca	CIP, CLO, ERI, FOX, CLIND, TETRA
97/05	Sangue	B	IV	0.380	Produtora fraca	CIP, CLO, GENT, ERI, FOX, CLIND
101/05	Swab de nasofaringe	B	IV	0.190	Não produtora	CIP, CLO, GENT, ERI, FOX, CLIND
20/06	Sangue	C	IV	1.660	Produtora forte	GENT, FOX
48/06	Secreção cutânea	C	IV	0.500	Produtora moderada	ERI, FOX,
52/06	Swab de ferida cirúrgica	C	IV	0.490	Produtora moderada	CIP, CLO, GENT, ERI, FOX, CLIND
57/06	Swab de nasofaringe	C	IV	1.140	Produtora forte	ERI, FOX, CLIND
05/04	Secreção da nasofaringe	D Esporádico	II	0.240	Produtora fraco	MUP, FOX, CLIND
56/04	Sangue	E Esporádico	IV	0,710	Produtora moderada	CIP, OXA, PEN, GENT, MUP, ERIFOX, CLIND, TET
129/05	Sangue	F Esporádico	III	0.060	Não produtor	CIP, CLO, GENT, ERI, SUT, FOX, CLIND
85/05	Secreção da lesão óssea	G Esporádico	IV	0,510	Produtora fraca	CIP, OXA, PEN, ERI, FOX, CLIND, TET
02/06	Sangue	H Esporádico	IV	0.160	Não produtora	CIP, CLO, ERI, FOX, CLIND
11/06	Swab de nasofaringe	I Esporádico	III	0.900	Produtora moderada	CIP, ERI, FOX, CLIND
15/06	Sangue	J Esporádico	I	0.300	Produtora fraca	GENT, ERI, SUT, FOX
49/06	Sangue	L Esporádico	III	2.180	Produtora forte	CIP, GENT, ERI, SUT, FOX
54/06	Sangue	M Esporádico	IV	1.622	Produtora forte	CIP, ERI, FOX, CLIND
95/06	Urina	N Esporádico	I	0.150	Não produtora	CIP, CLO, GENT, ERI, FOX, CLIND
84/06	Swab de nasofaringe	O Esporádico	III	0.090	Não produtora	CIP, CLO, GENT, ERI, FOX, CLIND

A complexo clonal do CEB, B complexo clonal do USA-400 e C parece ser o complexo clonal do clone Pediátrico e de D-O clones esporádicos.

Considerando U.B. < 0,230 não produtor, $0,230 \leq$ U.B. < 0,460 produtor fraco, $0,460 \leq$ U.B. < 0,920 produtor moderado e U.B. \geq 0,920 produtor forte. Sendo UB Unidade de Biofilme.

CIP: ciprofloxacino, CLO: cloranfenicol, GENT: gentamicina, RIF: rifampicina, MUP: mupirocina, ERI: eritromicina, SUT: Sulfametazol+Trimetopim, FOX: ceftoxitina, TET: tetraciclina, CLIN: clindamicina.

Tabela 3. Resultados da produção de biofilme e perfil de resistência de MRSE

Cepa	Origem da cepa	UB	Classificação	Resistência
24/04	Lavado brônquico	0,270	Produtora fraca	CIP, GENT, MUP, ERI, SUT, FOX

51/04	Sangue	0,136	Não produtora	CIP, FOX
58/04	Sangue	0,003	Não produtora	ERI, FOX
02/05	Sangue	0,111	Não produtora	SUT, FOX
08/05	Sangue	3,592	Produtora forte	CIP, GENT, MUP, ERI, SUT, FOX, CLIND
15/05	Sangue	0,401	Produtora fraca	ERI, FOX, CLIND
19/05	Sangue	0,014	Não produtora	CIP, CLO, ERI, FOX, CLIND
24/05	Sangue	0,020	Não produtora	CLO, ERI, FOX, TETRA, CLIND
30/05	Sangue	0,248	Produtora fraca	CIP, GENT, MUP, ERI, SUT, FOX, CLIND
31/05	Secreção purulenta	1,056	Produtora forte	ERI, FOX, TETRA, CLIND
36/05	Cateter	0,480	Produtora moderada	GENT, ERI, SUT, FOX
49/05	Sangue	0,026	Não produtora	CLO, GENT, MUP, ERI, FOX, CLIND
59/05	Cateter	2,060	Produtora forte	CIP, GENT, MUP, ERI, SUT, FOX, CLIND
68/05	Sangue	0,020	Não produtora	ERI, SUT, FOX
70/05	Sangue	1,030	Produtora forte	CIP, MUP, ERI, FOX, CLIND
110/05	Cateter	1,400	Produtora forte	CIP, ERI, FOX, CLIND
08/06	Sangue	0,880	Produtora moderada	CLO, ERI, FOX, CLIND
43/06	Sangue	0,070	Não produtora	CLO, ERI, FOX, CLIND
46/06	Sangue	1,140	Produtora forte	RIF, ERI, SUT, FOX, CLIND
51/06	Sangue	0,004	Não produtora	CLO, ERI, FOX, TETRA
81/06	Sangue	0,200	Não produtora	CIP, GENT, ERI, FOX, CLIND

U.B. < 0,230 não produtor, $0,230 \leq$ U.B. < 0,460 produtor fraco, $0,460 \leq$ U.B. < 0,920 produtor moderado e U.B. \geq 0,920 produtor forte. Sendo UB Unidade de Biofilme.

CIP: ciprofloxacino, CLO: cloranfenicol, GENT: gentamicina, RIF: rifampicina, MUP: mupirocina, ERI: eritromicina, SUT: Sulfametazol+Trimetropim, FOX: cefoxitina, TET: tetraciclina, CLIN: clindamicina.

DISCUSSÃO

Desde o primeiro relato sobre o aparecimento de *S. aureus* meticilina

resistente (MRSA) em 1961, estas bactérias se apresentam como um problema mundial devido ao aumento de sua incidência (JEVONS, COE & Parker, 1963). Estes microrganismos tornaram-se, assim, um problema clínico importante, pois os MRSA são geralmente multirresistentes e as opções terapêuticas limitadas (FLUIT et al., 2001).

Dados de 2005 indicam que nos países do sul da Europa, as taxas de cepas hospitalares de MRSA estão em torno de 40%, incluindo Portugal, que chega a ter maior prevalência, por volta de 47% (European Antimicrobial Resistance Surveillance System, 2006). No Brasil e em outros países, incluindo os EUA, cerca de 60% das cepas hospitalares de *S. aureus* são do tipo MRSA (NNIS, 2004; AMARAL, COELHO & FLORES, 2005; BRITES, SILVA & SAMPAIO-SÁ, 2006).

Ao testar a susceptibilidade das cepas de MRSA que fazem parte desta dissertação frente aos 14 antimicrobianos utilizados na prática clínica, observamos uma elevada resistência destas cepas frente à eritromicina (93%), à clindamicina (88%), e ao ciprofloxacino (81%) . Além disto, 88% das cepas apresentaram multirresistência, ou seja, resistência a três ou mais classes de drogas além dos β -lactâmicos. Recentemente, um estudo, feito em unidades de terapia intensiva em hospitais do Canadá, verificou que 90% das cepas de MRSA eram resistentes à fluorquinolonas e 76% à clindamicina (ZHANEL et al., 2008). Em outro estudo, realizado em um hospital coreano, comparou-se a multirresistência das cepas de MRSA em adultos e crianças. A taxa de resistência encontrada foi de 92% à eritromicina, 82% à clindamicina e ao ciprofloxacino e 32% à tetraciclina para os adultos. Este mesmo trabalho verificou que as taxas de resistência foram mais baixas, porém consideráveis, quando o alvo de estudo foram as crianças. É interessante notar que a eritromicina continuou sendo a droga com taxas de resistência mais altas e sempre superiores a 76%. No entanto, a resistência à clindamicina e ao ciprofloxacino foi bem menor, 16% e 8% respectivamente (PARK et al., 2007). O autor sugere que esta diferença se deve ao fato de que as cepas que colonizam crianças sejam bem diferentes das que colonizam adultos, que, por possuírem hábitos diferentes, a cepa provém de distintos sítios de colonizações. Além disso, estes dois grupos apresentam defesas imunológicas diferenciadas e a pressão seletiva das drogas age de maneira distinta, já que para tratar infecções não é usado o mesmo antibiótico.

Nas últimas décadas, também foi observado um aumento substancial na frequência de resistência à meticilina e na multirresistência entre os *Staphylococcus Coagulase Negativa* (ECN) (DE MATTOS et al., 2003). O número de cepas de *S. epidermidis* multirresistentes que colonizam a pele de pacientes hospitalizados, de profissionais de saúde e até mesmo de pessoas saudáveis da comunidade vem aumentando nos últimos anos. No estudo realizado por De Araújo e colaboradores (2006), também foi demonstrado que, além das cepas nosocomiais, as cepas de MRSE isoladas de indivíduos são da comunidade vêm crescendo quanto ao seu potencial de multirresistência aos antimicrobianos, pois 15 das 35 cepas de MRSE analisadas naquele estudo, de origem comunitária, apresentaram resistência a até quatro antimicrobianos diferentes, além da penicilina e oxacilina, demonstrando que cepas de MRSE isoladas de indivíduos são da comunidade podem apresentar multirresistência.

A múltipla resistência aos antibióticos em *S. epidermidis* é um problema reconhecido mundialmente e parece estar relacionado com o uso indiscriminado e prolongado dessas drogas (PEETES & SARRIA, 2005). Estes dados podem ser confirmados nesta dissertação, pois das 21 cepas de MRSE obtidas de pacientes hospitalizados, 76% apresentaram resistência a três ou mais antibióticos além dos β -lactâmicos. Um estudo semelhante realizado no mesmo hospital relatou que 72% das cepas de MRSE apresentaram multirresistência (DE ARAÚJO *et al.*, 2006). Em outra pesquisa (MONSEN, KARLSSON & WISTRÖM, 2005) realizada em um hospital na Suécia, foram isoladas 70 cepas de ECN oriundas de 68 pacientes. Os autores relataram que todas as cepas analisadas apresentaram resistência à oxacilina, à clindamicina, ao cotrimazol, à gentamicina e ao ácido fusídico. Dentre estas 70 cepas multirresistentes, 69 foram identificadas como *Staphylococcus epidermidis*.

Em nosso estudo, a maioria das cepas nosocomiais de MRSE apresentou resistência à eritromicina (90%) e taxas elevadas também foram observadas para clindamicina (67%), ciprofloxacino (43%), sulfametoxazol+trimetoprima (38%) e gentamicina (33%), seguidas de resistência ao cloranfenicol e à mupirocina (29%), à tetraciclina (14%) e à rifampicina (5%). Estes dados estão de acordo com a literatura científica, uma vez que estudos anteriores também observaram um aumento da frequência da resistência a estes antimicrobianos em cepas de MRSE hospitalares (PFALLER, et al., 1999; DIEKEMA, et al., 2001; SADER, et al.,

2004).

Baixas taxas de resistência de cepas de MRSA e MRSE à mupirocina têm sido observadas (WATANABE et al., 2001; KRESKEN et al., 2004;). O estudo de Kresken foi realizado com 787 cepas de *S. aureus* e 456 de *S. epidermidis* obtidas de 26 laboratórios localizados na Áustria, Alemanha e Suíça. A resistência à mupirocina foi detectada somente nas cepas resistentes à oxacilina (MRSA e MRSE) e as taxas de resistências apresentadas foram de 3,1% e 4,5%, respectivamente. Em nosso trabalho foram verificadas taxas de resistências de 28,6% em MRSE e 7% em MRSA.

Atualmente existem poucos clones de MRSA hospitalares espalhados pelo mundo, sendo os principais: Ibérico (ST 247 - SCCmecIA), Brasileiro (ST 239 - SCCmecIII), Nova York/Japonês (ST 5 - SCCmecII), Pediátrico (ST 5 - SCCmecIV), EMRSA-16 (ST 36 - SCCmecII), EMRSA-15 (ST 22 - SCCmecIV) e Berlim (ST 45 - SCCmecIV) (OLIVEIRA, TOMASZ & DE LENCASTRE, 2002; AIRES DE SOUZA & DE LENCASTRE, 2004).

O clone epidêmico Brasileiro (CEB), descrito pela primeira vez em 1995 (TEIXEIRA et al., 1995), encontra-se amplamente disseminado pelos hospitais do Brasil e também em hospitais de vários países e vem demonstrando predominância sobre outros clones (MELTER et al., 1999; DA SILVA COIMBRA et al., 2000; DE SOUZA et al., 2001; AIRES DE SOUZA et al., 2001; CAMPINILE et al., 2001; AMARAL et al., 2005). Um bom exemplo é que, entre 1992 e 1993, o clone Ibérico representava 77% dos isolados dos hospitais portugueses, número que declinou dramaticamente depois da introdução do clone brasileiro em 1995, chegando a representar, entre 1996 e 2000, cerca de 69% das cepas isoladas no hospital geral de Santo Antônio, em Oporto, Portugal (AMORIN et al., 2007).

Segundo Deurenberg e colaboradores (2006), atualmente estes principais clones de MRSA hospitalares estão distribuídos nos seguintes países: 1) **Clone Brasileiro/Húngaro** - Argélia, Argentina, Austrália, Áustria, Brasil, Chile, China, República Tcheca, Finlândia, Alemanha, Grécia, Índia, Indonésia, Coreia, Mongólia, Países Baixos, Polônia e Portugal; 2) **Clone Nova York/Japonês** - Áustria, Bélgica, Canadá, Dinamarca, Finlândia, França, Alemanha, Coreia, México, Singapura, Suécia, Uruguai, Reino Unido e Estados Unidos; 3) **Clone Ibérico** - Bélgica, Croácia, República Tcheca, Dinamarca, Finlândia, França, Alemanha, Itália, Países Baixos, Polônia e Portugal; 4) **Clone Pediátrico** -

Argélia, Argentina, Áustria, Brasil, Colômbia, Dinamarca, França, Coréia, Noruega, Polônia, Portugal, Espanha, Suécia, Uruguai, Reino Unido e Estados Unidos; 5) **Clone EMRSA-15** - Austrália, Bélgica, República Tcheca, Dinamarca, Alemanha, Irlanda, Kuwait, Nova Zelândia, Noruega, Portugal, Singapura, Espanha, Suécia e Reino Unido; 6) **Clone EMRSA-16** - Austrália, Bélgica, Canadá, Dinamarca, Finlândia, Alemanha, Irlanda, México, Noruega, Espanha, Suécia, Suíça, Reino Unido e Estados Unidos ; 7) **Clone Berlim** - Armênia, Austrália, Bélgica, Finlândia, Alemanha, Hungria, Países Baixos, Noruega, Espanha, Suécia, Suíça e Estados Unidos (DEURENBERG et al., 2006).

Conforme descrito, a atual entrada de outros clones hospitalares tem sido relatada. Um exemplo claro desta mudança está no fato de que no hospital citado acima, a partir de 2001, houve uma alteração abrupta na predominância global dos clones de MRSA, elevando para 80% a incidência do clone EMRSA-15 no período de 2001 a 2005, enquanto o CEB apresentou um declínio de 69% para 12% no mesmo período. Conseqüentemente, houve um aumento da susceptibilidade das cepas aos antibióticos não β -lactâmicos, tendo como marcador do EMRSA-15 a susceptibilidade à gentamicina e ao sulfametazole-trimetropina. Observou-se também na Espanha, no ano de 2000, uma rápida mudança da predominância do perfil clonal dos MRSA. Assim, em hospitais onde o clone Ibérico era prevalente, este foi substituído pelo EMRSA-16 com conseqüente aumento de susceptibilidade à gentamicina e à tetraciclina. (MONTESINOS et al., 2006).

Também cabe ressaltar que, no estudo de Amorin e colaboradores (2007), foi proposto que a resistência ao sulfametazole-trimetropina serviria como importante marcador fenotípico da identificação do CEB, uma vez que foi constatada a resistência a este antimicrobiano entre 33 (92%) das 36 cepas isoladas. Tais resultados estão de acordo com nosso estudo, o qual constatou que das 14 cepas classificadas como CEB, treze (93%) apresentaram a resistência a este antibiótico.

Do mesmo modo que Amorin e colaboradores (2007), neste trabalho de dissertação também foi verificada a entrada de um novo clone de MRSA no hospital estudado. Assim, das 43 cepas de MRSA obtidas do HUAP, observamos que 32,6% (14/43) foram identificadas com pertencentes a um clone inicialmente descrito como comunitário, o USA-400. Diferentemente do observado por Teixeira e colaboradores (1995) e Amaral e colaboradores (2005), neste trabalho

verificamos que apenas 32,6% (14/43) das cepas foram identificadas como pertencentes ao complexo clonal CEB.

Estudos recentes apontam que cepas de MRSA da comunidade com SCC*mec* tipo IV vêm sendo isoladas em vários hospitais (LAPLANA et al., 2007; WENZEL, BEARMAN & EDMOND, 2007). Em um hospital na Espanha foi descrito que a maioria das amostras que causava infecção hospitalar estava relacionada aos tipos USA-300 e USA-400 (WENZEL, BEARMAN & EDMOND, 2007). Outro estudo recente, realizado com 422 pacientes em 11 emergências de hospitais universitários dos Estados Unidos, demonstrou que 75% das cepas isoladas foram classificadas como pertencentes a clones comunitários (CA-MRSA) (KRIDASAN et al., 2006).

As cepas de CA-MRSA são sensíveis a outros antibióticos, exceto os β -lactâmicos (DEURENBERG et al., 2006; CORTES et al., 2007), pois estas, em geral, não contêm outros genes de resistência além do *mecA* (HANSSEN & SOLLID, 2005). Neste estudo, observamos que as 14 cepas de USA-400 (Clone B) apresentaram perfil de resistência aumentado com relação às USA-400 anteriormente descritas (DEURENBERG et al., 2006, CORTES et al., 2007). Exemplificando, todas as cepas classificadas como USA-400 encontradas no HUAP eram resistentes ao ciprofloxacino, 13 cepas (93%) apresentaram resistência à clindamicina e à eritromicina e 12 (86%) ao cloranfenicol. Vale ressaltar, no entanto, que apenas 1 (107/05) foi resistente ao sulfametazole-trimetropina. Parece clara a ocorrência da incorporação de elementos de resistência no *background* genético da célula, quando estas cepas se tornam predominantes no ambiente hospitalar. A predominância da USA-400 pode ter ocorrido pelo fato destas cepas possuírem a sua fase *lag* de crescimento menor do que cepas altamente resistentes, como ocorre com o CEB, pois seu genoma é mais simples e por isso se multiplica mais rapidamente.

Um estudo afirma que o SCC*mec* do tipo IV foi encontrado duas vezes a mais do que outros tipos de SCC*mec* nas cepas de MRSA. Isto possivelmente se deve ao pequeno tamanho do SCC*mec* tipo IV comparado a outros tipos de SCC*mec*, o que possivelmente pode facilitar a transferência do cassete entre as cepas (DEURENBERG et al., 2006).

Ao se estudar os genes da PVL, percebe-se que estão geralmente associados à CA-MRSA (LISA et al., 1999). A maior parte das cepas CA-MRSA

estudadas na Europa e nos Estados Unidos possui genes desta leucocidina (VANDENESH, 2003). No entanto, nenhuma das 14 cepas deste trabalho classificadas como clone USA-400 teve o gene *lukF* amplificados quando submetidas à PCR. Similarmente, estudos feitos com CA-MRSA obtidos na Austrália também demonstraram que a maioria das cepas analisadas não amplificou os genes para PVL (CASEWELL, 1986; COOMBS, 2006).

Outro estudo (ROSSNEY *et al.*, 2007) mostrou que carrear os genes de PVL não é restrito às cepas de CA-MRSA, sendo também encontrado no montante de 25% em um grupo HA-MRSA na Irlanda. Este fato confirma outra pesquisa (DIEP *et al.*, 2006), que demonstra que o gene *pvl* não pode ser usado como um marcador isolado do CA-MRSA, acrescido do fato de que muitas cepas classificadas como CA-MRSA não expressam a leucocidina, conforme citado acima.

Não restam dúvidas que a resistência a antimicrobianos é um dos mecanismos mais importantes que leva à permanência e disseminação de cepas infecciosas nos hospitais. Mais recentemente, outro mecanismo também tem sido implicado nesta permanência e espalhamento de cepas estafilocócicas hospitalares. A capacidade de produzir biofilme pelas cepas do gênero *Staphylococcus* é também considerada um fator preponderante na patogenia destes microrganismos (VANDEESCASTELLE *et al.*, 2003). Dessa forma, sem a proteção do biofilme, estas bactérias estariam susceptíveis às defesas imunológicas do hospedeiro ou mesmo aos antimicrobianos (LI *et al.*, 2005).

Infecções bacterianas na região de implantes de materiais médicos como cateteres e próteses artificiais representam um sério problema na área médica. Pesquisas realizadas nos EUA verificaram que, quando se consideram todos os materiais médicos implantados, o número de infecções associadas a implantes pode chegar a um milhão por ano (HENTRICH & SCHOENFISCH, 2006).

A literatura científica mostra que infecções associadas a cuidados médicos é a maior causa de doenças e morte de pacientes em países desenvolvidos (JARWIS, 1996 ; DIAZ MOLINA, *et al.*, 1998). Infecções associadas a dispositivos médicos, tais como respiradores associados à pneumonia, cateter venoso central e cateter associado ao trato urinário são considerados riscos à segurança de pacientes na UTI (Unidade de Tratamento Intensivo) (FAGON, *et al.*, 1994).

Rosenthal e colaboradores (2006), em estudo realizado em países em

desenvolvimento (países da América Central e do Sul, Índia, Marrocos e Turquia), observaram altas taxas de infecção associadas a dispositivos médicos (22,5 infecções por 1000 pacientes por dia, internados em UTI), sendo que, dentre estes casos, 84% das infecções foi causada por MRSA. Naquele estudo também foi ressaltado que a incidência total de casos de infecções associadas a cateter venoso central pode ser quatro vezes maior em países em desenvolvimento se comparados a países que seguem as normas padronizadas pelo National Nosocomial Infections Surveillance dos CDC (Centers for Disease Control), como Estados Unidos, Reino Unido, Canadá, Austrália e Alemanha.

Esta diferença pode ocorrer, considerando que alguns países não possuem mandados judiciais de criação de Programas de Infecção Hospitalar e a acreditação dos hospitais (ROSENTHAL et al., 2006). Estes autores abordam, também, a existência de uma diferença entre as taxas de países periféricos e desenvolvidos, pois fontes de informações sobre o controle das infecções são muito limitadas nos países periféricos, além das taxas de corpo de enfermagem/paciente serem muito menores do que nos UTI dos EUA, por exemplo. Estudos realizados nos EUA sobre infecções causadas por dispositivos médicos demonstraram que o pequeno número de integrantes do corpo de enfermagem, cuidando de um número grande de pacientes, aumenta o risco destes tipos de infecção (ANDERSEN et al., 2002; HUGGONET et al., 2004). E, finalmente, o uso de tecnologia ultrapassada pode ser um fator de crescimento destas infecções. Por exemplo, o sistema aberto de infusão intravenosa é usado em países em desenvolvimento enquanto que o sistema fechado é padrão de uso em países desenvolvidos (ROSENTHAL et al., 2006). Foi demonstrado, recentemente, que o uso destes sistemas fechados resulta numa taxa muito menor de infecção sanguínea associada a cateteres venosos centrais (ROSENTHAL & MAQUI, 2004).

A produção de biofilme sempre esteve associada aos *S. epidermidis*. No entanto, esta bactéria não era considerada como patógeno para o homem. A partir dos anos 80, com o grande aumento da utilização de processos invasivos, tanto para fins de diagnósticos como para fins terapêuticos, estas bactérias passaram a ser amplamente implicadas como patógenos hospitalares e foi creditada à produção de biofilme a sua capacidade patogênica. Neste trabalho de dissertação, foi verificado que das 21 cepas de *S. epidermidis* resistentes à meticilina obtidas do HUAP, 11 eram produtoras de biofilme (52%). Resultados semelhantes foram

verificados por Araújo e colaboradores em 2006. Apesar de 90% das cepas serem de corrente sanguínea, a significância clínica não foi avaliada neste estudo. Além disso, também foi verificado que as 14 cepas pertencentes ao clone CEB e as 14 pertencentes ao clone USA-400 foram significativamente produtoras de biofilme (trabalho em anexo). Diferentemente dos nossos resultados, o estudo de Amaral e colaboradores (2005) verificou que cepas de MRSA pertencentes ao subclone A₁ do complexo clonal CEB, o tipo mais encontrado no Brasil até o momento, produziam mais biofilme quando comparadas a cepas de *S. aureus* sensíveis à meticilina (MSSA), clones esporádicos e CEB não A₁. No estudo de Amaral e colaboradores (2005), a maioria das cepas analisadas foi coletada entre 1996 e 2001. Acreditamos que o fator temporal associado à pressão seletiva possa ter facilitado a troca de material genético, possibilitando o aparecimento de outros clones com capacidade aumentada de produzir biofilme.

Evidentemente, a capacidade de cepas produtoras de biofilme em causar infecções em indivíduos em nosso país é muito mais alta do que em países onde existe uma maior vigilância no controle das infecções causadas por MRSA e MRSE.

Devido aos fatos apresentados neste trabalho, vê-se que é de extrema importância um maior monitoramento da resistência microbiana nos hospitais brasileiros pela ANVISA, pois através desta medida os pacientes receberão um tratamento mais eficaz e menos dispendioso. Infelizmente, recentemente foi relato que seis estados brasileiros, dentre eles Rio Grande do Norte e Santa Catarina, não possuem coordenações de controle de infecção hospitalar. Espera-se que com máxima urgência, nossa agência reguladora faça com que estes estados cumpram a lei n ° 9431 de 1997, pois somente desta maneira eles passarão a ser mais atuante no combate a infecção hospitalar.

CONCLUSÃO

*As cepas hospitalares estão associadas à produção de biofilme, sugerindo assim sua importância na patogênese de infecções nosocomiais.

*As cepas de MRSA e MRSE possuem grande resistência à eritromicina, à clindamicina e ao ciprofloxacino.

* A resistência ao cotrimazol confirmou ser um importante marcador do Clone Epidêmico Brasileiro (CEB).

*O Complexo Clonal USA-400 apresentou resistência a vários antibióticos, sendo que 92,8% destas cepas apresentam sensibilidade ao cotrimazol (sulfametoxazol+trimetropina).

* As cepas de MRSA deste estudo que pertencem ao complexo clonal USA-400 não apresentaram genes para a produção da PVL e se comportaram como as cepas comunitárias australianas, WA-MRSA.

*A entrada de clones mais sensíveis a antibióticos no ambiente hospitalar também foi detectada neste estudo, como as 4 cepas que aparentam pertencer ao Clone Pediátrico.

* Introdução e predominância do complexo clonal USA-400, antes um clone comunitário, agora se apresentando mais resistente a vários antibióticos, dentre as cepas coletadas de pacientes internados do Hospital Universitário Antônio Pedro (HUAP).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIRES DE SOUZA, M.; DE LENCASTRE, H. Bridges from hospitals to the laboratory: genetic portraits of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones.

[FEMS. Immunol. Med. Microbiol.](#), v. 8, n. 40, p. 101-11, Mar. 2004.

AIRES DE SOUZA, M. et al. Frequent recovery of a single clonal type of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* from patients in two hospitals in Taiwan and China. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 159-163, Jan. 2003.

AIRES DE SOUZA, M. et al. Three-year assessment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America from 1996 to 1998. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, p. 2197-2205, Jun. 2001.

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

AMARAL, M. M.; COELHO, L. R.; FLORES, R. P. The Predominant variant of the Brazilian Epidemic Clonal Complex of Methicilin-Resistant *Staphylococcus aureus* has an Enhanced Ability to Produce Biofilm and to Adhere to and Invade Airway Epithelial Cells. **J. Infect. Dis.**, p. 801-810, Set. 2005.

AMORIN, M.L. et al. Changes in the clonal nature and antibiotic resistance profiles of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with spread of EMRSA-15 clone in a tertiary care Portuguese hospital. **J. Clin. Microbiol.**, v. 45, n. 9, p. 2881-2888, Set. 2007.

ANDERSEN, B.M. et al. Spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a neonatal intensive unit associated with understaffing, overcrowding and mixing of patients. **J. Hosp. Infect.**, v. 50, p. 18-24, Jan. 2002.

ANVISA, SIMPÓSIO BRASIL ARGENTINA DE RESISTÊNCIA MICROBIANA, 2007. Foz do Iguaçu. **Anais eletrônicos**. Foz do Iguaçu: UFRS, 2007. Disponível em: [http: www.anvisa.com.br](http://www.anvisa.com.br). Acesso: 01 de Abril de 2008.

BENNET, J.V.; BRACHMAN, P.S. **Hospital Infection** 4 th. Lipponcott-Raven, Philadelphia,USA, 1998.

BERGLUND, C. et al. Multilocus sequence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from an area of low endemicity by realtime PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, n. 9, p. 4448-54, Set. 2005.

BOLETIM INFORMATIVO DA REDE NACIONAL DE MONITORAMENTO DA RESISTÊNCIA MICROBIANA EM SERVIÇOS DE SAÚDE-REDE RM. Edição n. 1, de 26 de Abril de 2007. Brasília.

BOYLE-VAVRA, S.; DAUM, R. S. Community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: the role of Panton-Valentine leukocidin. **Lab. Investig.**, v. 87, p. 3-9, Dez. 2007.

BRADFORD R. et al. Coagulase-negative staphylococci in very-low-birth-weight infants: inability of genetic markers to distinguish invasive strains from blood culture contaminants. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 25, p. 283-90, Mai. 2006.

BRASIL. Lei 8080 de 19 de setembro de 1990. Dispõem sobre as condições para a promoção, proteção e a recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF , 20 de Setembro de 1990.

BRASIL. Lei 9431 de 6 de março de 1997. Dispõem sobre a obrigatoriedade da manutenção de programa de controle de infecções hospitalares pelos hospitais do país. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 07 de janeiro de 1997.

BRASIL. Portaria nº 2616 de 12 de maio de 1998. Diretrizes e normas para a prevenção e controle das infecções hospitalares. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília,DF, 13 de maio de 1998.

BRASIL. Portaria nº 2529 de 23 de novembro de 2004. Institui o Subsistema Nacional de Vigilância Epidemiológica em âmbito hospitalar, define competências para os estabelecimentos hospitalares, A União, os estados, o Distrito federal e os municípios, cria a Rede nacional de Referência para o referido Subsistema e define critérios para a qualificação de estabelecimento. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 24 de novembro de 2004.

BRASIL. RDC nº 48 de 02 de junho de 2000. Fica aprovado o Roteiro de Inspeção do Programa de Controle de Infecção Hospitalar. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 03 de junho de 2000.

BRITES, C.; SILVA, N.; SAMPAIO-SÁ, M. Temporal evolution of the prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a tertiary hospital in Bahia, Brazil: a nine-year evaluation study. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 10, n. 4, p. 235-38, Ago. 2006.

CAFISO, V. et al. Agr-genotyping and transcripcional analysis of biofilm-producing *Staphylococcus aureus*. **FEMS. Immunol. Med. Microbiol.**, v.51, p.220-227, Jul. 2007.

CAMPINILLE, F.; CAFISO, V.; CASCONI, C.; GIANNINÒ, V., DI MARCO, O.; STEFANI, S. Clonal diffusion and evolution of *mecA* and Tn554 polymorphisms in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Italy. **Infez. Med.**, v. 9, p. 30-38, Mar. 2001.

CARRIÇO, J. A. et al. Assessment of band-based similarity coefficients for automatic type and subtype classification of microbial isolates analyzed by pulsed-field gel electrophoresis. [J. Clin. Microbiol.](#), v. 43, n. 11, p. 5483-90, Nov. 2005.

CASEWELL, M. W. Epidemiology and control of the 'modern' methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **J. Hosp. Infect.**, v.7, p. 1–11. 1986.

CHAMBERS, H. F. Community-associated MRSA- resistance and virulence converge. **N. Engl. J. Med.**, v. 352, p.1485-1487, Abr. 2005.

CHAMBERS, H.F. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. [Clin. Microbiol. Rev.](#), v. 10, n. 4, p. 781-91, Out. 1997.

CHANG, S. et al. Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Investigative Team. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the *vanA* resistance gene. **N. Engl. J. Med.**, v. 348, p. 1342-1347, Abr. 2003.

[CHEUNG, A.L.](#); [MANNA, A.C.](#) Role of the distal *sarA* promoters in SarA expression in *Staphylococcus aureus*. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 4391-4, Jul. 2005.

CHUNG, M.; DICKINSON, G.; DE LENCASTRE, H.; TOMASZ, A. International Clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in two hospital in Miami, in Florida. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 542-547, Jul. 2004.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. 8th Ed. Approved Standard M2-A9. Wayne, PA: CLSI document M100-S16. 2006.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. 9th Ed. Approved Standard M2-A9. Wayne, PA: CLSI document M100-S17. 2007.

CONLON, K. M.; HUMPHREYS, H.; O'GARA, J. P. Regulation of *icaR* gene expression in *Staphylococcus epidermidis*. **FEMS. Microbiol. Lett.**, v. 216, p. 171–177, Out. 2002.

CONLON, K. M.; HUMPHREYS, H.; O'GARA, J. P. Inactivations of *rsbU* and

sarA by IS256 represent novel mechanisms of biofilm phenotypic variation in *Staphylococcus epidermidis*. **J. Bacteriol.**, v. 186, p. 6208-19, Set. 2004.

COOMBS, G.W. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Clones, Western Australia. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 12, n. 2, p. 241-247, Fev. 2006.

CONSTANTIN, M.; DONISI, P.M.; TURRIN, M.G.; DIANA, L. Hospital acquired infection surveillance and control in intensive care services, results an incidence study. **Eur. J. Epidemiol.**, v. 3, p. 347-35, Dez. 1987.

CORTES, J. A. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Bogotá, Colombia: Public Health implications. **Rev. Sal. Publ.** v. 9, n. 3, p. 448-54, Jul-Set. 2007.

CRAMTON, S. E. et al. Anaerobic conditions induce expressions of polysaccharide intercellular adhesin of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 4079-85. 2001.

CUCARELLA, C. et al. Role of biofilm-associated protein *bap* in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. **Infect. Immun.**, v. 72, p. 2177-85, Abr. 2004.

CUNHA, M. L.; LOPES, C. A.; RUGOLO, L. M., CHALITA, L.V. Clinical significance of coagulase-negative staphylococci isolated from neonates. **J. Pediatr.**, v. 78, p. 279-288, Ago. 2002.

DA SILVA COIMBRA, M. V. et al. Spread of the Brazilian epidemic clone of a multiresistant MRSA in two cities in Argentina. **J. Med. Microbiol.**, v. 49, p. 187-192, Fev. 2000.

DA SILVA COIMBRA, M.V. et al. Clonal spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a large geographic area of the United States. **J. Hosp. Infect.**, v. 53, p.103-110, Fev. 2003.

DE ARAUJO, G.L. et al. Commensal isolates of methicillin-resistant

Staphylococcus epidermidis are also equipped to produce biofilm on polystyrene surfaces. **J. Antimicrobiol. Chem.**, v. 57, p. 855-864, 2006.

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

DEURENBERG, R. H.; VINK, C.; KALENIC, S.; FRIEDRICH, A.W.; BRUGGEMAN, C.A.; STOBBERINGH, E. E. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Clin. Microbiol. Infect.**, v.13, p. 222-235, Mar. 2006.

DÍAZ MOLINA, C.; MARTÍNEZ DE LA CONCHA, D.; SALCEDO. L.I.; MASA, C.J., DE IRALA, E. J.; FERNÁNDEZ-CREHUET, N.R. Influence of nosocomial infection on mortality in an intensive care unit. **Gac. Sanit.**, v. 12, p. 23-8. 1998.

DIEKEMA, D.J. et al. Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific Region for the SENTRY antimicrobial surveillance program, 1997-1999. **Clin. Infect. Dis.**, v.32, p. S114-32.2001.

DIEP, B. A.; CARLETON, H. A.; CHANG, R. F.; SENSABAUGH, G. F.; PERDREAU-REMYNTON, F. Roles of 34 virulence genes in the evolution of hospital- and community-associated strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **J. Infect. Dis.**, v.193, p.1495–1503, Jun. 2006.

DINGLE, K. E. et al. Molecular characterization of *Campylobacter jejuni* clones: a basis for epidemiologic investigation. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 8, p.949-955. 2002.

DOBINSKY, S. et al. Glucose-related dissociation between icaA/BC transcription and biofilm expression by *Staphylococcus epidermidis*: evidence for an additional factor required for polysaccharide intercellular adhesin synthesis. **J Bacteriol.**, v.

185, n. 9, p. 2879-86. Maio 2003.

DOMINGUEZ, M. A.; DE LENCASTRE, H.; LINARES, J.; TOMASZ, A. Spread and maintenance of a dominant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clone during an outbreak of MRSA disease in a Spanish hospital. [J Clin Microbiol.](#), v. 32, n. 9, p. 2081-7. Set. 1994.

ENRIGHT, M. C.; SPRATT, B. G. A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae*: identification of clones associated with serious invasive disease. **Microbiol.**, v. 144, p. 3049-3060. 1998.

ENRIGHT, M. C.; DAY, N.P.; DAVIES, C.E.; PEACOCK, S. J.; SPRATT, B.G. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p. 1008-1015. 2000.

ENRIGHT, M. C.; SPRATT, B.G.; KALIA, A.; CROSS, J.H.; BESSEN, D.F. Multilocus sequence typing of *Streptococcus pyogenes* and the relationships between *emm* type and clone. **Infect. Immun.**, v.69, p. 2416-2427. 2001.

ENRIGHT, M. C.; ROBINSON, D.A.; RANDLE, G.; FEIL, E. J.; GRUNDMANN, H.; SPRATT, B.G. The evolutionary history of methicillin-resistant history *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 99, p.7687-7692, Maio 2002.

EUROPEAN ANTIMICROBIAL RESISTANCE SURVAILLANCE STSTEM. 2006. EARSS annual report 2005. <http://www.rivm.nl/earss/>.

FAGON, J.Y.; NOVARA, A.; STEPHAN, F.; GIROU, E.; SAFAR, M. et al. Mortality attributable to nosocomial infections in the ICU. **Infect. Control Hosp Epidemiol.**, v.15, p. 428-34. 1994.

FEIL, E. J.; MAIDEN, M. C.; ACHTMAN, M.; SPRATT, B.G. The relative contributions of recombination and mutation to the divergence of clones of *Neisseria meningitidis*. **Mol. Biol. Evol.**, v.16, p.1496-1502. 1999.

FERRY, T. et al. Comparative prevalence of superantigen genes in *Staphylococcus aureus* isolates causing sepsis with and without septic shock. **Clin. Infect. Dis.**, v.41, n.6, p. 717-727, Set .2005.

FEY, P. D., CLIMO, M. W., ARCHER, G. L. Determination of the chromosomal relationship between *mecA* and *gyrA* in methicillin-resistant coagulase negative. **Antimicrob. Ag. Chemother.**, v. 42, n. 2, p. 306-12, Fev. 1998.

[FITZPATRICK, F.](#), HUMPHREYS, H., [O'GARA, J.P.](#) a. Evidence for low temperature regulation of biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis*. **J. Med. Microbiol.**, v.54, p. 509-10, Maio 2005.

[FITZPATRICK, F.](#), HUMPHREYS, H., [O'GARA, J.P.](#) b. Evidence for icaADBC-independent biofilm development mechanism in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, n. 4, p. 1973-6, Abr. 2005.

FLUIT, A. C.; VERHOEF, J.; SCHMITZ, F. J.; EUROPEAN SENTRY PARTICIPANTS. Frequency of isolation and antimicrobial resistance of gram-negative and gram-positive bacteria from patients in intensive care units of 25 European university hospitals participating in the European arm of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program 1997-1998. **Eur. J. Clinical. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 20, n. 9, p. 617-95, Set. 2001.

GILL S. R et al. Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain. **J. Bacteriol.**, v. 187, p. 2426-2438, Abr. 2005.

GOMES, A. R.; SANCHES, I. S.; AIRES DE SOUSA, M.; CASTAÑESDA, E.; DE LENCASTRE, H. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Colombian hospitals: dominance of a single unique multidrug-resistant clone. **Microb. Drug. Resist.**, v. 7, p. 23-32, 2001.

GOTZ, F. *Staphylococcus* and biofilms. **Mol. Microbiol.**, v. 43, p. 1367-78, 2002.

GRIFFIN F.A. Reducing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections. **Jt. Comm. J. Qual. Patient. Saf.**, v. 33, n. 12, p. 726-731, Dez. 2007.

GROSS, M.; CRAMTON, S. E.; GOTZ, F.; PESCHEL, A. Key role of teichoic acid net charge in *Staphylococcus aureus* colonization of artificial surfaces. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 3423-3426, Maio 2001.

HANSEN, A.M; SOLLID, J.U.E. SCCmec in staphylococci: genes on the move. **FEMS. Immunol. Med. Microbiol.**, v. 46, p. 8-20, Fev. 2005.

HEILMANN, C.; HUSSAIN, M., PETERS, G.; GOTZ, F. Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface. **Mol. Microbiol.**, v. 24, p. 1013-24, Jun. 1997.

HENTRICH, E.M.; SCHOENFISCH, M.H. Reducing implant-related infections: active release strategies. **Chemic. Soc. Rev.**, v. 35, p. 780-789. 2006.

HEROLD, B.C. et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children with no identified predisposing risk. **JAMA**, v. 279, n. 8, p. 593-8. Fev. 1998.

HIRAMATSU, K.; HANAKI, H.; INO, T.; YABUTA, K.; OGURI, T.; TENOVER, F.C. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 40, p. 135-136, 1997.

HIRAMATSU, K. et al. Molecular genetics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 292, p. 67-74, Jul. 2002.

HOMAN, W. L. Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecium*. **J. Clin. Microbiol.**, v.40, p. 1963-1971. 2002.

HUGONNET, S.; HARBARTH, S.; SAX, H.; DUNCAN, R.A.; PITTET, D. Nursing resources a major determinant of nosocomial infection? **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 17, p. 329-33, Ago. 2004.

HUSSAIN, M.; HERRMANN, M.; VON EIFF, C.; PERDREAU-REMINGTON, F.; PETERS, G. A 140 KDa extracellular protein is essential for the accumulation of *Staphylococcus epidermidis* strains on surfaces. **Infect. Immun.**, v. 65, p. 519-24, Fev. 1997.

ITO, T. et al. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome mec integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob. Ag. Chem.**, v. 45, p. 1323-1336, Maio 2001.

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

JARWIS, W.R. Selects aspects of the socioeconomic impact of nosocomial infections: morbidity, mortality, cost and prevention. **Infect. Contr. Hosp. Epidemiol.**, v. 17, p. 552-7. 1996.

JEVONS, M. P.; COE, A. W., PARKER, M. T. Methicillin resistance in staphylococci. **Lancet**, v. 1, n. 7287, p. 904-7, Abril, 1963.

JOHNSON, M.; COCKAYNE, M.; WILLIAMS, P.H.; MORRISSEY, J.A. Iron-responsive regulation of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* involves Fur-dependent and Fur-independent mechanisms. **J. Bacteriol.**, v. 187, p. 8211–8215, Dez. 2005.

KLINGENBERG, C. et al. Coagulase-Negative staphylococcal sepsis in neonates: Association between antibiotic resistance, biofilm formation and the host inflammatory response. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 24, p. 817-22, Set. 2005.

KNOBLOCH, J.K.; JAGER, S.; HORSTKOTTE, M. A.; ROHDE, H.; MACK, D.

RsbU-dependent regulation of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation is mediated via the alternative sigma factor sigmaB by repression of the negative regulator gene icaR. [Infect. Immun.](#), v. 72, n. 7, p. 3838-48, Jul. 2004.

KOKSAL, F., YASAR, H., SAMATSI, M. Antibiotic resistance patterns of coagulase-negative staphylococcus strains isolated from blood cultures of septicemic patients in Turkey. [Microbiol. Res.](#) Apr. 2007.

KRESKEN, M.; HAFNER, D.; SCHMITZ, F. J.; WICHELHAUS, T. A.; PAUL-EHRLICH-SOCIETY FOR CHEMOTHERAPY. Prevalence of mupirocin resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*: results of the Antimicrobial Resistance Surveillance Study of the Paul-Ehrlich-Society for Chemotherapy, 2001. **Int. J. Antimicrob. Ag.** vol. 23, n. 6, p. 577-81, Jun. 2004.

KOTETISHVILI, M.; STINE, O. C.; KREGER, A.; MORRIS, J. G. Jr.; SULAKYELIDZE, A. Multilocus sequence typing for characterization of clinical and environmental *Salmonella* strains. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, p.1626-1635. 2002.

LABANDEIRA-REY, M. et al. *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin causes necrotizing pneumonia. **Scienc.**, v. 315, p. 1130-1133, 2007.

LAPLANA, L.M. et al. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* clinical isolates by Pulsed-Field gel electrophoresis, staphylococcal cassette chromosome *mec* type determination and dissemination of antibiotic resistance genes. **Intern. J. Antimicrobiol. Ag.**, 2007.

LI, M. et al. Genetic polymorphism of the accessory gene regulator *agr* locus in *Staphylococcus epidermidis* and its association with pathogenicity. **J. Med. Microbiol.**, v. 53, p. 545-9, Jun. 2004.

LI, H. et al. Conversion of *Staphylococcus epidermidis* strains from commensal to invasive by expression of the *ica* locus encoding production of biofilm exopolysaccharide. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 3188-91, Maio 2005.

LISA, G. et al. Involvement of Panton-Valentine leukocidin producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. **Clin. Infect. Dis.**, v. 29, n. 5, p. 1128-32, Nov. 1999.

LOWY, F.D. *Staphylococcus aureus* infections. **N. Englan. J. Med.** v. 339, p. 520-532. 1998.

MAAS A.; FLAMENT, P.; PARDOU, A.; DEPLANO, A.; DRAMAIX, M.; STRUELENS, M. J. Central Venous catheter-related bacteremia in critically ill neonates: risk factors and impact an prevention programme. **J. Hosp. Infec.**, v. 40, p. 211-212, Nov. 1998.

MAIRA-LITRÁN, T.A. et al. Immunochemical properties of staphylococcal poly n-acetylglucosamine surface polysaccharide. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 4433-4440, Abr. 2002.

MASSEY, R.C. et al. The Evolution and maintenance of virulence in *Staphylococcus aureus*: a role for host-to-host transmission? **Nat. Microbiol. Rev.**, v.4, p. 953-958, Dez. 2006.

MATO, R. et al. Spread of the multiresistant Iberian clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) to Italy and Scotland. **Microb. Drug. Resist.**, v. 4, p. 107-112, 1998.

MATO, R. et al. Clonal types and multidrug resistance patterns of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) recovered in Italy during de 1990s. **Microb. Drug. Resist.**, v. 10, n. 2, p. 106-13, 2004.

MELO, D. O., SASAKI, M., GRINBAUM, R.S. Vancomycin use in a hospital with high prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Comparison with hospital Infection Control Practice sAdvisory commite guidelines. **The Braz. J. Infec. Dis.**, v.11, n. 1, p. 53-56. 2007.

MELTER, O. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clonal types in the

Czech Republic. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, p. 2798-2803, Sep. 1999.

MIRAGAIA, M., COUTO, I.; DE LECANSTRE, H. Genetic diversity among methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* (MRSE). **Microb. Drug. Resist.**, v. 11. n. 2, p. 83-93, 2005.

MIYAZAKI, N. H.; ABREU, A. O.; MARIN, V.A.; REZENDE, C.A.; MORAES, M. T.; VILLAS BÔAS, M. H. The presence of QuacA/B gene in Brazilian methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Mem. Inst. Osw. Cruz**, v. 102, n. 4. 2007.

MONSEN, T.; KARLSSON, C.; WISTROM, J. Spread of clones of multidrug-resistant, coagulase-negative staphylococci within a university hospital. **Infec. Cont. Hosp. Epidemiol.**, p. 76-80. Jan. 2005.

MONTESINOS, I. et al. Changes in the epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with the emergence of EMRSA-16 at a university hospital. **J. Hosp. Infe.**, v. 64, n. 3, p. 257-63, Nov. 2006.

MORAN G.J. et al. Methicillin-resistant *S. aureus* infections among patients in the emergency department. **N. Engl. J. Med.**, v. 355, p. 666–74, Ago. 2006.

MURCHAN, S. et al. Harmonization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for epidemiological typing of strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a single approach developed by consensus in 10 European laboratories and its application for tracing the spread of related strains. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 1574-1585, Abr. 2003.

NAIMI , T.S. et al. Epidemiology and clonality of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Minnessota. **Clin. Infect. Dis.**, v. 33, p. 990-996, Oct. 2001.

NILSDOTTER-AUGUSTINSSON, A.; KOSKELA, A.; OHMAN, L.; SODERQUIST, B. Characterization of coagulase-negative in staphylococci isolated from patients with infected hip prostheses: use of phenotypic and

genotyping analyses, including tests for the presence of the *ica* operon. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 26, p. 255-265, 2007.

NNIS System. National Nosocomial Infections Surveillance(NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issue October 2004. **Am. J. Infect. Report.**, v. 32, p. 470-85. 2004

OLIVEIRA, D. C.; MILHEIRIÇO, C.; DE LENCASTRE, H. Redefining a Structural Variant of Staphylococcal Cassete Chromosome *mec*, SCC *mec* Type VI. **Antimicrobial. Ag. Cheomot.**, p. 3457-3459, Jul. 2006.

OLIVEIRA, D.C. et al. Virtually all methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections in the largest Portuguese teaching hospital are caused by two internationally spread multiresistant strains: the 'Iberian' and the 'Brazilian' clones of MRSA. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 4, p. 373-384, Jul. 1998.

OLIVEIRA, D. C., TOMASZ, A., DE LENCASTRE, H. Secrets of success of human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Lancet. Infect. Dis.** v. 2, n. 3, p.180-9, Mar.2002.

PACHECO, A.B. Random amplification of polymorphic DNA reveals serotype-specific clonal clusters among enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from humans. **J. Clin. Microbiol.**, n. 35, v. 6, p. 1521-5, Jun. 1997.

PALAZZO, I. C. V., ARAUJO, M. L. C., DARINI, A. L. C. First Report of Vancomycin-Resistant Staphylococci Isolated from healthy Carriers in Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, n.1, p. 179-185, Jan. 2005.

PARK, J.Y. et al. A Comparison of Adult and Pediatric Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates Collected from Patients at a University Hospital in Korea. **J. Microbiol.**, v. 45, n. 5, p. 447-52, Oct. 2007.

PARSEK, M.R.; SENGH P.K. Bacterial biofilms and emerging link to disease pathogenesis. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 57, p. 677-701, 2002.

[PATEL M.; HOESLEY, C. J.; MOSER, S. A.; STAMM, A. M.; BADDLEY, J. W.; WAITES, K. B.](#) Dissemination of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a tertiary care hospital. **South. Med. J.**, v. 101, n. 1. p. 40-45, Jan. 2008.

PEETERS, M. J.; SARRIA, J. C. Clinical characteristics of linezolid-resistant *Staphylococcus aureus* infections. **Am. J. Med. Sci.**, v. 330, p. 102-4, Ago. 2005.

PFALLER M. A.; JONES, R. N.; DOERN, G. V.; KUGLER, K. Bacterial pathogens isolated from patients with bloodstream infection: frequencies of occurrence and antimicrobial susceptibility patterns from the SENTRY antimicrobial surveillance program (United States and Canada, 1997). **Antimicrob. Ag. Chemother.**, v. 42, n. 7, p.1762-1770, Jul. 1998.

PFALLER M.A. et al. Survey of bloodstream infections attributable to gram-positive *cocci*: frequent of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in 1997 in United States, Canada, and Latin America from the SENTRY antimicrobial surveillance program. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v.33, p. 283-97. 1999.

RACHID S., OHLSEN, K.; WALLNER, U.; HACKER, J.; HECKER, M.; ZIEBUHR, W. Alternative transcription factor B is involved in regulation of biofilm expression in a *Staphylococcus aureus* mucosal isolate. **J. Bacteriol.**, v. 182, p. 6824–6826, Dez. 2000.

RAIMUNDO O. et al. Molecular epidemiology of coagulase-negative staphylococcal bacteraemia in a newborn intensive care unit. **J. Hosp. Infect.**, v. 51, p. 33-42, Maio 2002.

REYES, J. et al. Characterization of macrolide resistance in Gram-positive cocci from Colombian hospitals: a countrywide surveillance. [Int. J. Infect. Dis.](#), v. 11, n. 4, p.329-36, Fev. 2007.

RIBEIRO, A. et al. First Report of Infection with Community-Acquired

Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in South America. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, n. 4, 1985-1988, Abr. 2005.

RILEY, T. V.; PEARMAN, J. W.; ROUSE, I. L. Changing epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Western Australia. [Med. J. Aust.](#), v. 163, n. 8, p. 412-4, Out. 2005.

ROBERTS, R. B. et al. Outbreak in a New York City teaching hospital burn center caused by the Iberian epidemic clone of MRSA. **Microb. Drug Resist.**, v. 4, p.175-183, 1998.

ROHDE, H. et al. Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation via proteolytic processing of the accumulation-associated protein by staphylococcal and host proteases. **Mol. Microbiol.**, v. 55, p. 1883–1895, Mar. 2005.

ROSENTHAL V.D et al. Device-Associated Nosocomial Infections in 55 Intensive Care Units of 8 Developing Countries. **Ann. Intern. Med.**, v. 145, n.8, p.584-591, 2006.

ROSENTHAL V. D., MAKI D. G. Prospective study of impact of open and closed infusion system on rates of central venous catheter-associated bacteremia. **Am. J. Infect. Control.**, v. 32, p. 135-41, Maio 2004.

ROSSNEY, A. S.; SHORE, A. C.; MORGAN, P.M.; FITZGIBBON, M. M.; O’CORNNELL, B.; COLEMAN, D.C. The Emergence and Importation of Diverse Genotypes of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Harboring the Panton-Valentine Leukocidin Gene (*pvl*) Reveal that *pvl* Is a Poor Marker for Community-Acquired MRSA Strains in Ireland. **J. Clin. Microbiol.** v. 45, n. 8, p. 2554–2563, Ago. 2007.

SADER, H. S. JONES, R. N.; GALES, A. C.; SILVA, J. B.; PIGNATARI, A.C.; SENTRY PARTICIPANTS GROUP (LATIN AMERICA). Sentry antimicrobial surveillance program report: Latin American and Brazilian results for 1997 through 2001. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 8, n. 1, p. 25-79, Fev. 2004.

SAGINUR, R. et al. Multiple Combination Bactericidal Testing of Staphylococcal Biofilms from Implant-Associated Infections. **Antimicrobial. Ag. Chemother.**, v. 50, n. 1, p. 55–61, Jan. 2006.

SAID-SALIM, B.; MATHEMA, B.; KREISWIRTH, B.N. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging pathogen. **Infect. Control. Hosp. Epidemiol.**, v. 24, p. 451-455, Jun. 2003.

SAID-SALIM, B. et al. Differential distribution and expression of Panton-Valentine leucocidin among community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, p. 3373–3379, Jul. 2005.

SADER, H., et al. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of SENTRY Antimicrobials Surveillance Program. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 4, p. 200-214, Ago. 2004.

SÁ-LEÃO, R.; SANTOS SANCHES, I.; DIAS, D.; PERES, I.; BARROS, R. M.; DE LENCASTRE, H. Detection of an archaic clone of *Staphylococcus aureus* with low-level resistance to methicillin in a pediatric hospital in Portugal and in international samples: relics of a formerly widely disseminated strain? **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, p.1913-1920, Jun. 1999.

SALYERS, A. A.; WHITT, D. D. Bacterial strategies for evading or surviving the defense systems of the human body. **ASM. Press**, Washington, 2002.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: A laboratory manual. 1989. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

SANTOS, I. S.; MATO, R.; DE LENCASTRE, H.; TOMASZ, A.; CEM/NET COLLABORATORS AND INTERNARTIONAL COLLABORATS. Patterns of multdrug resistance among methicillin-resistant hospital isolates of coagulase-negative staphylococci collected in the international multicenter study resist in 1997 and 1998. **Microb. Drug. Resist.** v. 6, p. 100-211. 2000.

SELANDER, R. K., CAUGANT, D. A.; OCHMAN, H.; MUSSER, J. M.;

GILMOUR, N. M.; WHITTAM, T. S. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.51, p. 873-884. 1986.

SHANKS, R. M. et al. Heparin stimulates *Staphylococcus aureus* biofilm formation. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 4596–4606, Aug. 2005.

STOODLEY, L., STOODLEY, P. Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. [Trends. Microbiol.](#), v. 13, n. 1, p. 7-10, Jan. 2005.

SUN, D.; ACCATIVVI, M. A.; BRYERS, J. D. Inhibition of biofilm formation by monoclonal antibodies against *Staphylococcus epidermidis* RP62A accumulation-associated protein. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 12, p. 93-100, Jan. 2005

TAKASAKI, J. et al. Molecular characterization of an *atl* null mutant of *Staphylococcus aureus*. **Microbiol. Immunol.**, v. 46, p. 601-12, 2002.

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

TENOVER, F. C. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. [J. Clin. Microbiol.](#), n. 33, v. 9, p. 2233-9, Set.1995.

TON-THAT, H.; SCHNEEWIND, O. Anchor structure of staphylococcal surface proteins, versus inhibitors of the cell wall sorting reaction. **J. Biol. Chem.**, v. 20, n. 274, p. 2436-20, Ago. 1999.

TOH, S.M. et al. Acquisition of a natural resistance gene renders a clinical strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* resistant to the synthetic antibiotic linezolid. **Mol. Microbiol.**, v. 64, n. 6, p. 1506-14, 2007.

TORMO, M. A.; KNECHT, E. Bap-dependent biofilm formation by pathogenic species of *Staphylococcus*: evidence of horizontal gene transfer? **Microbiol.**, v. 151, p. 2465-75, Jul. 2005.

TORMO, M. A. et al. Sar A is a essential positive regulation of *Staphylococcus epidermidis* biofilm developed. **J. Bacteriol.**, v. 187, p. 2348-2356, Abr. 2005.

TRINDADE, P. et al. A Prevalence of SCC mec tipo IV in nosocomial bloodstream isolates of methicillin- resistant *Staphylococcus aureus*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, p. 3341-3345, 2005.

TRISTAN, A. et al. Virulence determinants in community and hospital methicillin-resistant in *Staphylococcus aureus* .**J. Hosp. Infect.**, v.65, Suppl.2, p-105-9, Jun. 2007.

UBEDA, C.; BARRY, P.; PENADÉS, J. R.; NOVICK, R, P. A pathogeneticity island replicon in *Staphylococcus aureus* replicates as an unstable plasmid. **PNAS.**, v. 104, n. 36, p. 14182-14188, Jun. 2007.

UDO, E. E.; PEARMAN, J. W.; GRUB, W. B. Genetic analysis of community isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Western Australia. **J. Hosp. Infect.**, v.25, p. 97-108, 1993.

VALLE, J. et al. SarA and not o^B is essential for biofilm development by *Staphylococcus aureus*. **Mol Microbiol.**, v. 48, p. 1075-1087, 2003.

VANDECASTELLE, S. J.; PEETERMANS, W.E.; MERCKX, R.; VAN ELDERE, J. Expression of biofilm-associated genes in *Staphylococcus epidermidis* during in vitro and in vivo foreign body infections. **J. Infect. Dis.**, v. 188, p. 730-7, Set. 2003.

VANDENESH, F. et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton- Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 9, p. 978-984, Ago. 2003.

VAN DER FLIER, M.; VAN DIJK, N. B.; FLUIT, A. C.; FLEER, A.; WOLFS, T. F.; VAN GESTEL, J.P. Fatal pneumonia in an adolescent due to community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* positive for Panton-Valentine-leukocidin. **Ned. Tijdschr. Geneeskd.**, v. 147, p. 1076-1079, Maio 2003.

VAN WAMEL, W. J. VAN WAMEL, W. J.; VAN ROSSUM, G.; VERHOEF, J.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C. M.; FLUIT, A. C. Cloning and characterization of an accessory gene regulator (*agr*)-like locus from *Staphylococcus epidermidis*. **FEMS. Microbiol. Lett.**, v. 163, p. 1-9, Jun. 1998.

VILLARI, P; SARNATARO, C.; INACUZIO, L. Molecular epidemiology of *Staphylococcus epidermidis* in a neonatal intensive care unit over a three year period.

J. Clin. Microbiol., v. 38, n. 5, p. 1740-6, Maio 2000.

VUONG,C. et al. A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. **J. Biol. Chem.**, v. 24, n.279, p. 54881-6, Dez. 2004.

VUONG, C.; OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis* infections. **Microbes. Infect.**, v. 4, p. 481-9, Abr. 2002.

WANNET, W. J. et al. Emergence of virulent methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* strain carrying Panton-Valentine leucocidin genes in the Netherlands. **J. Clin. Microbiol.**, v.43, p. 3435-3437, Jul. 2005.

WATANABE, H .et al. Low Concentrations of Mupirocin in the Pharynx following Intranasal Application May Contribute to Mupirocin Resistance in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* **J. Clin. Microbiol.** v. 39, n. 10, p. 3775-3777, Out. 2001.

WENZEL, R. P.; BEARMAN, G.; EDMOND, M. B. Community-acquired

methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): New issue for infected control. **Intern. J. Antimicrobiol. Ag.**, v. 30, p. 210-212, 2007.

YILMAZ, G.; AYDIN, K.; ISKENDER, S.; CAYLAN, R.; KOKSAL, I. Detection and prevalence of inducible clindamycin resistance in staphylococci . **J. Med. Microbiol.**, v. 56, p. 342-345, Mar. 2007.

ZHANEL, G.G. et al. Antimicrobial-resistant Pathogenes in Intensive Care units in Canada: results of the Canadian National Intensive care units. Study 2005-2006. **Antimicrob. Ag. Chemother.**, v. 52, n. 4, p. 1430-1437, Fev. 2008.

ZIEBUHR, W.; LÖSSNER, I.; RACHID, S.; DIETRICH, K.; GÖTZ, F.; HACKER, J. Modulation of the polysaccharide intercellular adhesin (PIA) expression in biofilm forming *Staphylococcus epidermidis*. Analysis of genetic mechanisms. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 485, p. 151-7, 2000.