

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

**ESTUDO DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTES À METICILINA
(MRSA) POR TÉCNICAS GENOTÍPICAS E FENOTÍPICAS**

ALEXANDRE BRAOIOS

ORIENTADOR: Prof. Dr. Antonio Carlos Pizzolitto

Araraquara - SP

2005

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

**ESTUDO DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTES À METICILINA
(MRSA) POR TÉCNICAS GENOTÍPICAS E FENOTÍPICAS**

ALEXANDRE BRAOIOS

TESE PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM ANÁLISES CLÍNICAS,
ÁREA DE ANÁLISES CLÍNICAS.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Antonio Carlos Pizzolitto

Araraquara - SP
2005

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

B821e Braios, Alexandre
Estudo de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina (MRSA) por técnicas genotípicas e fenotípicas / Alexandre Braios . – Araraquara, 2005. 102 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Análises Clínicas.

Orientador: Antonio Carlos Pizzolitto

1.Staphylococcus aureus. 2.MRSA. 3. Tipagem molecular. 4.PCR multiplex. I. Pizzolitto, Antonio Carlos , orient. II. Título.

CDD: 576

CAPES: 40300005

D e d i c a t ó r i a

Por não acreditar que a vitória seja um mérito individual, dedico meu trabalho a todos vocês que me deram força quando eu fraquejei, me confortaram quando estive cansado, me esperaram quando me demorei, me ampararam quando precisei e me amaram sempre. A vocês ofereço cada página, cada frase e cada palavra aqui escrita. Sem vocês tudo teria sido mais difícil:

Minha Mãe

Meu Pai

Meus Irmãos

Meus Sobrinhos

Meus Amigos

Meu Amor :

*"Nosso maior desejo na vida é encontrar alguém
que nos faça fazer o melhor que pudermos"*

Ralph Waldo Emerson (1803-1882)

AGRADECIMENTOS

- Ao meu orientador, Prof. Dr. Antonio Carlos Pizzolitto, que desde o início confiou em mim e, com humildade e sabedoria, soube me guiar e ensinar.
- Ao Prof. Dr. Antonio Fluminhan Júnior e Profa. Ana Cláudia Ambiel, cuja ajuda foi inestimável.
- Aos queridos companheiros de trabalho, Ana Paula Ramos, Sueli Schadeck, Nádia Miguel, Regina Stilac Rocha, José Giometti, Ana Cristina Messas e Ageane Monteiro Oliveira pelo companheirismo que demonstraram desde o início.
- Aos diretores das faculdades de Farmácia e Enfermagem da UNOESTE, Dr. Leandro Lopes Haidamus e Dra. Nilva Galli, por permitirem minhas ausências e por confiarem em mim.
- Aos técnicos Romério Andrade, Hélcio Kuplans, Luciana Guaberto e Vânia Vicente, por sempre tentarem facilitar o meu trabalho.
- Às funcionárias da secretaria da pós-graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Sônia, Laura e Cláudia, por sempre estarem dispostas a me ajudar.
- À Dra. Márcia Giambiagi-Demarval por ter cedido a cepa JJ1 e por ter ajudado à distância.
- À Ana Carolina Malaspina, Lilian e Dra. Clarice Queico Fujimura Leite pela ajuda com o dendrograma.
- À Profa. Dra. Eliana Varanda e Profa. Dra. Taís Maria Bauab que, com enorme simpatia, ajudaram nas correções deste trabalho.
- À Dra. Maria de Lourdes Corradi Custódio da Silva por ter permitido a utilização do espectrofotômetro.
- Ao Prof. Luiz Carlos Wruck e Prof. Dr. Sérgio do Nascimento Kronka, pela ajuda com a análise estatística.

*“Feliz aquele que transfere o que sabe e
aprende o que ensina”.*

Cora Coralina (1889-1985)

RESUMO

Staphylococcus aureus é um dos principais agentes de infecção humana, especialmente em indivíduos hospitalizados. Cepas MRSA (*Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*) constituem um grave problema em hospitais de todo o mundo, aumentando a morbidade e mortalidade de indivíduos infectados. A vancomicina é uma das únicas opções terapêuticas. No entanto, o uso excessivo desse antibiótico pode selecionar cepas resistentes, agravando ainda mais o problema. Trabalhadores hospitalares podem carrear *S. aureus* nas narinas anteriores e pele e, assim, constituem um importante elo na epidemiologia das infecções nosocomiais. Nesse trabalho foram coletadas amostras das mãos e narinas de 100 trabalhadores do Hospital Universitário “Dr. Domingos Leonardo Cerávolo” da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE, em Presidente Prudente (SP). Desse total, 68% não eram portadores de *S. aureus*, 27% carream *S. aureus* sensível a meticilina, 4% carream MRSA e 1% carream BORSA (*Borderline Oxacillin Resistant Staphylococcus aureus*). No mesmo período (julho a dezembro de 2002), 54,3% das infecções estafilocócicas em pacientes internados nessa Instituição tinham como agente MRSA. A técnica da PCR (*Polymerase Chain Reaction*) Multiplex para a detecção do gene *femA* (gene espécie-específico), *mecA* (resistência à meticilina) e *ileS-2* (resistência à mupirocina) foi comparada com o método da difusão com discos e provas convencionais de identificação. Os resultados da PCR Multiplex apresentaram completa concordância com os resultados obtidos com os testes fenotípicos convencionais. Para verificar a relação genética entre as 30 cepas MRSA, 5 isoladas de trabalhadores e 25 de pacientes, foram realizadas a antibiotipagem e tipagem molecular através da técnica RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). Pela antibiotipagem as cepas MRSA foram agrupadas em 4 antibiotipos (A a D), sendo que 87% pertenciam ao antibiotipo A. Após a análise do padrão de bandas gerado pelo RAPD, 8 grupos (I a VIII) foram definidos por apresentarem 100% de similaridade. Apenas 2 cepas não foram consideradas geneticamente relacionadas pelo RAPD, e apresentaram maior perfil de sensibilidade aos antimicrobianos (antibiotipo B). Por outro lado, 90% das cepas MRSA puderam ser consideradas fortemente relacionadas por apresentarem 90% ou mais de similaridade entre si. Os dados obtidos nesse estudo mostram que no hospital pesquisado existem cepas MRSA com grande similaridade genética, podendo ser isoladas em alguns trabalhadores hospitalares e provocando doença em pacientes. Nessa instituição, MRSA parece ser endêmico uma vez que, desde sua inauguração, há uma alta incidência de infecções por essas cepas. De acordo com a literatura, a medida mais eficaz em diminuir o número de infecções por MRSA em ambientes endêmicos é o isolamento do paciente. Todos os microrganismos isolados nesse estudo apresentaram sensibilidade a mupirocina. O uso de mupirocina pode ser uma medida profilática importante para erradicação nasal de MRSA em portadores assintomáticos, no entanto, a literatura relata experiências sem sucesso em instituições onde há alta incidência de infecções por MRSA e, além disso, pode ocorrer seleção de cepas resistentes a mupirocina. O perfil de sensibilidade aos antimicrobianos, apresentado pela maioria das cepas isoladas nesse estudo, é semelhante àquele encontrado no clone multi-resistente brasileiro presente em diversos hospitais do país. Entretanto, somente a aplicação de técnicas de tipagem com maior poder discriminatório poderia confirmar essa hipótese.

Palavras-chave: MRSA; tipagem molecular; RAPD; epidemiologia molecular; *S. aureus*

ABSTRACT

Staphylococcus aureus is considered as a major infectious disease agent in human, especially in hospitalized people. Methicillin-resistant strains (MRSA) constitute a serious problem in hospitals around the world, increasing the morbidity and mortality rate of infected people. Usually, vancomycin is the only therapeutic choice for the treatment of MRSA infections. However, excessive use of this antibiotic can select resistant strains, aggravating the problem. Health workers can carry *S. aureus* in the anterior nares and skin, constituting an important link for the epidemiology of nosocomial infections. In this study, samples of the hands and nares of one hundred workers from the University Hospital "Dr. Domingos Leonardo Cerávolo", at Presidente Prudente, SP, Brazil, were assessed. Among the one hundred workers, 68% did not carry *S. aureus*, methicillin-susceptible *S. aureus* was found in 27/100 (27%) of those people; MRSA in 4/100 (4%) and BORSA (Borderline Resistant *Staphylococcus aureus*) was found in 1 (1%) health worker. In the same period (July to December of 2002), 54,3% of the staphylococcal infections in hospitalized patients were caused by MRSA. Multiplex PCR assay for the detection of *femA* (species-specific gene), *mecA* (methicillin resistance gene) and *ileS-2* (mupirocin resistance gene) was compared to the disk diffusion susceptibility test and conventional identification test methods. The Multiplex PCR technique results were in complete agreement with the results obtained from conventional methods. Genetic relationship among the 30 MRSA strains, five isolated from workers and twenty five from patients, was established by antibiotyping and molecular typing by RAPD. On the basis of the antibiotyping, the 30 strains were grouped into four clusters (A to D), of which 87% were grouped into antibiotype A. According to the profile of RAPD, eight clusters (I to VIII) were defined as exhibiting 100% of similarity. Only two isolates exhibited low genetic relationship. Those isolates have showed a larger susceptible pattern to antimicrobials (antibiotype B). On the other hand, 90% of the MRSA isolates could be considered strongly related, showing 90% or more of similarity among themselves. The data obtained in the present study shows that, there is a MRSA strain presenting great genetic relationship in this hospital, colonizing some health workers and causing disease in patients. It was found that, in this hospital, MRSA appear to be endemic, because there is a high incidence of diseases for this strain. As described previously, the best measure to decreasing the amount of MRSA diseases is the isolation of infected patients. All *S. aureus* isolated in this study were mupirocin-susceptible. The use of mupirocin can be an important prevention measure for nasal eradication of MRSA in asymptomatic carriers. However, there are several reports on experiences relating failures in hospitals with the occurrence of a high incidence of MRSA and, furthermore, it might occur selection of mupirocin-resistant strains. In this study, the greater number of MRSA isolates have showed antibiotic susceptibility profile like those found in the Brazilian clone presented in various hospitals of the country. However, only the application of typing methods with best discriminatory power may confirm this hypothesis.

Keywords: MRSA; molecular typing; RAPD; molecular epidemiology; *S. aureus*

SUMÁRIO

1- Introdução	9
2- Revisão Bibliográfica	12
2.1- <i>Staphylococcus aureus</i>	12
2.2- Resistência de <i>S. aureus</i> aos antimicrobianos	13
2.3- Bases genéticas da resistência de <i>S. aureus</i> aos β -lactâmicos	16
2.4- Epidemiologia das infecções por MRSA	22
2.5- Detecção de Resistência	24
2.6- Tipagem de <i>S. aureus</i>	27
3- Objetivos	31
4- Material e Métodos	33
4.1- Amostra populacional	33
4.2- Coleta e manutenção das amostras	34
4.3- Identificação das cepas isoladas	35
4.4- Teste de sensibilidade aos antimicrobianos ou antibiotipagem	35
4.5- Confirmação de resistência à oxacilina com <i>screen agar</i>	36
4.6- Determinação da Concentração Inibitória Mínima para oxacilina	37
4.7- Teste de produção de beta-lactamase	37
4.8- PCR Multiplex	37
4.9- Tipagem molecular (RAPD)	41
5- Resultados	44
5.1- Frequência de portadores sadios de MSSA, MRSA e BORSA	44
5.2- Frequência de MSSA, MRSA e BORSA em pacientes	47
5.3- Determinação da CIM para oxacilina	51
5.4- Antibiotipagem	51
5.5- PCR Multiplex	55
5.6- Tipagem Molecular (RAPD)	59
6- Discussão	65
7- Conclusões	81
8- Referências Bibliográficas	83
Anexos	95

1- Introdução

Certamente, um dos microrganismos mais amplamente estudados seja *Staphylococcus aureus*. Isso se deve ao fato de que essa bactéria faz parte da microbiota e, portanto, sempre esteve envolvida em diversos processos infecciosos, atingindo homens e animais desde suas origens. Como patógeno humano, sempre foi responsável por grande morbidade e mortalidade. Outro aspecto que desperta grande interesse na comunidade científica é a capacidade deste microrganismo de desenvolver resistência aos antimicrobianos.

A descoberta da penicilina representou uma revolução na Medicina. Doenças infecciosas passaram a ser passíveis de cura e, a partir desta descoberta, novas drogas antimicrobianas foram desenvolvidas, evitando muitas seqüelas e mortes. No entanto, os microrganismos apresentaram uma enorme capacidade de adaptação e as “balas mágicas”, capazes de salvar milhares de vidas, exerciam também uma pressão sobre os microrganismos, selecionando aqueles mais resistentes.

Na atualidade, cepas multi-resistentes são responsáveis por diversos surtos em todo o mundo. O arsenal terapêutico tem ficado cada vez mais limitado e novas pesquisas tentam descobrir drogas mais potentes capazes de vencer a guerra contra os inimigos microscópicos. Ao tratar doenças infecciosas causadas por *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) ou oxacilina (ORSA), os médicos dispõem de poucas alternativas terapêuticas. Uma destas alternativas são os glicopeptídeos, como a vancomicina, um antimicrobiano caro e, sua utilização já selecionou cepas resistentes a ela.

Como o tratamento dessas doenças infecciosas tem se tornado cada dia mais difícil, é necessário conhecer profundamente sua epidemiologia a fim de podermos estabelecer planos de controle e prevenção. Cepas MRSA são mais comuns em instituições de saúde, onde a pressão antibiótica é maior. Diversos surtos são relatados a cada ano e a descoberta da fonte propagadora do microrganismo é de importância fundamental para o controle. *Staphylococcus aureus*, tanto os sensíveis como os resistentes à meticilina, podem habitar as narinas anteriores das pessoas, especialmente aquelas que convivem diariamente com indivíduos infectados, como enfermeiros e médicos.

Com o surgimento deste problema, novos campos de pesquisa se abriram na tentativa de comprovar a relação entre microrganismos causadores de surtos e microrganismos isolados do ambiente ou de portadores sadios. Técnicas de tipagem foram desenvolvidas com a finalidade de identificar clones de uma espécie bacteriana e que poderiam confirmar que determinado surto estaria ocorrendo devido a uma cepa em particular que teria se originado e disseminado a partir de uma fonte específica. Técnicas fenotípicas, como a fagotipagem, biotipagem, sorotipagem e antibiotipagem foram usadas com este propósito. No entanto, o baixo poder discriminatório e a baixa reprodutibilidade eram obstáculos, já que estas técnicas utilizam produtos da expressão gênica que podem variar de acordo com as condições de cultivo, fases de crescimento e ocorrência de possíveis mutações. Como alternativa, foram desenvolvidas técnicas de tipagem genotípicas que analisam diretamente o material genético do microrganismo e que, portanto, são menos variáveis ou influenciadas por fatores ambientais.

Em Presidente Prudente (SP), a realidade das infecções nosocomiais ainda não é bem estudada. Cepas MRSA são isoladas freqüentemente,

constituindo um grave problema para a saúde de pessoas hospitalizadas. No entanto, nenhum trabalho foi realizado visando o conhecimento do perfil de sensibilidade e da relação genética das cepas isoladas nos hospitais dessa cidade.

No presente estudo, foi pesquisado *Staphylococcus aureus* nas narinas e mãos de trabalhadores do Hospital Universitário “Dr. Domingos Leonardo Cerávolo”, da Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE, em Presidente Prudente (SP), no período de julho a dezembro de 2002. Cepas de *S. aureus* que foram isoladas de amostras biológicas de pacientes apresentando sintomas de processo infeccioso, no mesmo período, também foram selecionadas para o estudo.

Foram avaliados e comparados os perfis de sensibilidade aos antimicrobianos das cepas isoladas de trabalhadores e pacientes. A técnica RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) foi utilizada com o objetivo de avaliar a relação, ou similaridade genética das cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina/oxacilina (cepas MRSA).

O conhecimento do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos e a avaliação da relação genética existente entre as cepas MRSA isoladas nesse hospital, podem fornecer valiosos dados para a Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) local.

2- Revisão Bibliográfica

2.1- *Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus* é composto por microrganismos esféricos, produtores da enzima catalase, tolerantes a altas concentrações de NaCl e ao ressecamento, imóveis e não são capazes de produzir esporos. Estes microrganismos são ubiqüitários e podem ser comumente encontrados na pele, glândulas da pele e membranas mucosas de aves e mamíferos, em geral relacionando-se simbioticamente com seus hospedeiros. O nome “Staphylococcus” (*staphylé* – cacho de uva) foi introduzido por Ogston em 1883, descrevendo um grupo de micrococcos causadores de inflamação e supuração (KLOOS & BANNERMAN, 1994).

Tradicionalmente os estafilococos são divididos em dois grupos de acordo com a capacidade de produção da enzima coagulase: os estafilococos coagulase-positivo e estafilococos coagulase-negativo. Pertencente ao primeiro grupo, *S. aureus* é considerado um dos principais patógenos humanos. Essa bactéria é responsável por processos infecciosos agudos, como furúnculos, hordéolos e abscessos, e pode ainda produzir toxinas responsáveis por sérias patologias, tais como: Síndrome do Choque Tóxico, intoxicações alimentares, Doença de Ritter entre outras (KLOOS & BANNERMAN, 1994).

Staphylococcus aureus é um dos organismos mais bem documentados como patógeno oportunista humano. A colonização assintomática é mais comum do que a ocorrência de processos infecciosos. Este organismo pode ser encontrado na nasofaringe, períneo e pele (CHAMBERS, 2001). O caráter oportunista faz do *S. aureus* um dos mais importantes agentes de infecção

nosocomial, aumentando severamente a morbidade e mortalidade de indivíduos hospitalizados (KLOOS & BANNERMAN, 1994).

2.2- Resistência de *S. aureus* aos agentes antimicrobianos

Em 1928 Alexander Fleming anunciou a descoberta de uma substância produzida pelo fungo *Penicillium notatum* que apresentava efeito inibitório sobre algumas bactérias. Assim, o tratamento das doenças infecciosas ganhava novas perspectivas. A partir desse fato a indústria farmacêutica recebeu grandes investimentos e promoveu a expansão da pesquisa de novos antibióticos. Até o final da década de 1960 muitos antibióticos foram introduzidos no mercado, geralmente com pequenas modificações nas moléculas das drogas já conhecidas. Porém, quase tão rápido quanto as descobertas dos antibióticos, verificou-se o aparecimento de cepas bacterianas resistentes aos mesmos, principalmente devido ao seu uso indiscriminado e inadequado (MANRIQUE & GALVÃO, 1997).

Staphylococcus aureus sempre foi um dos maiores agentes de doença infecciosa especialmente em hospitais. Antes da descoberta dos antibióticos, a mortalidade entre pessoas com bacteremia estafilocócica chegava a 80% e a introdução da penicilina G mudou drasticamente esta situação (BRAKSTAD & MAELAND, 1997). Com o uso excessivo de antibióticos, especialmente penicilina G, algumas cepas resistentes a essa droga começaram a se tornar um grave problema dentro dos hospitais. No início da década de 1970, médicos de todo mundo foram forçados a abandonar a crença de que todas as infecções bacterianas eram tratáveis, tendo em vista a grande quantidade de agentes antimicrobianos disponíveis. O otimismo foi abalado pela emergência de microrganismos apresentando múltipla resistência. Aos poucos a multi-resistência deixou de ser

exceção para se tornar uma regra entre determinados microrganismos, tais como estafilococos, enterococos e pneumococos (LOWY, 2003)

Na década de 1980, a mortalidade por bacteremia estafilocócica permanecia entre 20 a 40% apesar do grande número de agentes antimicrobianos disponíveis (MYLOTTE et al., 1987).

A resistência à penicilina G e a outros β -lactâmicos se dá principalmente pela produção de enzimas denominadas β -lactamases que inativam o antibiótico pela quebra do anel β -lactâmico. Jack & Richmond propuseram, em 1970, o primeiro esquema de classificação das β -lactamases, que foi expandida três anos depois por Richmond & Sykes (LIVERMORE, 1995). Ambler, em 1980, classificou as β -lactamases em quatro classes (A a D) de acordo com suas estruturas moleculares (LIVERMORE, 1995). Bush et al. (1995) propuseram uma classificação de acordo com o substrato preferencial da enzima e sua susceptibilidade à inibição por clavulanato. Assim as β -lactamases estafilocócicas pertencem ao grupo funcional 2a de Bush e à classe estrutural A de Ambler. Kirby (1944) (*apud* CHAMBERS, 2001) relatou pela primeira vez a existência de cepas de *S. aureus* produtoras de β -lactamase apenas dois anos após a introdução da penicilina. No entanto, esta resistência não era freqüentemente relatada e ocorria quase exclusivamente em cepas hospitalares. Segundo o autor, as cepas isoladas da comunidade permaneciam sensíveis à penicilina G. Seis anos depois, 25% das cepas isoladas em hospitais apresentavam tal resistência, e em mais uma a duas décadas, a mesma porcentagem de cepas resistentes à penicilina G era isolada da comunidade (CHAMBERS, 2001).

Em 1959 foi introduzida a primeira penicilina semi-sintética resistente às β -lactamases, a meticilina, para resolver o problema do aumento da

prevalência de *S. aureus* produtores dessas enzimas. Algum tempo depois, com o surgimento das isoxazolilpenicilinas (oxacilina, dicloxacilina, cloxacilina e flucloxacilina) que são estáveis em pH ácido e apresentam alto índice de ligação às proteínas plasmáticas (80%), a meticilina deixou de ser comercializada em muitos locais, inclusive no Brasil (AMATO NETO et al., 2000). No entanto, em 1961, foi reportado o primeiro caso de resistência à meticilina, e 25 a 30 anos depois, 25% das cepas hospitalares eram resistentes a esta droga (LIVERMORE, 2000; ENRIGHT et al., 2002). Baseado na experiência com as cepas resistentes à penicilina G, Chambers (2001), projetou para 2006 a 2010 a prevalência de 25% de cepas MRSA isoladas da comunidade. Apesar da oxacilina ser usada no Brasil, e não a meticilina, continua sendo empregada a expressão “meticilina-resistente” ou a sigla MRSA (do inglês *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*) para designar as cepas de *S. aureus* que não respondem ao tratamento com meticilina e, por extensão, com as demais isoxazolilpenicilinas (AMATO NETO et al., 2000).

Os antimicrobianos β -lactâmicos, tais como: cefalosporinas, oxacilinas, meticilina e outras penicilinas agem na etapa final da síntese do peptidoglicano, ligando-se às transpeptidases e impedindo a formação da parede bacteriana. Estes antimicrobianos apresentam excelente toxicidade seletiva, uma vez que as células humanas não possuem parede celular, como as bactérias. Por essa razão são os antibióticos de escolha, especialmente para gestantes (SEFTON, 2002).

O crescente isolamento de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina levou ao uso cada vez maior dos glicopeptídeos, como a vancomicina, para o tratamento. Este fato criou, mais uma vez, forte pressão seletiva e assim, cepas de *Enterococcus* e *Staphylococcus* vancomicina-resistentes têm sido

isoladas (LOWY, 2003). Este fato, mais o risco de transferência de genes de resistência via plasmídios, tem apontado para a necessidade de uma redução drástica no uso de vancomicina (VANNUFFEL et al., 1995). Além do risco de seleção, o uso de vancomicina aumenta significativamente os custos do tratamento (NICOLA et al., 2000).

Além dos glicopeptídeos, outras drogas, tais como gentamicina, sulfazotrim e rifampicina, podem ser efetivas no tratamento de infecções por MRSA. No entanto, é comum estas cepas apresentarem multi-resistência e demonstrarem sensibilidade apenas à vancomicina (MULLIGAN et al., 1993; WITTE, 1999).

A resistência adquirida pode ser consequência de uma mutação ou aquisição de DNA extrínseco, via transformação, transdução ou mais comumente, pela conjugação (SEFTON, 2002).

2.3- Bases genéticas da resistência de *S. aureus* aos β -lactâmicos e mupirocina

A resistência de *S. aureus* à penicilina G é mediada pelo gene plasmidial *blaZ* que codifica a β -lactamase. Esta enzima é sintetizada quando a bactéria é exposta ao antibiótico (resistência induzível) e age hidrolizando o anel β -lactâmico. O gene *blaZ* é regulado por dois outros genes, o anti-repressor *blaR1* e o repressor *blaI*. O gene *blaR1* codifica uma proteína relacionada com a transdução de sinais, e *blaI* codifica uma proteína repressora que se liga ao sítio operador impedindo a RNA-polimerase de se ligar e transcrever os genes *blaZ* e *blaR1* (HACKBARTH & CHAMBERS, 1993; LOWY, 2003).

A proteína transmembrana de transdução de sinal BlaR1 possui um sítio extracelular de ligação à penicilina e um sinalizador intracelular. A ligação da

penicilina ao sítio de ligação extracelular estimula, intracelularmente, a ativação autocatalítica dessa proteína. Cada molécula de BlaR1 ativada cliva, direta ou indiretamente (uma vez que outra proteína, BlaR2, também pode participar), a proteína Blal em fragmentos inativos permitindo assim a transcrição de *blaZ* e *blaR1* com conseqüente síntese da β -lactamase. Portanto, na ausência de penicilina a β -lactamase é expressa em baixos níveis, uma vez que Blal não sofre clivagem e consegue se ligar impedindo a transcrição (LOWY, 2003).

Alto nível de resistência de *S. aureus* à meticilina/oxacilina é reconhecido como um exemplo típico de resistência mediada por cromossomo. Este tipo de resistência é chamado de resistência intrínseca uma vez que não é devido à destruição do antibiótico por β -lactamases e sim por modificações na estrutura-alvo do antimicrobiano (MONTANARI et al., 1990).

As PBPs (*Penicillin-binding protein*) possuem função de peptidoglicano-transpeptidases e funcionam como ligases na reação pentaglicil transpeptidação, ou seja, atuam na “montagem” final do peptidoglicano da parede bacteriana. As PBPs têm alta afinidade por antibióticos β -lactâmicos, aos quais se ligam covalentemente inibindo a transpeptidação, resultando assim na inibição da etapa final da síntese do peptidoglicano. Cepas de *Staphylococcus* spp. sensíveis à meticilina apresentam cinco PBPs: PBP1, PBP2, PBP3, PBP3' e PBP4, com pesos moleculares entre 41 a 87 Kda (BRAKSTAD & MAELAND, 1997). Alguns autores consideram apenas as quatro principais PBPs, excluindo PBP3' (BERGER-BÄCHI, 1999).

A base molecular da resistência à meticilina é a síntese de uma PBP adicional, referida como PBP2a ou PBP2', e que é caracterizada pela baixa afinidade à maioria dos antibióticos β -lactâmicos. A síntese de PBP2a pode ser

afetada por condições de cultivo. Assim, não há expressão de PBP2a em pH 5,2 e em temperatura de 42°C (BRAKSTAD & MAELAND, 1997). A PBP2a é codificada cromossomicamente pelo gene *mecA* que está localizado em um elemento de 32 a 60 Kb, o elemento *mec*, que não tem equivalente alélico em cepas sensíveis à meticilina. Estudos epidemiológicos e genéticos sugerem que cepas MRSA adquirem o elemento *mec* de estafilococos coagulase-negativos. Entretanto, o modo de transferência não está totalmente esclarecido (BERGER-BÄCHI, 1999; PETINAKI et al., 2001).

A regulação da expressão de resistência à meticilina/oxacilina ocorre de maneira semelhante à regulação da resistência à penicilina G. Os antibióticos β -lactâmicos, exceto meticilina e oxacilina, induzem a expressão de PBP2a. A indução ocorre pela ligação do antibiótico à proteína MecR1 resultando em sua ativação, que por sua vez cliva *Mecl* permitindo a transcrição de *mecA* (LOWY, 2003). Os segmentos plasmidiais *blaI-blaR1* apresentam 61% e 34% de analogia com os genes cromossômicos *mecl* e *mecR1* respectivamente. Isso sugere que a função regulatória e/ou a origem do elemento *mecR* são similares aos elementos *bla*. Assim como a β -lactamase, a síntese de PBP2a também é induzida por antibióticos β -lactâmicos em cepas que possuem plasmídio codificador da enzima (HACKBARTH & CHAMBERS, 1993; HIRAMATSU et al., 2001).

Thornsberry et al., (1986) (*apud* VARALDO, 1993) comprovaram que baixo nível de resistência à meticilina pode ser de caráter extrínseco, ou seja, mediada por β -lactamase em cepas de *S. aureus* com sensibilidade intermediária (ou resistência diminuída). Segundo o mesmo autor, as cepas de *S. aureus* com esta característica de resistência são chamadas de “borderline” resistentes, “borderline”

sensíveis ou simplesmente BORSA (*Borderline Oxacillin Resistant Staphylococcus aureus*).

O mecanismo de resistência “borderline” ainda não está totalmente esclarecido. Alguns estudos demonstraram a presença de PBP2a em cepas BORSA, e outros demonstraram somente a hiperprodução de β -lactamase (MONTANARI et al., 1990; MULLIGAN et al., 1993; VARALDO, 1993; BRAKSTAD & MAELAND, 1997). Barg et al., em 1991 (*apud* BRAKSTAD & MAELAND, 1997) demonstraram que a hiperprodução de β -lactamase não é a única causa da resistência “borderline”. Quando o plasmídio codificador da enzima foi transferido para duas cepas não produtoras, somente uma delas apresentou resistência “borderline”, consistente com a suposição que tanto a hiperprodução da enzima como um pequeno aumento na resistência intrínseca é requerido para a emergência de resistência “borderline”. Cepas BORSA são caracterizadas por Concentração Inibitória Mínima (CIM) de oxacilina próximas do ponto de corte de sensibilidade, de 2 a 4 $\mu\text{g/mL}$ (NICOLA et al., 2000).

Em resumo, a resistência de *S. aureus* à meticilina pode ser mediada pelo gene cromossômico *mecA*, que codifica a PBP2a com baixa afinidade aos antibióticos β -lactâmicos e expressa resistência a altos níveis da droga. A expressão deste gene é constitutiva ou induzível por algum antibiótico β -lactâmico, mas não por meticilina e oxacilina. Pode ainda ser consequência da hiperprodução de β -lactamase, ou resistência *mec*-independente, que em grande quantidade seria capaz de hidrolisar tanto a penicilina G como a meticilina e oxacilina, expressando baixos níveis de resistência a essas drogas. Isso implica que, infecções por cepas com resistência *mec*-independente podem ser tratadas com inibidores de β -

lactamases, uma vez que se tornam amplamente sensíveis na presença de clavulanato, um inibidor desta enzima (VARALDO, 1993; FLUIT et al., 2001). Por outro lado, cepas resistentes devido à produção de PBP2a (*mecA*⁺) quase sempre são tratadas com glicopeptídeos, implicando em maior custo e favorecendo a seleção de cepas resistentes a esse grupo de antimicrobianos. Deste modo, a diferenciação laboratorial destes dois mecanismos de resistência é extremamente importante para orientar o tratamento das infecções provocadas por *S. aureus*.

Além dos genes diretamente envolvidos na expressão de resistência à metilina/oxacilina (*mec*) outros genes que regulam a síntese e degradação do peptidoglicano participam indiretamente dessa resistência. Qualquer modificação estrutural do precursor do peptidoglicano ou a redução de sua síntese resulta em diminuição da resistência (BERGER-BÄCHI, 1999). A expressão de resistência somente ocorre em cepas que produzem uma cadeia muropeptídica que é caracterizada pela adição seqüencial de resíduos de glicina, sob o controle de proteínas designadas fatores essenciais para resistência à metilina (Fem). Essas proteínas são codificadas pelos genes *femA*, *femB*, *femC*, *femD* e *femE* (LABISCHINSKI et al., 1998; HADDADIN et al., 2002). Estudos revelaram que a inativação do gene *femA* resulta em diminuição da resistência à metilina (MAIDHOF et al., 1991). Independente da presença do gene *mecA*, mutantes *femA*⁻ apresentam significativa redução de glicina no peptidoglicano, e uma das conseqüências dessa redução é o aumento da sensibilidade aos β-lactâmicos (MAIDHOF et al., 1991). Apesar do envolvimento na resistência à metilina, o gene *femA* está presente tanto em cepas sensíveis como em cepas resistentes (VANNUFFEL et al., 1999).

Um gene *femA* homólogo também foi caracterizado em *S. epidermidis*, *S. simulans*, *S. saprophyticus* e *S. hominis*. A organização genômica de todos esses genes é altamente conservada, com alternância de regiões homólogas e variáveis. Essas variações inter-espécies foram exploradas para definir estratégias para identificação espécie-específica (VANNUFFEL et al., 1999).

A mupirocina é um antibiótico produzido por *Pseudomonas fluorescens* e foi introduzida no mercado em 1985. Esse antibiótico age ligando-se competitivamente à enzima isoleucil RNAt-sintetase (IRS), inibindo assim a síntese protéica (HUGES & MELLOWS, 1980 *apud* NUNES et al., 1999).

De acordo com Gilbert et al. (1993) (*apud* NUNES et al., 1999), cepas resistentes à mupirocina podem ser divididas em dois grupos de acordo com o nível de resistência. Cepas com baixo nível de resistência ($CIM \geq 8$ a ≤ 256 $\mu\text{g/mL}$) produzem uma enzima IRS modificada com baixa afinidade pela mupirocina. Essa modificação ocorre devido a mutação no gene cromossômico *ileS* que codifica a isoleucil RNAt-sintetase. O mecanismo da baixa resistência à mupirocina ainda não está completamente esclarecido. Cepas com alto nível de resistência ($CIM \geq 512$ $\mu\text{g/mL}$) apresentam um gene adicional (*ileS-2*) localizado em um plasmídio conjugativo. Alguns estudos demonstraram a presença de uma cópia cromossômica do gene *ileS-2* codificando baixo-nível de resistência, assim os autores sugerem que o baixo-nível de resistência difere da resistência de alto-nível somente pela localização e/ou número de cópias do gene *ileS-2* (NUNES et al., 1999; RAMSEY et al., 1996). Esse gene codifica uma enzima que não apresenta afinidade com mupirocina. Essa IRS apresenta somente 30% de similaridade na seqüência de

aminoácidos com a IRS endógena de *S. aureus* (LESKI et al., 1999; PÉREZ-ROTH et al., 2001; YUN et al., 2003).

Nas cepas com alto-nível de resistência, a localização plasmidial do gene *ileS-2*, pode ter como consequência a transferência desse plasmídeo a outros microrganismos, constituindo um grande problema hospitalar. O uso de mupirocina pode servir para erradicação de cepas com baixo nível de resistência, mas não para aquelas com alto nível (MEHTAR, 1998; HARBARTH et al., 1999).

2.4- Epidemiologia das Infecções por MRSA

Herold et al. (1998) (*apud* CHAMBERS, 2001), relataram o isolamento de cepas MRSA em crianças da comunidade, e isso têm levado à especulação de que a epidemiologia do MRSA está se modificando gradativamente, uma vez que as infecções por MRSA têm sido adquiridas quase exclusivamente em hospitais. Humanos são os reservatórios naturais de *S. aureus* e a transmissão ocorre por contato direto com um hospedeiro colonizado. A colonização pode ser transitória ou persistente e pode durar anos (KLUYTMANS et al., 1997).

De acordo com Boyce (1998) (*apud* CHAMBERS, 2001), os principais fatores de risco para colonização ou infecção por MRSA são (i) exposição a antibióticos; (ii) internação em Unidades de Terapia Intensiva (UTI); (iii) cirurgia e (iv) exposição a um indivíduo colonizado. Pessoas da comunidade com infecção por MRSA geralmente têm um histórico de hospitalização recente; contato íntimo com uma pessoa que foi hospitalizada ou outros fatores de risco, como o uso prévio de antibióticos (CHAMBERS, 2001). Em outro estudo é relatada a seleção de *S. aureus* com altos níveis de resistência a oxacilina após exposição a fluoroquinolonas *in vitro*,

sugerindo que os mecanismos de resistência a oxacilina e a fluoroquinolonas podem estar associados (VENEZIA et al., 2001).

A prevalência de cepas de MRSA pode variar em diferentes regiões, entretanto os números tendem a se elevar cada vez mais. Nos Estados Unidos, as infecções por MRSA passaram de 5%, na década de 1980, para 29% em 1991 (KLUYTMANS et al., 1997). Voss et al. (1994 *apud* BRAKSTAD & MAELAND, 1997) relataram que a prevalência de MRSA na Espanha, França e Itália, em 1994 estava em torno de 30%. No Japão, mais de 60% dos isolados de *Staphylococcus aureus* eram resistentes à meticilina/oxacilina (KIMURA et al., 1992 *apud* WITTE, 1999). No Brasil esta prevalência era de 56% (TEIXEIRA et al., 1995). Trabalhos mais recentes indicam uma prevalência de 29 a 35% de MRSA nos Estados Unidos e Europa (HADDADIN et al., 2002).

A colonização por *S. aureus* precede a infecção e os maiores reservatórios deste organismo são as narinas anteriores. Geralmente estas cepas são introduzidas em uma instituição por meio de um paciente colonizado ou um indivíduo da equipe hospitalar e o principal modo de transmissão se dá através das mãos destes trabalhadores (MULLIGAN et al., 1993). A taxa média de colonização da equipe hospitalar por *S. aureus* é de 27%, podendo variar de 16 a 56% (KLUYTMANS et al., 1997). Por outro lado, a taxa de colonização por MRSA pode variar de 2 a 56% (MULLIGAN et al., 1993). Além da transmissão por contato direto, os equipamentos e utensílios manipulados por pessoas colonizadas podem desempenhar importante papel na epidemiologia das infecções por MRSA (DIAS et al., 1997). Existem três padrões de carreamento de *S. aureus*: (i) 20% das pessoas são carreadores persistentes, ou seja, sempre carregam uma mesma cepa; (ii) cerca de 60% das pessoas abrigam *S. aureus* intermitentemente e, em geral, as cepas não

são as mesmas e (iii) cerca de 20% não carregam a bactéria. Os carreadores persistentes parecem estar protegidos da aquisição de outras cepas. No entanto, essa proteção é diminuída quando ocorre o uso de antibióticos (KLUYTMANS et al., 1997). VandenBergh et al. (1999) pesquisaram *S. aureus* em 91 funcionários de uma universidade holandesa e encontraram 47% de não carreadores; 17% de carreadores intermitentes e 36% de carreadores persistentes.

Usando técnicas de fenotipagem ou genotipagem é possível determinar a origem da cepa causadora de surtos hospitalares. Alguns estudos utilizando estas técnicas comprovaram a transmissão de cepas MRSA, carregadas pela equipe hospitalar para pacientes (BYUN et al., 1997; AHMED et al., 1998; SOUSA et al., 2000).

A erradicação de *S. aureus*, incluindo MRSA, com mupirocina (ácido pseudomônico A) tem sido efetivo em prevenir infecções pós-operatórias em pacientes submetidos a cirurgias cardíacas, em pacientes submetidos à hemodiálise e queimados (FUCHS et al., 1990; MEHTAR, 1998; KRISHMAN et al., 2002). Além disso, alguns autores relataram sucesso na erradicação nasal de *S. aureus* (FUCHS et al., 1990; HARBARTH et al., 1999; LESKI et al., 1999). Por outro lado, o uso indiscriminado de mupirocina pode favorecer a seleção de cepas resistentes e assim, a utilização ou não desse antibiótico, para esse propósito, é controverso (HARBARTH et al., 1999; KRISHMAN et al., 2002; PÉREZ-ROTH et al., 2002).

2.5- Detecção de Resistência

A expressão fenotípica de resistência à meticilina é freqüentemente heterogênea e os métodos fenotípicos podem falhar na detecção desta resistência, uma vez que, a expressão fenotípica pode ser influenciada pelas condições de cultivo, como temperatura, pH e concentração de NaCl do meio. Como

conseqüência, cepas com baixos níveis de resistência podem não ser detectadas, uma vez que duas subpopulações podem co-existir na mesma cultura e nem todas as células, apesar de possuírem a informação genética, expressam *in vitro* o fenótipo de resistência (MURAKAMI et al., 1991). A distinção entre cepas hiperprodutoras de penicilinase e cepas verdadeiramente resistentes à meticilina (*mecA*⁺) é problemática (BROWN, 2001).

A técnica da difusão em ágar com discos de oxacilina é a mais usada em laboratórios. Porém, a expressão fenotípica de resistência pode variar e isso pode afetar a reprodutibilidade e sensibilidade do método (MARTINEAU et al., 2000b). O NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*) recomenda a utilização do ágar Mueller-Hinton suplementado com 4% de NaCl e 6µg/mL de oxacilina, o *screen agar*, para confirmação de resistência à meticilina (NCCLS M2-A7, 2000). Alguns pesquisadores relatam a dificuldade de detecção de cepas com resistência “borderline” usando o *screen agar* e sugerem a realização do teste de difusão em ágar, utilizando duas temperaturas de incubação: 35 e 42°C, uma vez que PBP2a não é expressa a 42°C (NICOLA et al., 2000). Em suma, a utilização do *screen agar* tem grande valor na confirmação de altos níveis de resistência, ou seja, para detecção de cepas que possuem o gene *mecA* codificando a resistência por meio da produção de PBP2a. Entretanto, cepas com baixos níveis de resistência (BORSA) e cepas hetero-resistentes, onde em uma população bacteriana co-existem sub-populações expressando diferentes níveis de resistência, podem não ser detectadas por estas técnicas.

Cepas com baixos níveis de resistência (BORSA), hiperprodutoras de β-lactamase, podem ser detectadas através do teste que utiliza uma cafosporina cromogênica, o teste do Nitrocefin (BIGNARDI et al., 1996). A

positividade do teste Nitrocefin mais a sensibilidade a amoxicilina/ácido clavulânico (halo ≥ 20 mm) servem como critério para a caracterização de cepas hiperprodutoras de β -lactamase e que não apresentam o gene *mecA* (GEHA et al., 1994; MARTINEAU et al., 2000a; PETINAKI et al., 2001).

Atualmente, a técnica considerada “padrão ouro”, para detecção de resistência à meticilina é a amplificação do gene *mecA* através da técnica da PCR. No entanto, cepas com baixos níveis de resistência não podem ser detectadas utilizando este marcador molecular, uma vez que esta resistência não é mediada pelo gene *mecA* (MARTINEAU et al., 2000a; BROWN, 2001; FLUIT et al., 2001; GRADELSKI et al., 2001; PÉREZ-ROTH et al., 2001).

Variações na técnica da PCR têm sido propostas com a intenção de amplificar e detectar mais de um gene em uma mesma reação. Os genes alvos podem ser genes de resistência a diferentes antimicrobianos, genes de virulência e/ou genes espécie-específicos para identificação bacteriana. Assim, em uma mesma reação é possível identificar o microrganismo e avaliar sua resistência e virulência. Essas técnicas recebem o nome de PCR Multiplex e têm sido amplamente usadas com diferentes propósitos (MASON et al., 2001; MARKOULATOS et al., 2002). Vannuffel et al. (1995), realizaram a técnica de PCR Multiplex para a amplificação simultânea dos genes *mecA* e *femA*. Martineau et al. (2000a) realizaram simultaneamente sete ensaios de PCR Multiplex, sendo que cada ensaio continha *primers* espécie-específicos para *S. aureus* e *S. epidermidis* e mais um par de *primers* para amplificação de um dos seguintes genes de resistência: *aac(6’)-aph(2’)* (gentamicina), *ermA*, *ermB*, *ermC* e *msrA* (eritromicina), *blaZ* (penicilina) e *mecA* (oxacilina). Pérez-Roth et al., em 2001, realizaram a técnica utilizando *primers* para detecção dos genes *mecA*, *ileS-2* e *femB*.

Vários parâmetros devem ser criteriosamente avaliados para que a técnica da PCR Multiplex forneça resultados consistentes. Especialmente importantes são a concentração de *primers*, concentração de tampão, temperatura dos ciclos e proporção de cloreto de magnésio e dNTP (MARKOULATOS et al., 2002). A realização de PCR Multiplex com o objetivo de amplificar vários fragmentos-alvo com tamanhos muito diferentes, freqüentemente favorece a amplificação do fragmento-alvo mais curto, resultando em diferentes quantidades do produto amplificado (BEJ et al., 1990).

2.6- Tipagem de *Staphylococcus aureus*

Geralmente o agente etiológico causador de um surto é derivado de uma única célula, e seus descendentes são geneticamente idênticos ou fortemente relacionados. Em termos epidemiológicos, os organismos envolvidos no surto são clonalmente relacionados, pois têm uma origem comum. Porém, existe suficiente diversidade nas espécies, e organismos isolados de diferentes fontes, períodos e regiões geográficas podem ser diferenciados ou classificados em subtipos ou cepas (OLIVE & BEAN, 1999).

Maslow et al., em 1993 (*apud* TENOVER et al., 1994) caracterizaram os sistemas de tipagem usando cinco critérios: (i) Tipabilidade, que é a habilidade da técnica em produzir um resultado não ambíguo para cada isolado examinado. Portanto, isolados não tipáveis são aqueles que produzem resultados nulos ou ambíguos; (ii) Reprodutibilidade, que é a habilidade da técnica em produzir o mesmo resultado quando o isolado é testado repetidamente; (iii) Poder discriminatório, que é a habilidade da técnica em discriminar isolados não relacionados; (iv) Facilidade de interpretação e (v) Facilidade de execução.

Em princípio, todos os organismos de uma mesma espécie devem ser tipáveis pela técnica utilizada, ou seja, a característica analisada deve estar presente em todos os membros da espécie. Por exemplo, a fagotipagem freqüentemente é aplicada para caracterização de *S. aureus*, mas existem isolados dessa espécie que não apresentam receptores para bacteriófagos, assim não podem ser fagotipados (TAMBIC et al., 1997).

Além da fagotipagem outras técnicas fenotípicas são usadas na caracterização de microrganismos. A biotipagem utiliza características bioquímicas do microrganismo para classificá-lo. Entretanto essa técnica apresenta baixa reprodutibilidade e baixo poder discriminatório, uma vez que a expressão fenotípica dessa característica pode variar. O padrão de sensibilidade aos antimicrobianos tem baixo poder discriminatório, pois os microrganismos podem modificar seu padrão de sensibilidade por meio de mutações e aquisição ou perda de plasmídios de resistência. Assim, por envolverem produtos de expressão gênica, essas características tendem a variar de acordo com fatores ambientais, fases de crescimento e mutações espontâneas (TENOVER et al., 1997).

Técnicas de tipagem genotípicas são baseadas na análise da estrutura genética de um organismo. Estas técnicas estão menos sujeitas a variações naturais, porém podem ser afetadas por inserções ou deleções gênicas (TENOVER et al., 1997). De acordo com Swaminathan & Matar (1993), a habilidade dos sistemas de tipagem molecular em distinguir epidemiologicamente isolados bacterianos é um reflexo da variação genética existente no DNA cromossômico das espécies. Os organismos mais comumente associados com infecções, em geral, são subgrupos de algumas cepas mais virulentas. Por conseqüência, esse subgrupo pode exibir pouca diversidade genética e isso pode dificultar a diferenciação entre as

cepas. Cepas MRSA são um exemplo desse fenômeno, pois muitas dessas cepas isoladas de pacientes são derivadas de relativamente um pequeno número de clones (TENOVER et al., 1997).

Diversas técnicas moleculares têm sido usadas para a tipagem de *S.aureus*. Dentre elas, o *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* (PFGE) e *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) são as mais utilizadas. PFGE é considerado por muitos autores a técnica “padrão ouro”. No entanto, esta técnica requer equipamentos sofisticados, *software* para interpretação e sua padronização inter-laboratórios pode falhar (WELLER, 2000). Outros autores defendem a utilização do RAPD para tipagem molecular de *S. aureus*, relatando boa correlação entre esta técnica e o PFGE, além de ser uma técnica mais rápida, não exigir equipamentos sofisticados e que também produz resultados satisfatórios (VAN BELKUN et al., 1995; OLMOS et al., 1998; DAUTLE et al., 2002; KONDOH et al., 2002).

O RAPD, também referido como *Arbitrarily Primed-Polymerase Chain Reaction* (AP-PCR), é uma variação da técnica da PCR e descrito primeiramente por Williams et al. (1990) e Welsh & McClelland (1990) (*apud* OLIVE & BEAN, 1999). Esta técnica é baseada no uso de *primers* de seqüências curtas, geralmente de 10 bases, e escolhidas aleatoriamente (randomicamente), ou seja, a seqüência alvo não é determinada. Deste modo, a seqüência compreendida entre dois *primers* hibridizados é amplificada arbitrariamente. Em outras palavras, os produtos da PCR terão o tamanho correspondente à distância entre dois *primers*. O número e localização destas seqüências variam em diferentes cepas de uma espécie bacteriana. Após a separação eletroforética dos produtos amplificados, um padrão de bandas (*fingerprint*) é gerado e que, teoricamente, é característico de uma cepa bacteriana em particular. O padrão de bandas gerado pode ser visualizado sob

iluminação ultravioleta após adição de brometo de etídio. Uma única substituição de bases, inserção ou deleção pode alterar o anelamento do *primer*, tendo como consequência padrões de bandas diferentes (POWER, 1996; TENOVER et al., 1997; OLIVE & BEAN, 1999).

Uma das vantagens do RAPD é a pouca quantidade de DNA necessária para sua realização, uma vez que partes deste DNA serão amplificadas por PCR, ao contrário do PFGE onde não há amplificação e grande quantidade e pureza do DNA são exigidas. Este fato é especialmente importante quando se trabalha com bactérias Gram positivas, uma vez que a composição de suas paredes dificulta a extração e purificação do DNA (DAUTLE et al., 2002).

O poder discriminatório da técnica RAPD aplicada a MRSA é menor do que PFGE, entretanto, para avaliações epidemiológicas de pequenos surtos, o RAPD é considerado uma valiosa ferramenta para caracterização inicial das cepas envolvidas no surto. Alguns trabalhos relatam completa correlação entre os resultados do PFGE e RAPD (OLMOS et al., 1998; CETINKAYA et al., 2000; STRANDEN et al., 2003). Com a intenção de aumentar o poder discriminatório pode-se combinar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos (antibiotipagem) com a técnica RAPD (BARTZAVALI-LOUKI et al., 2003).

Diversos *primers* podem ser utilizados na reação do RAPD. A combinação de dois ou mais *primers*, em geral, resulta em um número maior de bandas o que conseqüentemente pode melhorar o poder discriminatório da técnica. Pode-se também combinar os resultados obtidos pela utilização de um único *primer* com os resultados da utilização de combinações de *primers* (FUNG et al., 2001).

3- Objetivos

O presente trabalho tem como objetivo geral estudar as cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de pacientes e trabalhadores do Hospital Universitário “Dr. Domingos Leonardo Cerávolo”, em Presidente Prudente (SP), com a finalidade de conhecer o perfil de resistência desses microrganismos que, desde a inauguração do referido hospital, são responsáveis por grande parte das doenças infecciosas que acometem os pacientes. O estudo visa também conhecer a relação genética existente entre as cepas MRSA isoladas no período de julho a dezembro de 2002, bem como padronizar a técnica PCR Multiplex para identificação e avaliação de resistência de *S. aureus*, com a finalidade de oferecer uma opção mais rápida para diagnóstico laboratorial dessas infecções. Assim, o presente estudo tem como objetivos específicos:

- Avaliar a presença de MRSA nas narinas anteriores e mãos da equipe de trabalhadores do Hospital Universitário “Dr. Domingos Leonardo Cerávolo” da Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE, em Presidente Prudente-SP, no período de julho a dezembro de 2002.
- Comparar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos destas cepas com aquelas isoladas de pacientes que apresentavam infecção por MRSA durante o mesmo período, tentando estabelecer uma correlação inicial entre eles, de acordo com a semelhança de seus perfis de sensibilidade.
- Comparar os resultados da PCR Multiplex para a amplificação de fragmentos correspondentes aos genes de resistência à meticilina/oxacilina e à mupirocina, *mecA* e *ileS-2* respectivamente, ao fenótipo de resistência. Comparar também a amplificação do fragmento correspondente ao gene espécie-específico *femA*,

presente na espécie *S. aureus* independente de sua resistência ou sensibilidade à meticilina/oxacilina, e a identificação feita com provas fenotípicas.

- Comparar e combinar os resultados da tipagem fenotípica dos isolados, por meio da antibiotipagem feita com 12 antimicrobianos, com a tipagem molecular por meio do RAPD, usando os *primers* OPA05, OPA11 e MecA2.
- Determinar, por meio do RAPD combinado à antibiotipagem, uma possível relação genética entre as cepas MRSA isoladas das narinas e mãos da equipe de trabalhadores desse hospital, com os isolados das infecções de pacientes.

4- Material e Métodos

4.1- Amostra populacional

No total, cem (100) trabalhadores hospitalares aceitaram participar voluntariamente deste estudo. Esse grupo foi constituído de 79 auxiliares de enfermagem, 14 enfermeiros, 3 médicos, 2 fisioterapeutas e 2 estudantes do curso de graduação em Enfermagem. Esses indivíduos trabalhavam nos respectivos setores do Hospital Universitário “Dr. Domingos Leonardo Cerávolo” da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE: UTI (25); Clínica Médica (18); Clínica Cirúrgica (16); Pediatria (12); Emergência (11); Ginecologia e Obstetrícia (07); Berçário (06); Moléstias Infecto-Contagiosas (03), e os dois estudantes do curso de graduação em Enfermagem estagiavam na Clínica Médica.

Foram coletadas amostras das mãos e narinas destes trabalhadores. Antes da coleta os voluntários foram comunicados verbalmente e por escrito sobre a pesquisa e seus objetivos. Ao concordarem em participar como voluntários assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo I).

No presente estudo, todos os trabalhadores hospitalares que apresentaram MRSA nas narinas e/ou mãos foram submetidos a uma nova coleta, realizada três meses após a primeira, com a finalidade de observar a persistência no carreamento de cepas MRSA.

No período de estudo, 40 pacientes (21 homens e 19 mulheres) que apresentaram processo infeccioso por *S. aureus* consentiram a participação no presente trabalho. Aos pacientes que apresentaram infecção por MRSA, durante o mesmo período de coleta das amostras na equipe de enfermagem, também foi solicitada uma autorização por escrito, e só foram incluídos no trabalho após

assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. Se o paciente estivesse impossibilitado de assinar ou fosse menor de idade, um responsável assinou o termo. Só foram incluídas no trabalho amostras recebidas rotineiramente no Laboratório de Microbiologia Clínica da Faculdade de Farmácia e Bioquímica da UNOESTE. O paciente ou responsável foi procurado para assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido apenas nos casos em que houve isolamento de *S. aureus* nas amostras clínicas dos mesmos. Deste modo, nenhum procedimento adicional envolvendo o paciente, além do que constava no pedido de exames do médico, foi realizado.

O presente estudo foi devidamente autorizado pela Direção Clínica do referido hospital (Anexo II) e aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE (Anexos III e IV).

4.2- Coleta e manutenção das amostras

As amostras das narinas anteriores foram coletadas pelos próprios trabalhadores hospitalares sob supervisão, após terem recebido instrução para tal. Um *swab* estéril embebido em solução fisiológica estéril foi introduzido em cada narina até que não recebesse mais resistência mecânica, e movimentos rotatórios foram aplicados. Após a retirada, o *swab* foi imediatamente semeado em uma placa de ágar manitol-sal (Britania). Em seguida, com o auxílio de alça bacteriológica, foram feitas estrias a fim de se obter o isolamento das colônias. Tanto a semeadura inicial feita com o próprio *swab*, como as estrias para isolamento foram executadas próximas a uma lâmpada a álcool, para evitar contaminação do meio de cultura. As placas semeadas foram enviadas imediatamente para o Laboratório de Microbiologia

Clínica da Faculdade de Farmácia e Bioquímica da UNOESTE e incubadas a 35-37°C por 18 a 24 horas em aerobiose.

Um outro *swab* embebido em solução fisiológica estéril foi friccionado nas palmas das mãos, dorso, ponta dos dedos e região interdigital do indivíduo. Estas amostras foram semeadas em placas de ágar manitol-sal, estriadas e incubadas como descrito anteriormente.

As cepas de *S. aureus* recuperadas de amostras clínicas de pacientes atendidos no referido hospital e aquelas recuperadas das amostras nasais e das mãos de trabalhadores hospitalares foram repicadas para TSB (*Tryptic Soy Broth* - Difco) e após crescimento em aerobiose (18 horas a 35°C) foram aliqüotadas e mantidas a -20°C.

4.3- Identificação das cepas isoladas

Os isolados constituídos por cocos Gram-positivos foram submetidos ao teste da catalase em lâmina. Os isolados catalase-positiva foram identificados por meio dos testes da coagulase em tubo, fermentação do manitol (Oxoid) e DNase (Oxoid). A diferenciação de *S. aureus* de outras espécies coagulase positivas foi feita pelo teste de produção de ácido a partir de maltose e trealose (KLOOS & BANNERMAN, 1999; KONEMAN et al., 2001).

4.4- Teste de sensibilidade aos antimicrobianos ou antibiotipagem

Cultivos de 18-24 horas foram ensaiados frente a 12 antimicrobianos: tetraciclina (30 µg), gentamicina (10 µg), sulfametoxazol-trimetoprim (23,75/25 µg), penicilina G (10 U), vancomicina (30 µg), oxacilina (1 µg), cloranfenicol (30 µg), eritromicina (15 µg), mupirocina (5 µg), amoxicilina+ácido clavulânico (20/10 µg), clindamicina (2 µg) e ciprofloxacina (5 µg) através do método

de difusão em ágar. O ensaio foi realizado em ágar Mueller-Hinton (Oxoid), preparado de acordo com as especificações do fabricante, com inóculo padronizado de 10^8 organismos/mL, equivalente ao padrão 0,5 da escala de MacFarland, como recomendado pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS M2-A7, 2000). Como controle da técnica da difusão foram utilizadas as cepas de *S. aureus* ATCC 29213 e ATCC 43300.

Os antibiotipos foram definidos de acordo com o resultado da leitura dos halos de inibição de crescimento observado no ágar Muller-Hinton. Assim, a diferença de sensibilidade ou resistência para apenas um antimicrobiano testado foi suficiente para definição de um antibiotipo distinto.

4.5- Confirmação de resistência a oxacilina com *screen agar*

Seguindo as recomendações do NCCLS (M2-A7, 2000), todos os isolados (90) de *S. aureus* foram confirmados quanto a resistência à oxacilina usando-se o *screen agar*. O meio de cultura usado foi o ágar Mueller-Hinton (Oxoid) acrescido de 4% de NaCl e 6µg/mL de oxacilina (Sigma). O inóculo foi preparado da mesma maneira como referido para o teste de sensibilidade aos antimicrobianos. A semeadura foi feita por ponto ou *spot*, técnica que consiste em tocar a superfície do ágar com *swab* estéril previamente mergulhado na suspensão bacteriana (referente à escala 0,5 de MacFarland) em solução fisiológica. Em seguida, as placas foram invertidas e incubadas em estufa bacteriológica (35°C) em aerobiose, por exatamente 24 horas.

Após incubação as placas foram examinadas com lupa, com luz transmitida, visando a observação de crescimento bacteriano. A presença de uma só colônia foi suficiente para confirmar a resistência à oxacilina.

4.6- Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) para Oxacilina

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) para oxacilina foi determinada por meio da técnica da macrodiluição em caldo Muller-Hinton (MH) suplementado com 2% de NaCl. Foram utilizadas diluições seriadas de oxacilina (Sigma), cujas concentrações finais variavam de 0,12 µg/mL a 128 µg/mL. Foi utilizada uma suspensão bacteriana em caldo MH suplementado com NaCl 2% equivalente ao padrão 0,5 da escala de MacFarland (NCCLS M7-A5, 2000). A CIM foi determinada como a menor diluição de oxacilina capaz de inibir o crescimento bacteriano no caldo, evidenciado com a turvação visível do meio líquido após 18-24 horas de incubação a 35°C (ANDREWS, 2001). Foram consideradas cepas MRSA amostras que apresentaram $CIM \geq 4 \mu\text{g/mL}$ para oxacilina, cepas com $CIM < 2 \mu\text{g/mL}$ foram consideradas MSSA (MERLINO et al., 2002).

4.7- Teste de produção de beta-lactamase

A produção de beta-lactamase foi avaliada por meio do teste do Nitrocefin (Glaxo). A técnica consiste em adicionar uma colônia de *S. aureus* a uma lâmina contendo algumas gotas de cefalosporina cromogênica. O resultado positivo é evidenciado pela coloração avermelhada observada em lâmina. A mudança de cor, de amarelo para vermelho, ocorre quando o amido ligado ao anel β -lactâmico da cefalosporina cromogênica é hidrolizado pela β -lactamase (Livermore, 1995).

4.8- PCR Multiplex

A técnica da PCR Multiplex foi realizada com o objetivo de amplificar fragmentos correspondentes aos genes *femA* (espécie-específico), *mecA* (resistência à meticilina/oxacilina) e *ileS-2* (resistência à mupirocina). Os resultados

obtidos pela PCR Multiplex foram comparados aos resultados da identificação fenotípica convencional e também com os resultados da técnica da difusão em ágar para avaliação da sensibilidade à oxacilina e mupirocina.

4.8.1- Extração e quantificação do DNA: A extração do DNA bacteriano foi realizada no Laboratório de Genética Molecular da UNOESTE, utilizando o Kit GFX Genomic Blood® (Amersham Biosciences), que contém uma solução de lise, solução de extração, solução de lavagem e colunas GFX de purificação, além de ter sido feito um pré-tratamento com lisozima. Os componentes e protocolo de extração encontram-se detalhados no Anexo V e VI. A quantificação do DNA bacteriano foi realizada no Laboratório de Bioquímica da UNESP – Campus de Presidente Prudente, através de leitura em espectrofotômetro (Shimadzu UV1601) nos comprimentos de onda 260nm e 280nm, visando a quantificação e avaliação da pureza respectivamente. Para a quantificação, o DNA bacteriano foi diluído 1:100 em tampão TE pH 8,0. A concentração ($\mu\text{g/mL}$) de DNA bacteriano foi determinada aplicando a seguinte fórmula: $[\text{OD}_{260} \times 50 / \text{OD}_{260} \times \text{fator da diluição}]$. Após a leitura nos comprimentos de onda citados, a razão $\text{OD}_{260} / \text{OD}_{280}$ foi calculada. Se esta razão for de aproximadamente 1,8, indica que o DNA apresenta um bom estado de pureza. Todas as amostras de DNA bacteriano utilizadas nesse estudo apresentaram essa característica. Após a quantificação foram preparadas soluções-trabalho de DNA, de maneira que todas as amostras apresentassem concentrações semelhantes.

4.8.2- Primers: Para amplificar a seqüência de nucleotídeos correspondente ao gene *mecA*, foram usados o *primer* MecA1 (5'-GTA GAA ATG ACT GAA CGT CCG ATA A-3') e o *primer* MecA2 (5'-CCA ATT CCA CAT TGT TTC

GGT CTA A-3'), que resultam em um produto da PCR de 310 pb (PÉREZ-ROTH et al., 2001). Para amplificar a seqüência de nucleotídeos pertencentes ao gene *femA* presente somente na espécie *S. aureus*, foram usados os *primers* F1 (217-[5']CTT ACT TAC TGG CTG TAC CTG-237) e F2 (902-[5']ATG TCG CTT GTT ATG TGC-884) que resultam em um fragmento de 686 pb (VANNUFFEL et al., 1995). Para a amplificação da seqüência de nucleotídeos correspondente ao gene *ileS-2*, que codifica resistência a mupirocina foram usados os *primers* MupA (5'-TAT ATT ATG CGA TGG AAG GTT GG-3') e MupB (5'-AAT AAA ATC AGC TGG AAA GTG TTG-3') que resultam em um fragmento de 456 pb (PÉREZ-ROTH et al., 2001).

4.8.3- Reação de amplificação: após a extração e quantificação do DNA, 5 µL da solução-trabalho de DNA (*template*) foram adicionados a 20 µL do *mix* da PCR, de maneira que fosse obtida a concentração final de DNA em torno de 50ng/25µL. O *mix* da PCR consistia de tampão [(Tris-HCl 20 mM; KCl 50 mM (pH 8.4)]; 0.2 mM de cada um dos quatro deoxiribonucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dTTP e dGTP) (Gibco); MgCl₂ 3 mM, 25 pmol dos *primers* MecA1, MecA2, MupA e MupB e 50 pmol dos *primers* F1 e F2 (BEJ et al., 1990), e 1.25 U de *Taq* polimerase (Gibco). Para reduzir a formação de produtos inespecíficos, os tubos somente foram colocados no termociclador quando a temperatura de denaturação foi alcançada (94°C). Todas as amplificações por PCR foram realizadas com o termociclador PTC-100 da MJ Research, no Laboratório de Genética Molecular da UNOESTE. Em adição, todas as amplificações foram feitas com um controle negativo, contendo todos os reagentes, mas sem amostra de DNA bacteriano. Cada reação de

amplificação envolveu uma etapa inicial de denaturação a 94°C por 5 minutos, seguido de 10 ciclos de amplificação (denaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 64°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos), em seguida 25 ciclos de amplificação (denaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 50°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto) e finalizando com uma etapa de extensão a 72°C por 10 minutos. Após a reação de amplificação, 5 µL do produto final foi submetido à eletroforese em gel de agarose 2% a 100 V por 45 minutos. Para estimar o peso molecular dos produtos amplificados foi usado comparativamente um marcador molecular de 100 pb (Gibco). O gel foi corado com brometo de etídio (Gibco), e os produtos da amplificação foram observados usando radiação UV (PÉREZ-ROTH et al., 2001). As imagens foram capturadas com uma câmera CCD acoplada sobre o transiluminador, operada com o programa Chemilmager 4000 (Alpha Innatech 2000). Após a verificação do peso molecular dos produtos amplificados, através do referido *software*, as imagens foram armazenadas como arquivos em computador pessoal na estação de trabalho do referido Laboratório.

4.8.4- Cepas padrão: foram utilizadas as cepas ATCC 43300 (MRSA), ATCC 29213 (*S.aureus* sensível à meticilina e mupirocina) e cepa JJ1 (cepa transconjugante RN8411 contendo plasmídeo pMG1, resistente a mupirocina), fornecida pelo Departamento de Microbiologia Médica do Instituto de Microbiologia Dr. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), como controles positivos da reação da PCR Multiplex.

4.9- Tipagem Molecular (RAPD)

A padronização da técnica RAPD foi realizada utilizando-se diversas concentrações dos *primers*, dNTPs, *Taq* polimerase, cloreto de magnésio e DNA bacteriano. Também foram avaliados três diferentes protocolos de amplificação, com diferentes temperaturas de anelamento e quantidade de ciclos de amplificação.

Todos os *S. aureus* resistentes à metilina/oxacilina, confirmados pela amplificação do fragmento de 310 pb presente no gene *mecA*, foram selecionadas para a tipagem através da técnica do RAPD, com o objetivo de avaliar a relação genética existente entre elas. A técnica foi aplicada individualmente para os isolados de um mesmo paciente (1-2P, 7-10P, 14-15P e 23-24P).

No experimento piloto, foram selecionadas aleatoriamente duas cepas pertencentes ao antibiótipo A e as duas cepas pertencentes ao antibiótipo B, com a finalidade de observar se a utilização dos *primers* OPA5, OPA11 e MecA2 forneceria padrão de bandas suficiente para diferenciar MRSA com perfis de sensibilidade tão distintos. Além disso, para avaliação da capacidade discriminatória da técnica RAPD, foi utilizada uma cepa MRSA resistente apenas aos β -lactâmicos e que foi isolada de um paciente da comunidade. A foto contendo os fragmentos amplificados pela técnica RAPD e o dendrograma gerado, com a inclusão dessa cepa comunitária podem ser observados nos Anexos VII e VIII, respectivamente.

4.9.1- Extração e quantificação do DNA: a extração e quantificação do DNA bacteriano foram feitas como descritos anteriormente no item 4.8.1.

4.9.2- Amplificação: após a extração e quantificação do DNA, 5 μ L desta suspensão (*template*) foram adicionados a 20 μ L do *mix* da PCR (2ng/ μ L),

consistindo de tampão [10 mM Tris-HCl ; KCl 30 mM (pH 8.4)]; 0.4 mM de cada um dos quatro deoxiribonucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dTTP e dGTP) (Gibco); MgCl₂ 3 mM, 50 pmol de cada *primer* e 1.25 U de *Taq* polimerase (Invitrogen). Para cada amostra foi feita uma reação contendo os *primers* OPA05, OPA11 e MecA2 (Invitrogen), descritos adiante. As reações do RAPD também foram realizadas no termociclador PTC-100 da MJ Research, como descrito nos itens anteriores. Todas as amplificações foram feitas com um controle negativo, contendo todos os reagentes, mas sem amostra de DNA bacteriano. Cada reação de amplificação foi composta de uma etapa inicial de denaturação a 94°C por 5 minutos seguida por 50 ciclos consistindo de 1 minuto a 94°C; 2 minutos a 35°C e 2 minutos a 72°C e finalizando com 72°C por 10 minutos. Em seguida foi procedida a eletroforese em gel de agarose 1,5% a 100 V (45 mA) por 1 hora e 30 minutos e coloração com 10 µL de brometo de etídio (10mg/mL) em 300 mL de tampão (KONDOH et al., 2002). Foi utilizado para comparação o marcador de peso molecular de 1kb (Gibco). As imagens foram capturadas, analisadas e armazenadas como descrito anteriormente, no item 4.8.3. Com a finalidade de avaliar a reprodutibilidade, a reação de amplificação foi realizada duas vezes, em dias distintos, para todas as amostras.

4.9.3- Primers: Foram selecionados para a realização da técnica RAPD os *primers* OPA11 (5'-CAA TCG TCC GT-3'); MecA2 (5'- CCA ATT CCA CAT TGT TTC GGT CTA A – 3') e OPA05 (5'-AGG GGT CTT G-3') (Invitrogen), por terem apresentado maior poder discriminatório quando utilizados em conjunto. Para a escolha dos *primers* também foram consideradas experiências bem-sucedidas relatadas por outros pesquisadores (BYUN et al.,

1997; OLMOS et al., 1998; BARTZAVALI-LOUKI et al., 2003). No entanto, o uso combinado destes *primers* não foi relatado na literatura consultada.

4.9.4- Análise dos produtos de amplificação gerados por RAPD das cepas MRSA isoladas: foi realizada no Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara (Universidade Estadual Paulista – UNESP) por meio da geração de dendrograma utilizando o programa GelCompar II (Applied Maths), que utiliza o Coeficiente de Dice de similaridade e UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) de agrupamento. Foi utilizada uma tolerância de 2% na posição das bandas para comparação dos padrões RAPD. Para a análise do RAPD, não foram consideradas diferenças na intensidade das bandas.

5- Resultados

5.1- Frequência de portadores sadios de MSSA, MRSA e BORSA

No total, cem (100) trabalhadores hospitalares aceitaram participar voluntariamente deste estudo. Esse grupo foi constituído por diversos profissionais, como descrito em Material e Métodos (item 4.1). Foram isolados 40 *Staphylococcus aureus* das mãos e/ou narinas de 32 (32%) trabalhadores, sendo que 4 albergavam MRSA, 27 albergavam *Staphylococcus aureus* meticilina-sensível (MSSA) e 1 indivíduo albergava *S. aureus* “borderline” resistente (BORSA) (Figura 1). Os portadores de MRSA pertenciam aos setores UTI (02) e Clínica Médica (02) e as cepas foram isoladas das mãos de um indivíduo e das narinas de 3 outros deles.

Do total de 32 portadores, 22 (68,8%) apresentaram *S. aureus* somente nas narinas; 6 (18,7%) apresentaram somente nas mãos. Em 4 (12,5%) trabalhadores hospitalares foram isolados *S. aureus* simultaneamente nas narinas e mãos. Ao comparar os perfis de sensibilidade destas cepas isoladas das narinas e mãos do mesmo trabalhador hospitalar, constatou-se que, em três destes indivíduos, os perfis de sensibilidade dos *S. aureus* isolados eram diferentes entre si (Tabela 1). Em um destes trabalhadores hospitalares (CRSM) foi isolado MRSA (19E) e, após três meses desse isolamento, nova coleta foi realizada. Entretanto, nessa nova coleta, não foi isolado MRSA. Somente foram isoladas cepas MSSA nas mãos (35E) e narina (36E) desse indivíduo (Tabela 1).

Todas as cepas de *S. aureus* isoladas foram testadas quanto à produção de beta-lactamase por meio do teste do Nitrocefin (Glaxo). Das 40 cepas isoladas das mãos e narinas anteriores de 32 trabalhadores hospitalares, 22 (55%) apresentaram resultado positivo para o teste.

As cepas ainda foram semeadas em *screen agar* para confirmação fenotípica de resistência à oxacilina. Todas as cepas (5) consideradas resistentes à oxacilina pelo método da difusão com disco cresceram no meio contendo oxacilina, e assim, puderam ser consideradas definitivamente como MRSA. Por outro lado, nenhuma amostra considerada sensível pelo primeiro método cresceu neste meio, obtendo assim correspondência de 100% nos resultados comparativos entre os dois métodos.

Entre as 40 cepas isoladas dos 32 trabalhadores hospitalares, 33 (82,5%) apresentaram sensibilidade à oxacilina (MSSA); 5 cepas (12,5%) apresentaram resistência à meticilina/oxacilina (MRSA), sendo que 4 dessas cepas foram isoladas na primeira coleta de amostras e 1 cepa foi isolada em coleta realizada três meses depois. Essa nova coleta de amostras foi realizada em todos os portadores de cepas MRSA, com o objetivo de avaliar a persistência do estado de portador nasal de MRSA. Apenas em um trabalhador hospitalar foram isoladas cepas MRSA (6E e 34E) nas duas coletas realizadas. A similaridade genética entre essas cepas foi de 93%.

Somente duas cepas (5%) foram consideradas BORSA por terem apresentado resultado positivo para o teste Nitrocefim, sensibilidade para Amoxicilina + Ácido Clavulânico (halo > 20mm) e sensibilidade intermediária à oxacilina (halo entre 11 – 12 mm), além de apresentar CIM de oxacilina de 2 µg/mL.

Com exceção de vancomicina e mupirocina, aos quais, todas as cepas apresentaram sensibilidade, os antimicrobianos que apresentaram maior poder inibitório foram oxacilina, amoxicilina + ácido clavulânico e cloranfenicol. O percentual de cepas resistentes aos diferentes antimicrobianos utilizados no teste de sensibilidade pode ser observado na Figura 2.

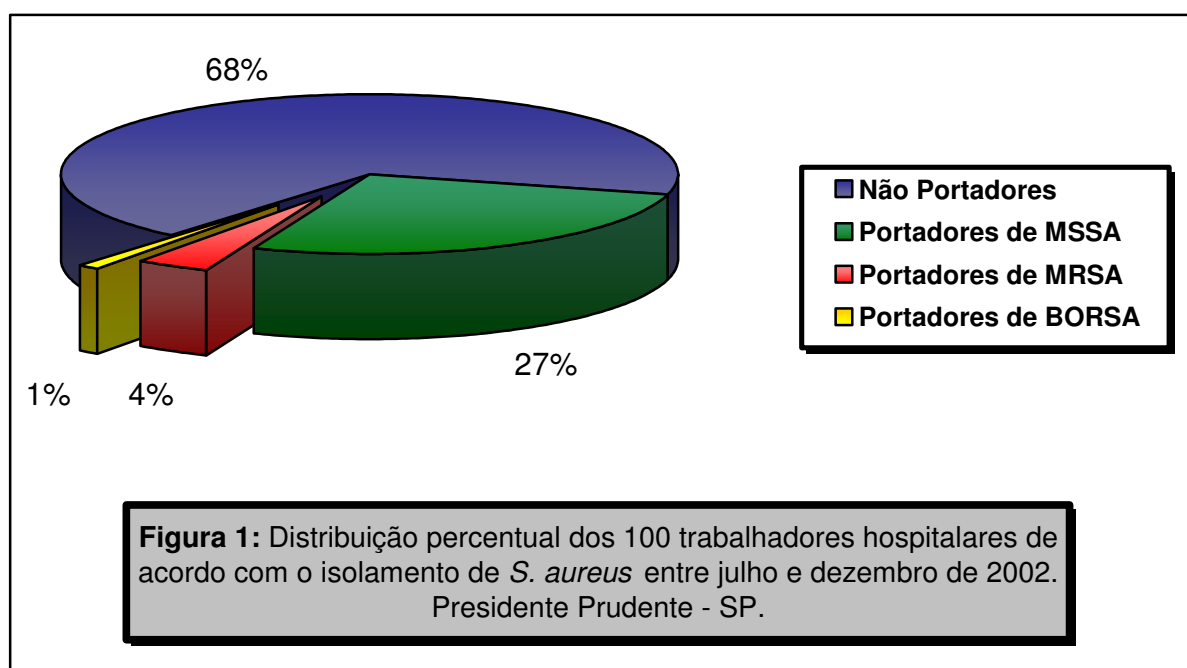


Tabela 1: Perfis de sensibilidade das amostras de *S. aureus* isoladas de indivíduos com colonização concomitante das mãos e narinas. Presidente Prudente – SP, julho a dezembro de 2002.

Portador	Nº da Cepa	Amostra Coletada	Resistência*
JGC	09E	Narina	PEN
	10E	Mão	PEN
EAS	23E	Mão	PEN, SUT
	25E	Narina	PEN
MPSR	28E	Mão	PEN, SUT, CIP, CLI, ERI
	29E	Narina	PEN, CLI, ERI
CRSM	19E	Narina	PEN,CLO,CIP,CLI,AMC,ERI,GEN,OXA,SUT,TET
	35E	Mão	PEN,CIP,CLI,ERI,GEN,SUT,TET
	36E	Narina	PEN,CIP,CLI,ERI,GEN,SUT,TET

*AMC (Amoxicilina + Ácido Clavulânico); CLO (Cloranfenicol); CIP (Ciprofloxacina); CLI (Clindamicina); ERI (Eritromicina); GEN (Gentamicina); OXA (Oxacilina); PEN (Penicilina); SUT (Sulfametoxazol + Trimetoprim); TET (Tetraciclina).

5.2- Frequência de MRSA, MSSA e BORSA nos pacientes hospitalizados.

No período estudado, 40 pacientes que apresentaram processos infecciosos por *S. aureus*, consentiram a participação no presente estudo. Em 32 destes pacientes foi coletada apenas uma amostra biológica; de 6 pacientes foram coletadas 2 amostras biológicas diferentes e em 2 pacientes foram realizadas 3 coletas de amostras diferentes. De cada uma dessas amostras biológicas foi isolado um *S. aureus*.

Em quatro, dos oito pacientes com mais de uma amostra biológica coletada, foram isolados dez *S. aureus* com perfis de sensibilidade diferentes entre si e, portanto, foram consideradas cepas distintas. Nos outros quatro pacientes, foram isolados oito *S. aureus* resistentes à meticilina/oxacilina (dois de cada paciente) com perfis de sensibilidade idênticos. Assim, por se tratar de um estudo epidemiológico, os *S. aureus* isolados de um mesmo paciente e apresentando o mesmo perfil de sensibilidade foram considerados como uma única cepa. Essas cepas foram aqui referidas por dois números seguidos da letra "P". Assim, do paciente MIO foi isolada a cepa 1-2P; do paciente ERS foi isoladas a cepa 7-10P; do paciente WBS foi isolada a cepa 14-15P e do paciente ARB foi isolada a cepa 23-24P. Portanto, o total de cepas isoladas de pacientes, no presente estudo, foi de 46.

O percentual de cepas resistentes a cada antimicrobiano utilizado na técnica da difusão em ágar pode ser observado na Figura 2. Do total de 46 cepas de *S. aureus*, 25 (54,3%) apresentaram resistência à meticilina/oxacilina (MRSA) e 20 (43,5%) foram consideradas MSSA. Apenas uma cepa (2,2%) foi considerada BORSA, de acordo com os critérios já mencionados anteriormente (Figura 3). As cepas MRSA foram isoladas de diversas amostras clínicas, com predomínio de ponta de cateter e sangue (Figura 4).

Todas as 46 cepas foram testadas quanto à produção de beta-lactamase, 38 (83%) eram produtoras e 8 (17%) não-produtoras da enzima. Entre as 38 cepas que apresentaram resultado positivo para o teste do Nitrocefin, estão incluídas todas as 25 cepas MRSA e a única cepa BORSA isolada de um paciente.

Assim como observado nas cepas isoladas de trabalhadores hospitalares, os resultados do crescimento em ágar contendo oxacilina tiveram 100% de correspondência com os resultados do método da difusão, ou seja, as 25 cepas MRSA cresceram no *screen agar*. Por outro lado, não houve crescimento de nenhuma das 20 cepas MSSA no *screen agar*, assim como não foi observado crescimento quando este ágar foi semeado com a única cepa BORSA isolada de pacientes.

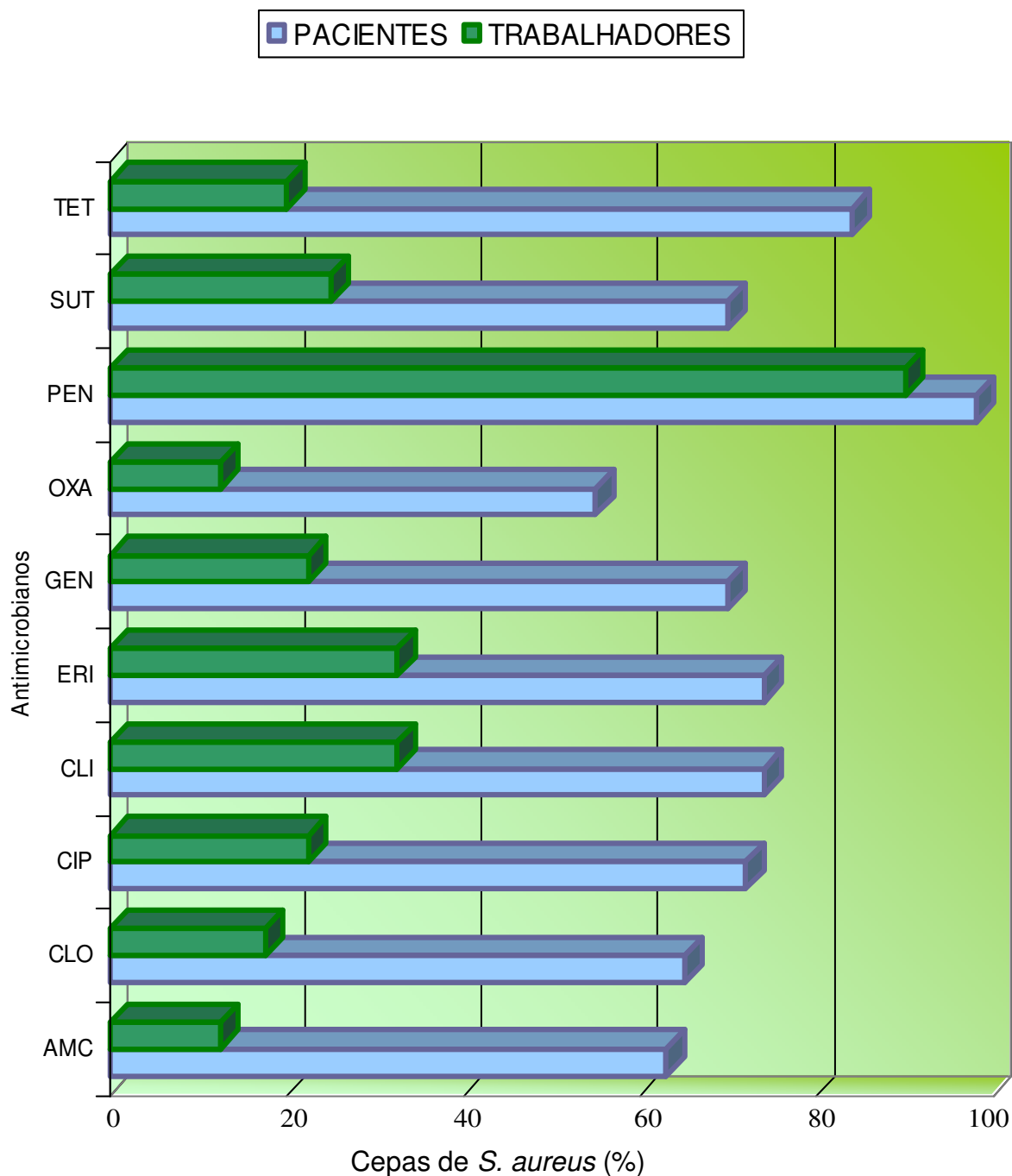
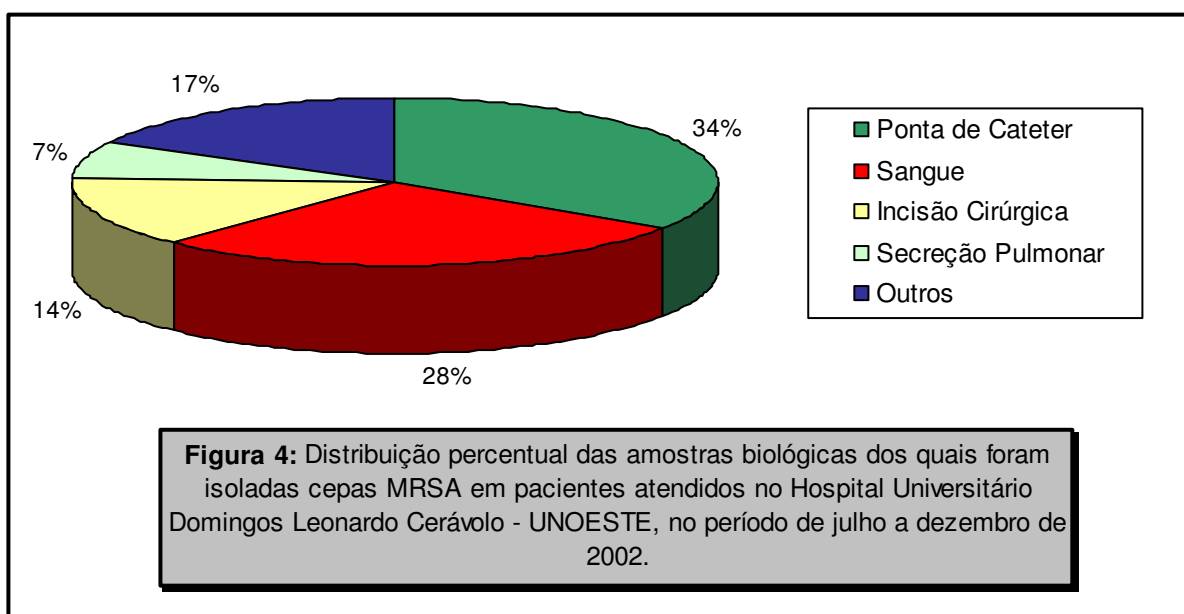
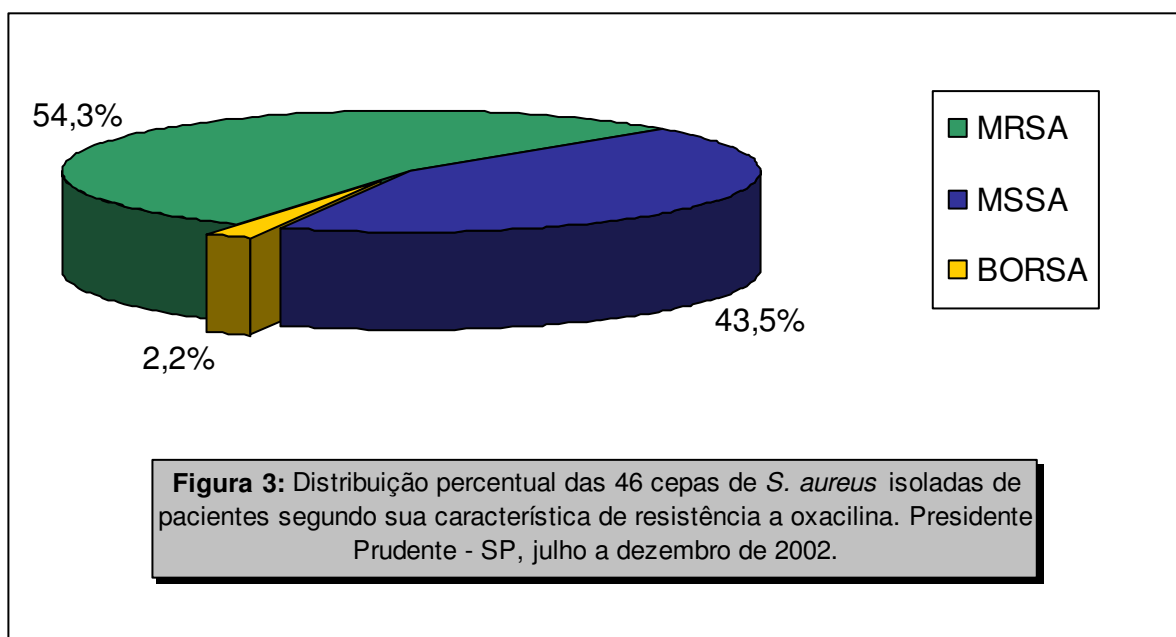


Figura 2: Percentual de cepas de *S. aureus* isoladas de trabalhadores hospitalares (40) e pacientes (46) que apresentaram resistência aos diferentes antimicrobianos utilizados no método da difusão em ágar. Presidente Prudente - SP, julho a dezembro de 2002.



5.3- Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) para oxacilina

A CIM de oxacilina foi determinada para as 86 cepas, 40 isoladas de trabalhadores hospitalares e 46 cepas isoladas de pacientes que apresentaram processo infeccioso.

As 40 cepas isoladas dos trabalhadores hospitalares puderam ser divididas de acordo com a Concentração Inibitória Mínima (CIM) de oxacilina. Assim, 70% (28) apresentaram CIM de 0,12 µg/mL; 7,5% (3) CIM de 0,25 µg/mL; 5% (2) CIM de 0,5 µg/mL; 5% (2) CIM de 2 µg/mL (cepas BORSA); 2,5% (1) apresentou CIM 32 µg/mL e 10% (4) apresentaram CIM de 64 µg/mL. Estes dois últimos grupos são constituídos pelas cepas MRSA isoladas dos trabalhadores hospitalares.

As Concentrações Inibitórias Mínimas de oxacilina para as 46 cepas isoladas de pacientes foram assim distribuídas: 11% (5) apresentaram CIM de 0,12 µg/mL; 4% (2) CIM de 0,25 µg/mL; 17% (8) CIM de 0,5 µg/mL; 11% (5) CIM de 1 µg/mL; 2% (1) CIM de 2 µg/mL (cepa BORSA); 2% (1) CIM de 32 µg/mL; 40% (18) CIM de 64 µg/mL e 13% (6) apresentaram CIM de oxacilina de 128 µg/mL.

5.4- Antibiotipagem

O perfil de sensibilidade aos antimicrobianos foi utilizado como triagem inicial para posterior tipagem genotípica. Para a antibiotipagem foram excluídos os resultados dos antimicrobianos amoxicilina+ácido clavulânico, penicilina, oxacilina, vancomicina e mupirocina uma vez que todas as cepas apresentaram resultados idênticos (resistência para os 3 primeiros e sensibilidade para os 2 últimos). Deste modo, as 30 cepas consideradas MRSA (5 isoladas de trabalhadores e 25 de pacientes), confirmadas pelo crescimento em *screen agar*,

puderam ser agrupadas em 4 antibiótipos designados pelas letras maiúsculas A, B, C e D, sendo que o antibiótipo A foi o mais freqüentemente encontrado (Tabela 2).

Foi possível observar a predominância de cada antibiótipo de acordo com o setor hospitalar ao qual o portador ou paciente de onde foi isolada a cepa pertencia. Assim, os antibiótipos das amostras isoladas dos trabalhadores hospitalares apresentaram semelhanças com os antibiótipos encontrados nos pacientes atendidos nos setores aos quais pertenciam estes trabalhadores, podendo sugerir um elo epidemiológico entre estas cepas. Os dados referentes à distribuição de cada antibiótipo nos diferentes setores do hospital podem ser observados na Tabela 3.

Tabela 2: Freqüência dos antibiótipos encontrados entre as 30 amostras de MRSA. Presidente Prudente – SP, julho a dezembro de 2002.

Antibiótipo	Perfil de Sensibilidade*							Nº de Cepas (%)
	CLO	CIP	CLI	ERI	GEN	SUT	TET	
A	R	R	R	R	R	R	R	26 (87%)
B	S	S	S	S	S	S	S	2 (7%)
C	S	R	R	R	R	S	R	1 (3%)
D	R	R	R	R	R	R	S	1 (3%)

*CLO (Cloranfenicol); CIP (Ciprofloxacina); CLI (Clindamicina); ERI (Eritromicina); GEN (Gentamicina); SUT (Sulfametoxazol + Trimetoprim); TET (Tetraciclina).

Tabela 3: Distribuição de cada antibiótipo de MRSA isolados de pacientes e trabalhadores hospitalares de acordo com o setor hospitalar. Presidente Prudente – SP. Julho a dezembro de 2002.

Antibiótipo	Trabalhadores		Pacientes					Total
	UTI	CM	UTI	CM	CC	MI	HEM	
A	02	01	09	06	06	01	01	26
B	-	01	01	-	-	-	-	02
C	-	-	01	-	-	-	-	01
D	01	-	-	-	-	-	-	01
Total	03	02	11	06	06	01	01	30

*UTI (Unidade de Terapia Intensiva); CM (Clínica Médica); CC (Clínica Cirúrgica); MI (Moléstias Infecto-contagiosas); HEM (Hemodiálise).

5.5- PCR Multiplex

A padronização da técnica PCR Multiplex foi feita utilizando as cepas-padrão citadas no item 4.8.4 de Material e Métodos.

Na Figura 5 podem ser observados os fragmentos amplificados correspondentes aos genes *femA*, *mecA* e *ileS-2*. Na canaleta 1 observa-se um fragmento de 686 pb correspondente ao gene *femA*, espécie-específico. Nas canaletas 2 e 3 pode-se observar, respectivamente, o fragmento de 310 pb correspondente ao gene *mecA* e o fragmento amplificado de 456 pb correspondente ao gene *ileS-2*, além do fragmento de 686 pb.

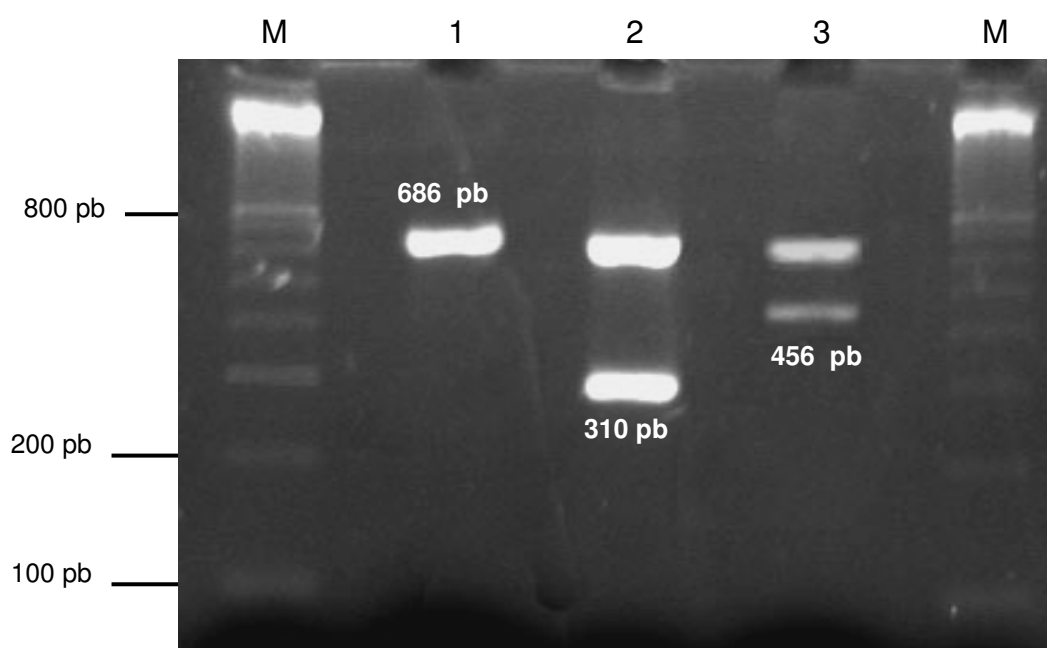


Figura 5: Cepas utilizadas para padronização da técnica da PCR Multiplex. Marcador de peso molecular de 100 pb (M); ATCC 29213 (1); ATCC 43300 (2) e JJ1 (3)

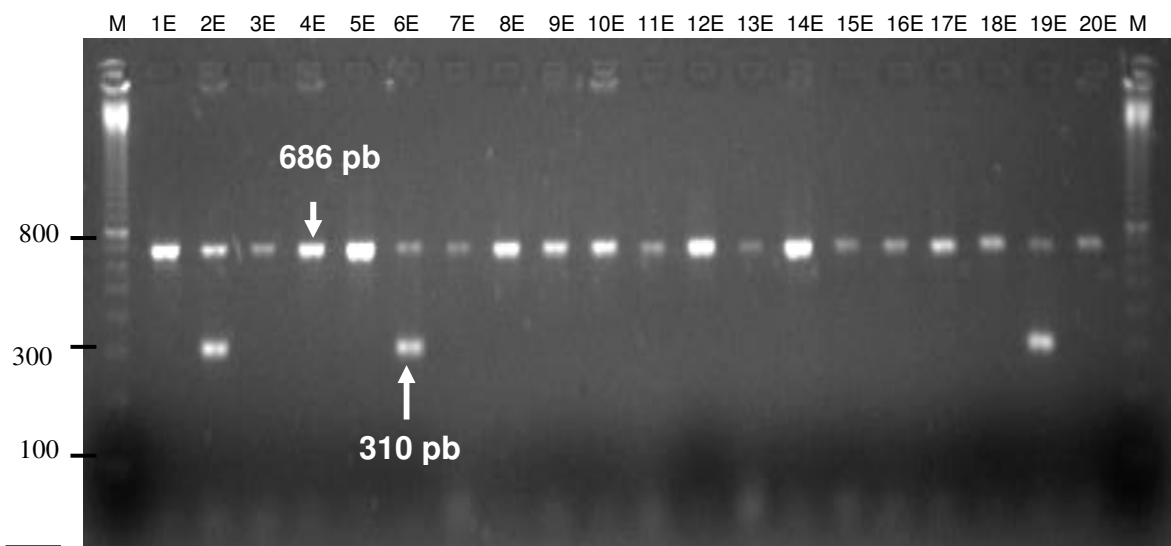
A detecção molecular dos marcadores para os genes *femA*, *mecA* e *ileS-2* através de PCR Multiplex foi realizada para todos os 86 *S. aureus*, sendo 40 isolados de trabalhadores hospitalares e 46 isolados de pacientes. Os *S. aureus* isolados de amostras biológicas de um mesmo paciente e que foram considerados como uma única cepa (1-2P; 7-10P; 14-15P e 23-24P), foram avaliadas individualmente nesta técnica. Assim, as cepas isoladas de pacientes totalizam 50 amostras.

Os resultados da identificação fenotípica por meio dos testes convencionais descritos anteriormente foram totalmente compatíveis com os resultados da amplificação do fragmento de 686 pb do gene *femA* espécie-específico. Todas as amostras apresentaram sensibilidade à mupirocina pelo teste da difusão em ágar com discos do antibiótico, o que foi confirmado pela ausência de amplificação do fragmento de 456 pb do gene *ileS-2*. As 30 cepas MRSA, confirmadas fenotipicamente pelo crescimento em *screen agar*, apresentaram amplificação do fragmento de 310 pb do gene *mecA*. Por outro lado, as cepas que apresentaram sensibilidade no teste da difusão e confirmadas pela ausência de crescimento em *screen agar* não apresentaram amplificação desse fragmento, assim como as cepas BORSA.

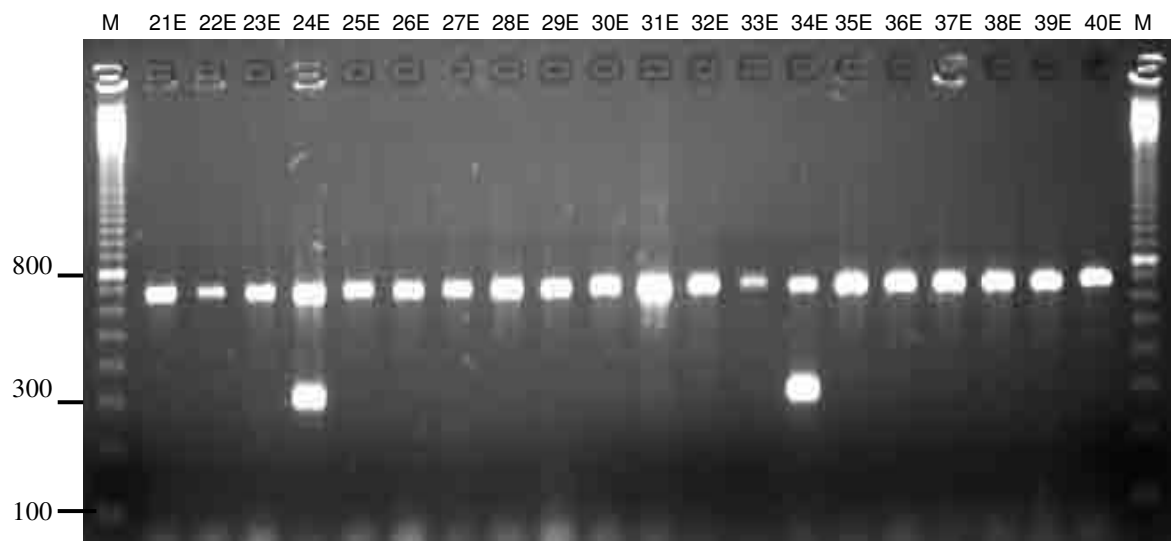
Os resultados da PCR Multiplex de todas as cepas de *S. aureus* isoladas de trabalhadores hospitalares são mostrados nas Figuras 6 e 7, onde se pode observar a amplificação do fragmento de 686 pb, correspondente ao gene *femA*, em todas as cepas analisadas. A amplificação do fragmento de 310 pb correspondente ao gene *mecA* que codifica resistência à meticilina/oxacilina pode ser observada em apenas 5 cepas isoladas de trabalhadores hospitalares (2E, 6E, 19E, 24E e 34E).

Nas Figuras 8, 9 e 10 podem ser observados os fragmentos de 686 pb em todas as cepas isoladas de pacientes e também a amplificação do fragmento de 310 pb em grande parte dessas cepas.

De acordo com o estatístico consultado, Prof. Dr. Sérgio do Nascimento Kronka da Universidade Estadual Paulista – UNESP campus de Jaboticabal, devido ao fato dos resultados terem sido exatamente iguais para os métodos utilizados na identificação e avaliação de resistência à metilicina/oxacilina, um teste χ^2 mostraria não significância e, portanto, não se comprovaria diferença estatística entre esses métodos.

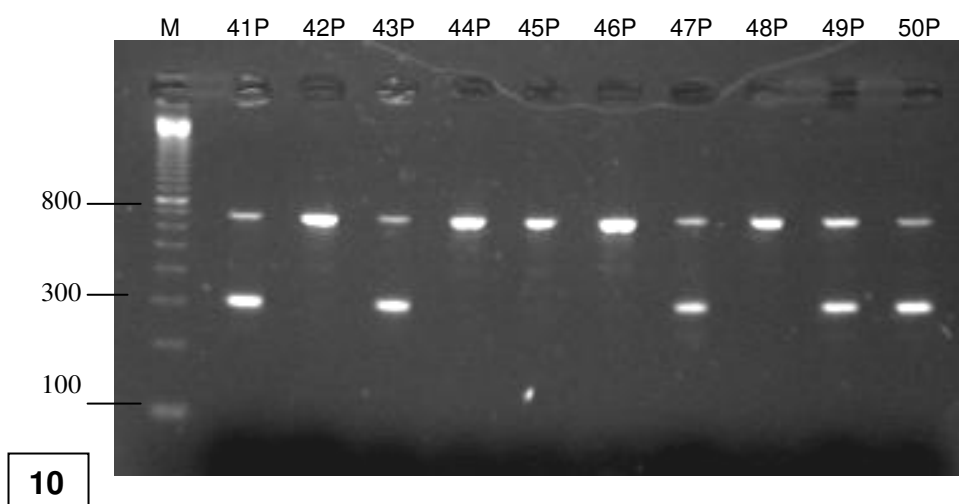
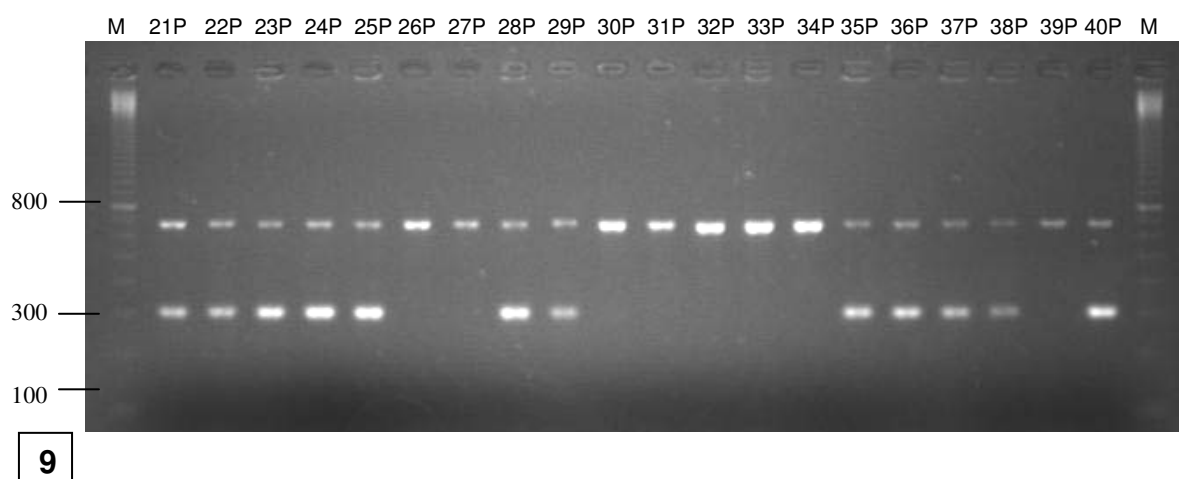
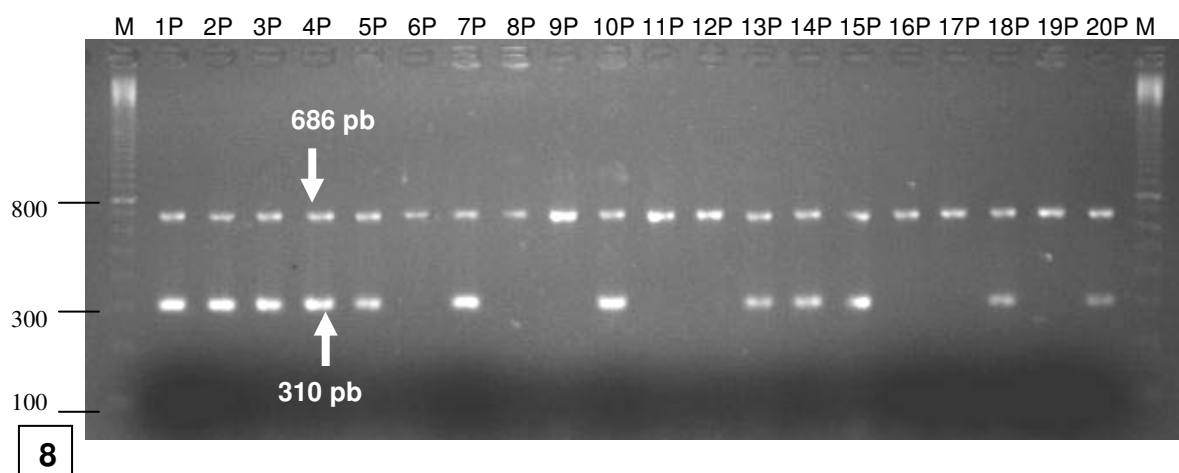


6



7

Figuras 6 e 7: PCR Multiplex para os genes *femA* (686 pb), *mecA* (310 pb) e *ileS-2* (456 pb) de cepas de *S. aureus* isoladas de trabalhadores hospitalares. M: Marcador de peso molecular de 100 pb.



Figuras 8, 9 e 10: PCR Multiplex para os genes *femA* (686 pb), *mecA* (310 pb) e *ileS-2* (456 pb) de cepas de *S. aureus* isoladas de pacientes. M: Marcador de peso molecular de 100 pb.

5.6- Tipagem molecular (RAPD)

O método RAPD foi realizado para todas as cepas MRSA (5 isoladas de trabalhadores hospitalares e 25 de pacientes) utilizando os *primers* OPA05, OPA11 e MecA2, descritos em Material e Métodos, incluindo as cepas isoladas de um mesmo paciente (1-2P; 7-10P; 14-15P e 23-24P), que foram avaliadas individualmente. A utilização desses 3 *primers* em uma mesma reação de PCR produziu de 4 a 16 fragmentos com pesos moleculares que variaram de 760 a mais de 3054 pb (Figura 11).

O dendrograma foi construído por meio do programa GelCompar II que utiliza o coeficiente de Dice de similaridade e UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) de agrupamento (Figura 12). Diferenças na intensidade das bandas não foram consideradas.

Por meio do RAPD, as 30 cepas MRSA puderam ser agrupadas em 8 grupos designados por algarismos romanos (I-VIII). Os grupos genotípicos I e IV abrangeram o maior número de cepas, 09 (30%) e 13 (43%) respectivamente. Todas as 09 cepas pertencentes ao grupo I apresentaram o mesmo antibiograma (A). Entre as cepas incluídas no grupo IV, 12 apresentaram o antibiograma A e apenas uma cepa (21P) apresentou antibiograma C (sensibilidade ao sulfametoxazol + trimetoprim e cloranfenicol). A similaridade genética entre esses dois grupos genotípicos foi de 90%, sugerindo uma forte relação genética entre eles.

O grupo genotípico V, composto por três cepas (2E, 6E e 3P), apresentou 93% de similaridade genética com o grupo IV e, assim, apresentou também cerca de 90% de similaridade com o grupo I.

Os grupos II, III, VI, VII e VIII incluem apenas uma cepa cada. Os grupos genotípicos II e III apresentaram cerca de 93% de similaridade genética com

as cepas pertencentes ao grupo genotípico I e, com os grupo genotípicos IV e V a similaridade genética foi de cerca de 90%. Assim, das 30 cepas analisadas, 27 (90%) que compõem os grupos genotípicos I, II, III, IV e V apresentaram 90% ou mais de similaridade genética entre si.

A cepa 36P (grupo genotípico VI) apresentou pouco mais de 80% de similaridade genética com os grupos citados anteriormente, podendo representar uma moderada similaridade genética.

As cepas 28P (grupo genotípico VII) e 24E (grupo genotípico VIII) apresentaram o perfil de sensibilidade mais amplo entre as cepas MRSA estudadas, ou seja, resistência somente aos β -lactâmicos (antibiotipo B). A similaridade genética entre esses dois grupos e os demais foi de 50% e 40% respectivamente, revelando maior distância genética entre as cepas analisadas nesse estudo.

As cepas 6E e 34E foram isoladas do mesmo trabalhador hospitalar, em coletas realizadas com um intervalo de tempo de três meses. Essas cepas fazem parte dos grupos genotípicos V e IV, respectivamente. Esses dois grupos apresentam 93% de similaridade entre si e foram considerados grupos geneticamente relacionados.

A combinação dos resultados obtidos pela genotipagem com os resultados da antibiotipagem pode ajudar na diferenciação de subgrupos. Dessa forma, o grupo genotípico IV, contendo 13 cepas, poderia ser dividido em dois subgrupos: IV-A, para as 12 cepas que apresentaram antibiotipo A e subgrupo IV-C para uma cepa que apresentou antibiotipo C. Por esse mesmo critério, o grupo V (composto por três cepas) poderia ser dividido em dois subgrupos: V-A (2 cepas) e V-D (1 cepa).

Os dados referentes aos grupos genotípicos definidos pelo RAPD, antibiograma, CIM de oxacilina, unidade ou setor hospitalar e tipo de amostra biológica referentes às 30 cepas MRSA podem ser observados na Tabela 4.

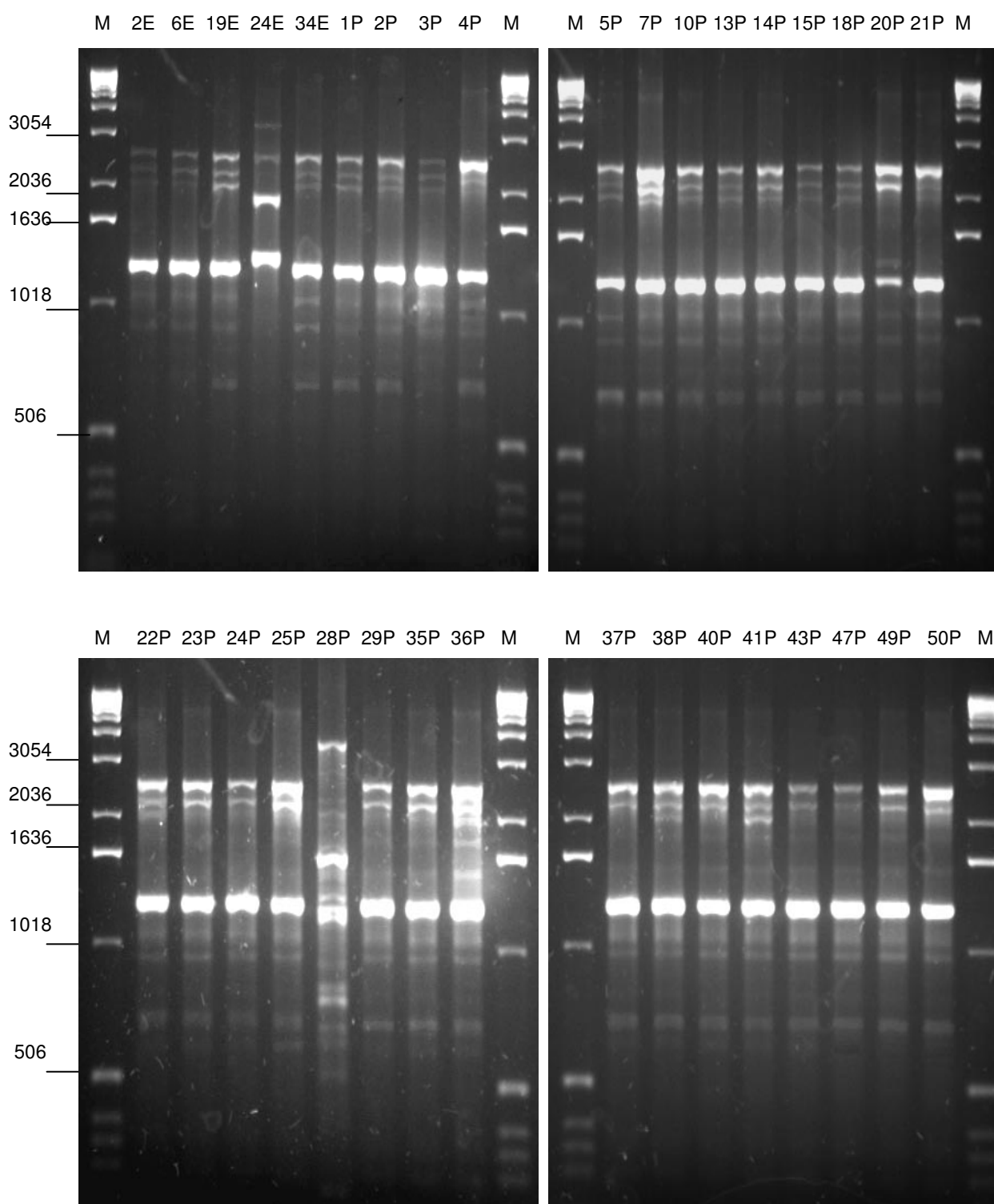


Figura 11: Fragmentos gerados pela técnica RAPD utilizando os *primers* OPA05, OPA11 e MecA2 em DNA cromossômico de amostras MRSA isoladas de portadores sadios (nº E) e pacientes (nºP); M: Marcador de peso molecular de 1Kb.

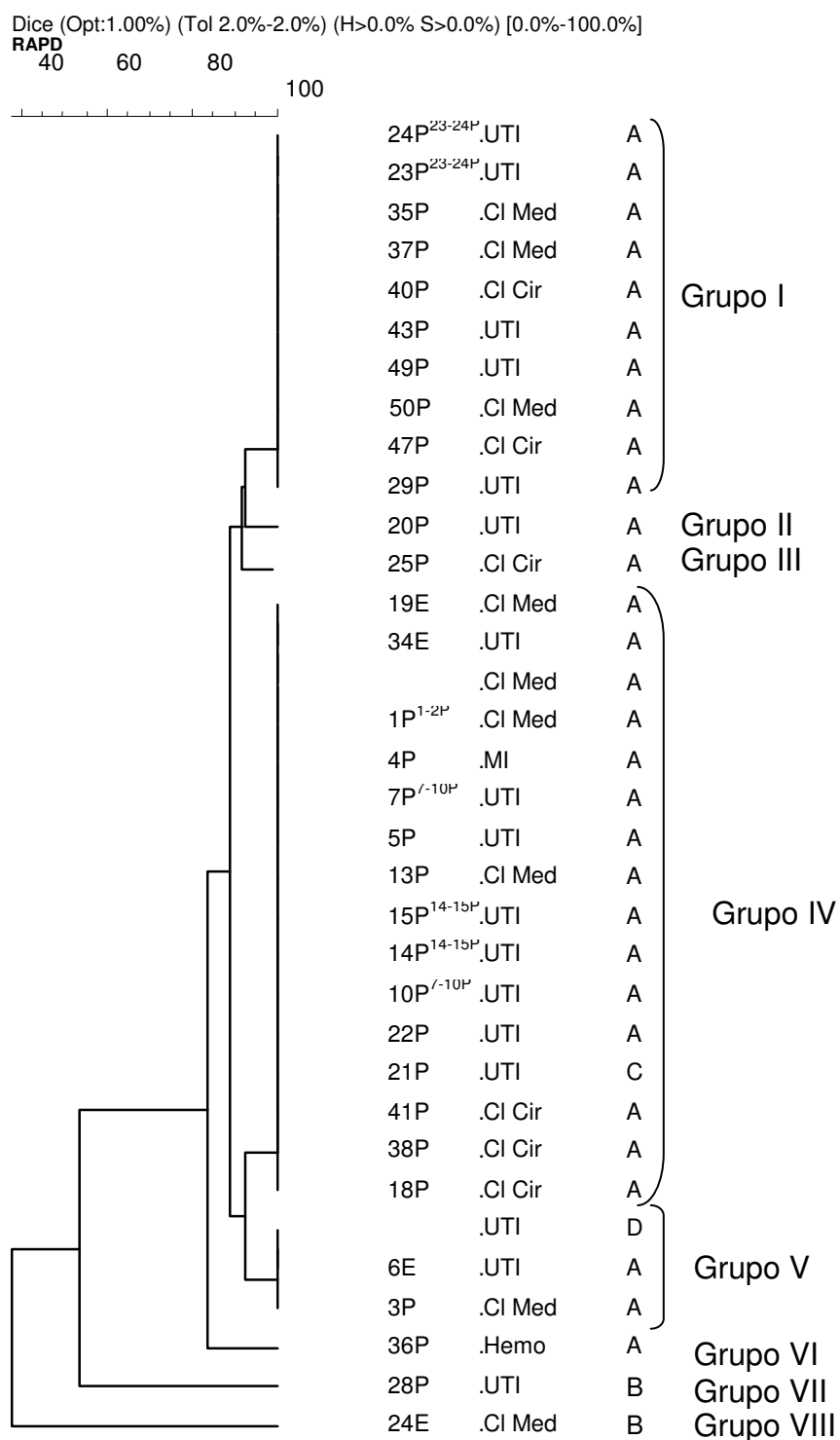


Figura 12: Dendrograma construído com base no coeficiente de similaridade de Dice ilustrando a relação das cepas MRSA isoladas de trabalhadores hospitalares (nºE) e pacientes hospitalizados (nºP) no período de julho a dezembro de 2002.

Tabela 4: Dados referentes às 30 cepas MRSA isoladas de portadores e pacientes utilizadas em estudo epidemiológico no período de julho a dezembro de 2002. Hospital Universitário “Dr. Domingos Leonardo Cerávolo”, Presidente Prudente (SP).

Padrão RAPD	Nº da Cepa	Antibiótipo	CIM de oxacilina (µg/mL)	Unidade Hospitalar	Iniciais	Amostra Biológica**	Data da Coleta
I	23-24P*	A	64	UTI	ARB	P-PC	17/09-20/09
	35P	A	64	CL. MÉD.	LGP	PC	19/10
	37P	A	128	CL. MÉD.	JRM	SG	27/10
	40P	A	64	CL. CIR.	ABM	PC	07/11
	43P	A	64	UTI	JRO	IC	23/11
	49P	A	64	UTI	RCS	LA	10/12
	50P	A	128	CL. MÉD.	JBM	PC	22/12
	47P	A	64	CL. CIR.	MEL	IC	02/12
	29P	A	128	UTI	WLA	PC	01/10
II	20P	A	128	UTI	JPS	IC	13/09
III	25P	A	128	C. CIR.	EE	IC	20/09
IV	19E	A	64	CL. MÉD.	CRSM	FN	11/09
	34E'	A	64	UTI	EAB	FN	04/11
	1-2P*	A	64	CL. MÉD.	MIO	PC-SG	04/07-04/07
	4P	A	64	MI	VCP	SG	18/07
	7-10P*	A	64	UTI	ERS	PD-SG	06/08-09/08
	5P	A	64	UTI	RCS	SO	21/07
	13P	A	64	CL. MÉD.	AR	SG	09/07
	14-15P*	A	64	UTI	WBS	PC-SG	24/08-25/08
	22P	A	64	UTI	VA	P	16/09
	21P	C	64	UTI	JFC	PC	13/09
	41P	A	64	CL. CIR.	EPSM	PC	07/11
	38P	A	64	CL. CIR.	HGP	PC	01/11
	18P	A	64	CL. CIR.	JRCJ	A	08/09
V	2E	D	64	UTI	TWN	FN	05/08
	6E'	A	64	UTI	EAB	FN	05/08
	3P	A	64	CL. MÉD.	FMM	PC	09/07
VI	36P	A	128	HEM.	AGM	SG	22/10
VII	28P	B	32	UTI	DOF	SG	01/10
VIII	24E	B	32	CL. MÉD.	JCP	M	16/10

'Mesmo trabalhador hospitalar. *Amostras diferentes do mesmo paciente. **FN (Fossas Nasais); IC (Incisão Cirúrgica); LA (Líquido Ascítico); M (Mão); PC (Ponta de Cateter); PD (Ponta de Dreno); A (Amostra Abdominal); SG (Sangue); SO (Secreção Ocular); P (Amostra Pulmonar).

6- Discussão

A metilina foi introduzida em 1959 para tratar doenças infecciosas causadas por *S. aureus* resistentes à penicilina G. O primeiro isolamento de uma cepa resistente à metilina foi relatado no Reino Unido em 1961 por Jevons, em seguida foram relatados isolamentos de MRSA em outros países da Europa, Japão, Austrália e Estados Unidos (*apud* ENRIGHT et al., 2002). Hoje, infecções provocadas por MRSA ocorrem em hospitais de todo o mundo e têm ocorrido também na comunidade. Cepas MRSA se adaptaram bem à pressão seletiva exercida pelo uso de antimicrobianos. Assim, cepas MRSA geralmente apresentam múltipla resistência e podem apresentar sensibilidade somente aos glicopeptídeos (HIRAMATSU et al., 2001).

O Hospital Universitário “Dr. Domingos Leonardo Cerávolo” da Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE, em Presidente Prudente (SP), está em funcionamento desde 1997. No entanto, nenhum estudo foi realizado visando conhecer melhor os principais agentes de processos infecciosos, sua epidemiologia e perfis de sensibilidade aos antimicrobianos. Os dados referentes às infecções por MRSA somente agora, com o desenvolvimento do presente trabalho, começam a ser estudados.

De acordo com Rodrigues (1997), é recomendável que cada instituição tenha seu mapa de agentes etiológicos, bem como o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos. Segundo o mesmo autor, esse conhecimento tem fundamental importância para orientação na terapêutica assistencial, tornando menos empírica possível a utilização de antibióticos de amplo espectro em situações

emergenciais. Contribuindo, desse modo, para a redução da pressão seletiva exercida sobre os microrganismos.

Desde o primeiro ano de funcionamento, a frequência de cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina no Hospital Universitário pesquisado nesse trabalho, passou de 40,5% para 60,3% em 2002*. No período de julho a dezembro de 2002, 54,3% das cepas de *S. aureus* isoladas de pacientes atendidos nessa Instituição de Saúde apresentaram resistência à meticilina. Tavares (2000), em artigo de revisão, relata que 30 a 100% dos *S. aureus* isolados em diferentes regiões do Brasil são resistentes à meticilina. Teixeira et al. (1995), encontraram uma média de 56% de cepas resistentes à meticilina em estudo abrangendo hospitais de várias regiões do Brasil.

A incidência de MRSA pode variar entre diferentes hospitais, no entanto, é certo que na maioria dessas instituições a prevalência aumentou gradativamente. Em estudo realizado entre 1990 e 1997 foi observado um aumento de 260% na incidência de MRSA em diversos hospitais participantes de um programa de monitoramento (BARLETT et al., 2000 *apud* GRAFFUNDER & VENEZIA, 2002). O conhecimento dos fatores que podem contribuir para o desenvolvimento de processos infecciosos por MRSA é objeto de estudo em diversos centros de pesquisa. Graffunder & Venezia (2002), destacaram como principais fatores para o desenvolvimento dessas infecções a hospitalização prévia; internações prolongadas; cirurgia; nutrição parenteral e o uso de quinolonas, em especial levofloxacina.

Cepas MRSA, em geral, são introduzidas em um hospital por meio de um paciente colonizado ou um indivíduo da equipe de trabalhadores hospitalares (MULLIGAN et al., 1993). As narinas anteriores são o principal reservatório de *S.*

aureus e a transmissão ocorre principalmente através de contato direto e também por equipamentos e utensílios contaminados, uma vez que, essa bactéria possui boa resistência às condições ambientais. Dessa forma, uma vez introduzida e disseminada em um hospital, dificilmente é erradicada desse ambiente (DIAS et al., 1997). Wagenvoort et al. (2000) encontraram cepas MRSA em 26% dos teclados de computadores e 15% das torneiras dentro de uma UTI, demonstrando ampla contaminação ambiental.

No Hospital Universitário, ora estudado, 68% dos trabalhadores hospitalares não carregavam *S. aureus*. Por outro lado, 27% carregavam *S. aureus* sensível à meticilina (MSSA); 4% carregavam MRSA e 1% carregava BORSA. Do total de 32% de trabalhadores hospitalares portadores de *S. aureus*, em 12,5% dos portadores foram isolados *S. aureus* das mãos e narinas, sendo que, em três desses indivíduos os microrganismos isolados apresentaram sensibilidade à meticilina (MSSA) e em um trabalhador os isolados foram identificados como BORSA.

Segundo Kluytmans et al. (1997), a taxa de colonização da equipe hospitalar por *S. aureus* pode variar de 16 a 56%. Assim, a taxa de portadores encontrada no Hospital Universitário (32%), encontra-se próxima da média encontrada por esses autores. Por outro lado, Mulligan et al. (1993) relataram que a taxa de colonização por MRSA possui um intervalo maior, entre 2 e 56%. No presente estudo, a taxa de 4% de colonização da equipe hospitalar por MRSA encontra-se próxima ao limite mínimo citado por esse autor.

As cepas 6E e 34E foram isoladas do mesmo trabalhador hospitalar com um intervalo de três meses entre as coletas das amostras. O perfil de sensibilidade aos antimicrobianos das duas cepas é idêntico (antibiotipo A). No entanto, através da análise do padrão de bandas gerados pela técnica RAPD, as

duas cepas não estão incluídas no mesmo grupo genotípico. A cepa 6E faz parte do grupo genotípico V, e a cepa 34E pertence ao grupo genotípico predominante (grupo IV). Entretanto, a similaridade genética entre esses dois grupos genotípicos foi de 93%, demonstrando grande relação genética.

Nesse estudo, apenas os portadores de cepas MRSA foram submetidos a uma nova coleta de amostra, diferentemente de outros autores que determinaram a persistência do carreamento em portadores de *S. aureus* independentemente de sua sensibilidade à oxacilina. Kluytmans et al. (1997), demonstraram que 20% dos trabalhadores hospitalares eram carreadores persistentes de *S. aureus*, enquanto, VandenBergh et al. (1999) encontraram 36% de indivíduos carregando de modo persistente esse microrganismo.

O perfil de sensibilidade mais amplo, apresentado pela maioria das cepas isoladas dos trabalhadores hospitalares (Figura 2) pode indicar que esses indivíduos foram colonizados por cepas extra-hospitalares. De acordo com Chambers (2001), ao contrário de cepas hospitalares que apresentam resistência a múltiplos antimicrobianos, cepas isoladas da comunidade tendem a apresentar resistência somente aos β -lactâmicos. Isso porque a pressão seletiva exercida pelo uso de antibióticos é muito menor na comunidade do que em hospitais.

O teste do Nitrocefina não detectou a enzima β -lactamase em todas as cepas de *S. aureus* que apresentaram resistência à penicilina, avaliada pelo método da difusão em ágar. Trinta e seis (90%) *S. aureus* isolados de trabalhadores hospitalares apresentaram resistência à penicilina e, dentre esses, apenas 61% (22) apresentaram resultado positivo no teste do Nitrocefina. Por outro lado, 45 (97,8%) *S. aureus* isolados de pacientes eram resistentes à penicilina, mas apenas 84,5% (38)

destes, apresentaram resultado positivo para o teste do Nitrocefin. De acordo com Livermore (1995), os testes para detecção de β -lactamase, que utilizam cefalosporinas cromogênicas, podem fornecer resultado falso-negativo para estafilococos que produzem baixos níveis da enzima. Desse modo, a pouca quantidade de enzima seria insuficiente para produzir uma mudança de cor (de amarelo para vermelho) adequadamente visível.

Os resultados da amplificação de seqüências marcadoras dos genes *femA* (686 pb), *ileS-2* (456 pb) e *mecA* (310 pb) apresentaram 100% de concordância com os testes de sensibilidade (método da difusão e *screen agar*) e também com os testes de identificação bacteriana convencionais. Outros autores também relatam boa correlação entre métodos fenotípicos e genotípicos de identificação e avaliação de resistência. Sakoulas et al. (2001) compararam a amplificação do gene *mecA* com o teste de aglutinação *MRSA-screen Latex* (Denka Seiken) para detecção de PBP2a e encontrou 99,7% de concordância entre os dois métodos. Pérez-Roth et al. (2002) obtiveram 100% de concordância entre a PCR Multiplex para amplificação de fragmentos dos genes *femB*, *mecA* e *ileS-2* e testes convencionais de identificação e também com a técnica da difusão para avaliação da sensibilidade à oxacilina e mupirocina.

Embora *S. aureus* seja uma bactéria de fácil crescimento e os testes de identificação sejam de fácil execução, a identificação e detecção de resistência de forma rápida são muito importantes para o diagnóstico e pronto tratamento de processos infecciosos e também para o controle de infecções hospitalares, uma vez que o paciente afetado por cepas multi-resistentes pode ser mais rapidamente

tratado e isolado, se necessário. Nesse sentido, a utilização de técnicas mais rápidas, como a PCR Multiplex é uma valiosa ferramenta para esse fim.

Nas técnicas convencionais, desde o isolamento primário até a leitura e interpretação do antibiograma decorrem cerca de 48 a 72 horas, enquanto que para a técnica da PCR Multiplex, cerca de 6 a 8 horas após o isolamento do patógeno são suficientes para o diagnóstico. Técnicas de extração de DNA mais simples e rápidas podem ser adotadas tornando o diagnóstico ainda mais rápido. Nunes et al. (1999) e Pérez-Roth et al (2001) utilizaram aquecimento a 100°C no protocolo de extração de DNA, reduzindo custo e tempo para o diagnóstico. Mason et al. (2001) propuseram uma técnica de extração a ser aplicada no próprio espécime clínico. Nesse estudo, os autores desenvolveram uma técnica de extração aplicada diretamente em amostras retiradas do frasco de hemocultura, sem a necessidade de isolamento do patógeno, conseguindo, desse modo, um diagnóstico mais rápido.

A utilização de vários *primers* destinados à amplificação de fragmentos de diferentes genes de resistência e genes espécie-específicos é uma alternativa bastante atraente. Assim, em uma única reação de amplificação pode-se obter a identificação e análise da resistência do agente infeccioso. No entanto, a amplificação simultânea de fragmentos-alvo, com diferentes tamanhos, pode ser dificultada, uma vez que a amplificação de fragmentos menores é favorecida e isso resulta em quantidades diferentes dos produtos amplificados. Bej et al. (1990) recomendam a utilização de diferentes concentrações de *primers*, assim, *primers* direcionados à amplificação de fragmentos maiores devem estar em maior concentração para que a quantidade dos produtos da amplificação seja semelhante.

Nenhuma cepa utilizada no presente trabalho possuía simultaneamente os três genes pesquisados. Nunes et al. (1999) relataram a dificuldade em amplificar simultaneamente esses mesmos genes. Esses autores realizaram a amplificação de fragmentos dos genes *femA*, *mecA* e *ileS-2* em duas reações de amplificação, uma reação para o gene *femA* e outra reação para os outros dois genes. No presente estudo, a amplificação simultânea dos fragmentos correspondentes aos genes *femA* e *ileS-2*, presentes na cepa JJ1 cedida por uma das pesquisadoras participantes do referido trabalho, foi possível graças à utilização de quantidades duas vezes maiores (50 pmol) dos *primers* F1 e F2.

Apesar de fornecer resultados mais rápidos e de ser considerada a técnica padrão-ouro para detecção de resistência, a técnica da PCR ainda é inacessível para a maioria dos laboratórios de análises clínicas, uma vez que, são necessários equipamentos e reagentes caros.

A PCR auxilia ainda a diferenciação entre cepas MRSA e cepas BORSA. De acordo com Tomasz et al. (1989 *apud* NICOLA et al., 2000), cepas BORSA podem ser hiper-produtoras de β -lactamase ou apresentar modificações nas PBP regulares, tendo como consequência baixa afinidade dessas PBP com os β -lactâmicos. Cepas com essa última característica são raramente isoladas e foram designadas pelos autores como MODSA (*Modified PBP Staphylococcus aureus*).

A resistência "borderline", ou resistência *mec*-independente, é chamada de falsa resistência, uma vez que, infecções provocadas por essas cepas podem ser tratadas com antibióticos β -lactâmicos associados a um inibidor de β -lactamase (FLUIT et al., 2001). Por outro lado, as infecções provocadas por cepas MRSA devem ser tratadas com outro grupo antimicrobiano, geralmente um

glicopeptídeo. Assim, a diferenciação entre cepas MRSA e cepas BORSA pode minimizar o uso de vancomicina e, dessa maneira, evitar a seleção de cepas de *S. aureus* e *Enterococcus* spp. resistentes a esse antimicrobiano, além de diminuir os custos do tratamento (LOWY, 2003).

De acordo com os critérios mais aceitos atualmente, cepas BORSA podem ser caracterizadas pela positividade do teste do nitrocefim, sensibilidade à amoxicilina + ácido clavulânico (halo ≥ 20 mm), CIM de oxacilina de 2 a 4 μ g/mL e ausência do gene *mecA* (VARALDO, 1993; MARTINEAU et al., 2000b; NICOLA et al., 2000; FLUIT et al., 2001).

No presente estudo, foram isoladas 3 cepas BORSA, duas (35E e 36E) foram isoladas da mão e narina de um trabalhador hospitalar e uma cepa foi isolada de secreção de mama de uma paciente (39P). Em nenhuma delas houve amplificação do fragmento de 310 pb referente ao gene *mecA* (Figuras 3 e 5).

A mupirocina, empregada na eliminação de MRSA em portadores saudáveis, é uma alternativa no tratamento de infecções por *S. aureus*, incluindo MRSA. No entanto, a utilização de mupirocina no tratamento de processos infecciosos é bastante limitada, uma vez que é um antimicrobiano de uso tópico.

Todas as 86 cepas de *S. aureus* isoladas nesse estudo apresentaram sensibilidade a mupirocina, tanto no teste de sensibilidade aos antimicrobianos convencional como na reação da PCR Multiplex (*ileS-2*). A incidência de cepas resistentes à mupirocina é bastante variada (KRISHMAN et al., 2002; PÉREZ-ROTH et al., 2002; YUN et al., 2003). No Brasil, Nunes et al. (1999) analisaram 50 cepas e encontraram 34% com alto nível de resistência e 34% com baixo nível de resistência à mupirocina em um hospital do Rio de Janeiro.

De acordo com Eltringham (1997 *apud* MEHTAR 1998), baixo nível de resistência à mupirocina não está relacionado com o uso excessivo de mupirocina, ao contrário da resistência em alto nível. Esse tipo de resistência à mupirocina não tem grande significado clínico uma vez que essas cepas podem ser eliminadas aumentando-se a concentração do antibiótico. No entanto, cepas com alto nível de resistência não podem ser erradicadas com mupirocina (HARBARTH et al., 1999).

Existem relatos de sucesso na erradicação nasal de MRSA em pequenos surtos (MEIER et al., 1996 *apud* MEHTAR, 1998). Nessa situação, a primeira meta é identificar todos os portadores, incluindo pacientes e trabalhadores e depois determinar a relação epidemiológica, por meio de testes de tipagem, desses isolados. Em seguida, a erradicação pode ser feita nesses indivíduos associando-a a outras medidas de controle de infecção (KLUYTMANS et al., 1997; HADDADIN et al., 2002). Kotilainen et al. (2003) tiveram sucesso na eliminação de MRSA epidêmico em um hospital finlandês. Nos países escandinavos menos de 1% dos *S. aureus* isolados em pacientes hospitalizados apresentam resistência à meticilina. Assim, os autores enfatizam a necessidade de adoção permanente de medidas rígidas para a prevenção de infecções por cepas MRSA, tais como a educação contínua dos trabalhadores hospitalares, o isolamento de pacientes infectados por MRSA, acompanhamento de pacientes e trabalhadores expostos a indivíduos infectados, eliminação das cepas em portadores entre outras medidas.

Em suma, o uso de mupirocina como tratamento profilático e também para erradicação nasal de portadores é um assunto controverso. Existem relatos descrevendo a emergência de cepas com alto nível de resistência relacionada ao uso indiscriminado de mupirocina (MILLER et al., 1996).

Em uma revisão da literatura, Cooper et al. (2004) analisaram 46 trabalhos publicados relatando medidas de controle para infecções por MRSA e concluíram que a medida mais efetiva em prevenir a transmissão de MRSA em ambientes endêmicos é o isolamento do paciente. Landman et al. (2003) relataram que medidas de controle e prevenção conseguiram diminuir a incidência de infecções por uma cepa MRSA recentemente introduzida em um hospital americano, no entanto, as medidas adotadas não produziram os mesmos resultados para infecções provocadas pela cepa MRSA endêmica presente nessa mesma instituição.

De acordo com os dados obtidos no presente estudo, o uso de mupirocina não seria indicado para erradicação de MRSA nos portadores, uma vez que a incidência de infecções por esse microrganismo é alta desde a inauguração desse hospital (40,5%). Além disso, deve-se considerar o risco de colonização por outros microrganismos e o risco de seleção de cepas resistentes à mupirocina.

Das cepas MRSA isoladas no presente estudo, 26 (87%) apresentam resistência ao cloranfenicol, clindamicina, ciprofloxacina, gentamicina, sulfametoxazol + trimetoprim, tetraciclina e eritromicina (antibiotipo A), sendo que 3 foram isoladas de trabalhadores dos setores Clínica Médica (1) e UTI (2), e 23 cepas foram isoladas de pacientes internados nos setores: UTI (9), Clínica Médica (6), Clínica Cirúrgica (6), Hemodiálise (1) e no Setor de Moléstias Infecto-contagiosas (1). Esse perfil de resistência é semelhante ao encontrado nas cepas mais freqüentemente isoladas nos hospitais brasileiros. Esse clone, designado clone multi-resistente brasileiro, é relatado nos hospitais do país desde 1990 e também tem sido isolado na Argentina, Chile e Uruguai (TEIXEIRA et al., 1995; AIRES DE SOUSA et al., 2001).

A aplicação da técnica PFGE poderia confirmar se as cepas isoladas nesse estudo pertencem ao clone endêmico brasileiro predominante. De acordo com a literatura, essa é a melhor técnica para tipagem de *S. aureus* pelo seu alto poder discriminatório.

O RAPD é considerado uma boa alternativa para a caracterização inicial de cepas de *S. aureus* isoladas em uma determinada Instituição, apresentando poder discriminatório razoavelmente bom, rapidez e menor custo. Tenover et al. (1997), salientam que a técnica PFGE é o método de referência para tipagem de *S. aureus*. No entanto, o mesmo autor recomenda a utilização do RAPD como técnica alternativa, quando a técnica de referência (PFGE) não está disponível ou quando se tem como objetivo a discriminação de um grupo de isolados.

Uma outra vantagem do RAPD, ao contrário do PFGE, é a pouca quantidade de DNA exigida para realização da técnica, uma vez que ocorrerá amplificação de fragmentos do genoma bacteriano. Isso é especialmente importante quando se trabalha com bactérias Gram-positivas que apresentam maior dificuldade para a extração do DNA. Além disso, a técnica pode ser usada satisfatoriamente para tipagem de outros microrganismos, tais como *Candida albicans*, *Proteus mirabilis*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas* sp., *Streptococcus mutans* entre outros, o que faz a técnica especialmente atraente para ser implementada no laboratório de rotina (TAMBIC et al., 1997; DAUTLE et al., 2002).

A técnica RAPD não é indicada para estudos mais amplos, quando se deseja comparar cepas isoladas em diferentes regiões. Cepas MRSA apresentam pouca variação genética e, a maioria das cepas são derivadas de poucos clones. Dessa maneira, é necessário que seja aplicada uma técnica de tipagem com alto

poder discriminatório capaz de revelar pequenas alterações genéticas (TENOVER et al., 1997). Provavelmente a maior desvantagem da técnica RAPD seja a dificuldade de padronização inter-laboratórios, pois diversos *primers* podem ser utilizados e, além disso, a utilização de diferentes termocicladores, marcas de reagentes, temperaturas de anelamento, métodos de extração e purificação do DNA podem afetar o resultado final (POWER, 1996; DASSANAYAKE & SAMARANAYAKE, 2003).

Vários autores obtiveram bons resultados utilizando a técnica RAPD em estudos epidemiológicos. Alguns estudos apresentaram resultados similares na tipagem de MRSA utilizando PFGE e RAPD (TAMBIC et al., 1997; OLMOS et al., 1998; FUNG et al., 2001; KONDOH et al., 2002).

Lee (2003), aplicou a técnica RAPD com dois *primers* para avaliar a relação genética existente entre cepas MRSA isoladas de animais e sua potencial transferência para humanos. Bartzavali-Louki et al. (2003) utilizaram a combinação da antibiotipagem e RAPD para avaliar a relação clonal entre 57 cepas MRSA isoladas durante dois anos em um hospital grego. Segundo esses mesmos autores, apesar da técnica RAPD apresentar menor poder discriminatório, comparando-se com PFGE, a combinação de diferentes *primers* pode determinar adequadamente a clonalidade de cepas MRSA. Al-Thawadi et al. (2003), compararam os resultados de três técnicas genotípicas, entre elas PFGE e RAPD, e obtiveram resultados semelhantes na avaliação da relação genética existente entre as cepas analisadas.

No presente trabalho, foram utilizadas para tipagem as técnicas da antibiotipagem e RAPD. A escolha desses métodos foi feita levando-se em consideração a disponibilidade de equipamentos no Hospital Universitário da

UNOESTE e a possibilidade de aplicação futura dessas técnicas para tipagem de outros microrganismos. A antibiotipagem possui fácil execução, é acessível a qualquer laboratório de rotina e fornece resultados rápidos. A maior desvantagem é o baixo poder discriminatório e a reprodutibilidade; entretanto, pode ser usado como triagem inicial para determinar a relação entre os isolados (TENOVER et al., 1994; WELLER, 2000).

Para a realização da técnica RAPD foram utilizados três *primers* (OPA05, OPA11 e MecA2) que geraram de 4 a 16 fragmentos. A utilização desses *primers*, em conjunto, não foi relatada na literatura consultada. O uso de um único *primer* na reação do RAPD pode não fornecer número de bandas suficiente para uma boa discriminação das cepas. Melhores resultados da técnica podem ser conseguidos usando dois ou mais *primers* na reação. Byun et al. (1997), compararam os resultados da técnica RAPD utilizando dois e cinco *primers*, na primeira reação obtiveram seis grupos e na segunda, dez grupos.

Foi possível observar que, no Hospital Universitário pesquisado, há predominância de cepas MRSA dos grupos genotípicos I (composto por 9 cepas) e IV (composto por 13 cepas). Esses dois grupos compreendem 73,3% das cepas MRSA isoladas.

As 30 cepas MRSA isoladas nesse estudo foram agrupadas em 4 antibiotipos e, pela técnica RAPD, em 8 grupos. Com a combinação dos dois métodos de tipagem foi possível dividir alguns grupos em subgrupos. Assim, as cepas pertencentes ao grupo genotípico IV (13 cepas) puderam ser divididas nos subgrupos IV-A (12) e IV-C (1). As três cepas do grupo genotípico V puderam ser divididas nos subgrupos V-A (2) e V-D (1). Todas as 26 cepas pertencentes ao

antibiotipo A apresentaram grande similaridade genética entre si (90%), com exceção da cepa 36P que apresentou 80% de similaridade com as demais.

As cepas 21P (grupo genotípico IV-C) e 2E (grupo genotípico V-D) apresentaram perfis de sensibilidade distintos: a primeira com sensibilidade ao cloranfenicol e sulfametoxazol + trimetoprim (antibiotipo C), e a segunda com sensibilidade apenas à tetraciclina (antibiotipo D). Apesar da diferença observada no perfil de resistência dessas cepas e as pertencentes ao antibiotipo A, todas elas apresentaram grande similaridade genética entre si. Os genes que codificam multi-resistência em MRSA estão localizados em plasmídios e transposons, incluindo os genes que codificam resistência à tetraciclina e trimetoprim (WITTE, 1999). De acordo com Weller (2000), o perfil de sensibilidade pode ser influenciado por fatores ambientais. Assim, é possível que os antibiogramas de dois isolados pertencentes a um mesmo clone possam diferir devido à aquisição ou perda de plasmídios carregando genes de resistência.

A cepa 24E apresentou o maior perfil de sensibilidade entre as cepas MRSA estudadas (antibiotipo B), juntamente com a cepa 28P. Essas duas cepas apresentaram resistência somente aos β -lactâmicos e foram as únicas que apresentaram CIM de 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para oxacilina. Essas cepas demonstraram maior distância genética entre todas as cepas MRSA através da análise do padrão de bandas gerado pela técnica RAPD. Apesar de apresentarem o mesmo perfil de sensibilidade, as duas cepas apresentam baixa similaridade genética entre si e com as demais.

De quatro pacientes (MIO, ERS, WBS e ARB) foram coletados 2 amostras biológicas para análise e, em cada uma dessas amostras foi isolado MRSA

com o mesmo perfil de sensibilidade. Em estudos epidemiológicos, isolados bacterianos provenientes de um mesmo paciente devem ser considerados como uma única cepa. Isso foi confirmado pela similaridade genética de 100% encontrada entre estes isolados (1-2P; 7-10P; 14-15P e 23-24P).

No grupo genotípico IV estão incluídas a cepa 34E, isolada de amostras nasal de um auxiliar de enfermagem da UTI, e as cepas 7-10P, 5P, 14-15P, 21P e 22P, isoladas de pacientes internados também na UTI. O fato de ter sido isolada uma cepa MRSA desse auxiliar de enfermagem com o mesmo perfil genotípico das cepas isoladas de pacientes, atendidos nessa mesma unidade hospitalar, pode sugerir a participação, direta ou indireta, desse portador na epidemiologia das infecções por MRSA na UTI do hospital. Fato semelhante foi observado com as cepas 19E, 1-2P e 13P, a primeira isolada de um trabalhador da Clínica Médica e as duas últimas de pacientes internados nesse mesmo setor.

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) de oxacilina foi idêntica (64 µg/mL) para todas as 16 cepas pertencentes aos grupos IV e V. Por outro lado, no grupo genotípico I, seis cepas apresentaram esse mesmo valor e três cepas apresentaram CIM de 128 µg/mL (Tabela 4). Todos esse grupos apresentaram grande similaridade genética e, as CIMs mais elevadas podem indicar maior indução na expressão da resistência, uma vez que a expressão de resistência de *S. aureus* à meticilina/oxacilina pode ser induzida por antibióticos β-lactâmicos, com exceção de meticilina e oxacilina (FLUIT et al., 2001). Outros fatores também podem estar envolvidos na expressão de resistência. De acordo com Berger-Bächli (1999), além da produção de PBP2a, outros fatores codificados cromossomicamente estão envolvidos na síntese e degradação do peptidoglicano e, portanto, podem influenciar

a expressão de resistência. O mesmo autor afirma que a presença de plasmídios contendo os genes que regulam a produção de β -lactamase também influenciam a expressão do gene *mecA*.

Como não foram realizadas coletas de amostras ambientais, não foi possível certificar a presença de MRSA no ambiente. No entanto, os dados obtidos sugerem que no Hospital Universitário “Dr. Domingos Leonardo Cerávolo”, em Presidente Prudente - SP, existem duas cepas predominantes (I e IV), com alta similaridade genética entre si, que estão disseminadas por diversos setores do hospital pesquisado, colonizando alguns trabalhadores hospitalares e provocando doença infecciosa nos pacientes atendidos.

7- Conclusões

- Entre os 100 trabalhadores do Hospital Universitário “Dr. Domingos Leonardo Cerávolo” da Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE, em Presidente Prudente (SP), que aceitaram participar desse estudo, 68 (68%) não eram portadores de *S. aureus*, 27 (27%) eram portadores de *S. aureus* sensível à meticilina/oxacilina (MSSA), 4 (4%) eram portadores de *S. aureus* resistente à meticilina/oxacilina (MRSA) e apenas 1 (1%) era portador de *S. aureus* “borderline” resistente (BORSA).
- No período estudado (julho a dezembro de 2002), 54,3% (25) das cepas de *S. aureus* isolados de pacientes internados no referido Hospital e que aceitaram participar do estudo, apresentaram resistência à oxacilina, dado semelhante aos encontrados em outros hospitais brasileiros. Por meio da antibiogramagem foi possível estabelecer uma correlação inicial entre as cepas MRSA isoladas de trabalhadores hospitalares (5) e de pacientes (25). Assim, 26 (87%) das cepas MRSA foram agrupadas no antibiograma A, sendo que 3 foram isoladas de trabalhadores hospitalares e 23 de pacientes.
- Houve 100% de concordância entre os resultados das técnicas fenotípicas e genotípicas (PCR Multiplex) para identificação de *S. aureus* e para avaliar sua resistência ou sensibilidade à oxacilina e mupirocina. A utilização da PCR Multiplex é uma importante ferramenta no diagnóstico e controle de infecções hospitalares, possibilitando mais rapidamente o isolamento e a orientação terapêutica. A utilização de concentrações diferentes de *primers* possibilitou a amplificação simultânea de fragmentos presentes nos genes *femA* e *ileS-2*.

- Por meio da antibiogramagem foi possível dividir os 30 MRSA isolados em 4 antibiogramas, sendo que o mais freqüente foi o antibiograma A (87%). Por outro lado, a genotipagem utilizando a técnica RAPD agrupou esses 30 isolados em 8 grupos (I a VIII). Das 26 cepas MRSA pertencentes ao antibiograma A, 25 foram distribuídas em cinco grupos genotípicos e esses grupos apresentaram similaridade genética de 90% ou mais. Apesar do menor poder discriminatório apresentado pela antibiogramagem, com a combinação dos resultados dos dois métodos de tipagem aqui empregados, foi possível dividir alguns grupos genotípicos em subgrupos, aumentando assim a discriminação das cepas isoladas nesse estudo.
- Apenas dois isolados (28P e 24E) apresentaram baixa similaridade genética em relação às demais cepas, e possuíam também perfis de sensibilidade (antibiograma B) bastante distintos. Assim, pode-se concluir que, no Hospital “Dr. Domingos Leonardo Cerávolo” – UNOESTE, em Presidente Prudente (SP), existem duas cepas MRSA predominantes (grupos genotípicos I e IV), e que apresentam alta similaridade genética entre si. Essas cepas predominantes foram isoladas tanto de pacientes internados como de trabalhadores hospitalares. Esses dados podem sugerir a importante participação de trabalhadores hospitalares na epidemiologia das infecções provocadas por MRSA nesse hospital.
- A padronização da técnica RAPD no Hospital Universitário “Dr. Domingos Leonardo Cerávolo” é de grande importância, uma vez que a técnica poderá ser utilizada sistematicamente no estudo de tipagem epidemiológica de agentes de infecção hospitalar.

8- Referências Bibliográficas

AHMED, A. O. A.; VAN BELKUN, A.; FAHAL, A. H.; ABU ELNOR, A. E.; ABOUGROUN, EL SIR A. M.; VANDENBERGH, M. F. Q.; ZIJLSTRA, E.; VERBRUGH, H. A. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and epidemiology of surgical-site infections in a sudanese university hospital. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 36, p. 3614-3618, 1998.

AIRES DE SOUSA, M.; MIRAGAIA, M.; SANCHES, I. S.; ÁVILA, S.; ADAMSON, I.; CASAGRANDE, S. T.; BRANDILEONE, M. C. C.; PALACIO, R.; DELL'ACQUA, L.; HORTAL, M.; CAMOU, T.; ROSSI, A.; VELAZQUEZ-MEZA, E.; ECHANIZ-AVILES, G.; SOLORZANO-SANTOS, F.; HEITMANN, I.; DE LENCASTRE, H. Three-year assessment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin América from 1996 to 1998. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 39, p. 2197-2205, 2001.

AL-THAWADI, S. I.; KESSIE, G.; DELACRUZ, D.; AL-AHDAL, M. N. A comparative study on the application of 3 molecular methods in epidemiological typing of bacterial isolates using MRSA as a prototype. **Saudi Med. J.**, Riyadh, v. 24, p. 1317-1324, 2003.

AMATO NETO, V.; LEVI, G. C.; LOPES, H. V.; MENDONÇA, J. S.; BALDY, J. L. S. **Antibióticos na Prática Médica**. 5 ed. São Paulo: Roca, 2000. 294 p.

ANDREWS, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. **J. Antimicrob. Chemother.**, London, v. 48, Suppl. S1, p. 5-16, 2001.

BARTZAVALI-LOUKI, C.; DIMITRACOPOULOS, G.; SPILIOPOULOU, I. Polymerase chain reaction fingerprint of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates in Greece are related to certain antibiotypes. **J. Microbiol. Methods**, Amsterdam, v. 53, p. 417-422, 2003.

BEJ, A. K.; MAHBUBANI, M. H.; MILLER, R.; DICESARE, J. L.; HAFF, L.; ATLAS, R. M. Multiplex PCR amplification and immobilized capture probes for detection of bacterial pathogens and indicators in water. **Mol. Cell. Probes**, London, v. 4, p. 353-365, 1990.

BERGER-BÄCHI, B. Genetic basis of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Cell. Mol. Life Sci.**, Basel, v. 56, p. 764-770, 1999.

BIGNARDI, G. E.; WOODFORD, N.; CHAPMAN, A.; JOHNSON, A. P.; SPELLER, D. C. E. Detection of the *mecA* gene and phenotypic detection of resistance in *Staphylococcus aureus* isolates with borderline or low-level methicillin resistance. **J. Antimicrob. Chemother.**, London, v. 37, p. 53-63, 1996.

BRAKSTAD, O. G.; MAELAND, J. A. Mechanisms of methicillin resistance in staphylococci. **APMIS**, Copenhagen, v.105, p.264-276, 1997.

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

BUSH, K.; JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrob. Agents Chemoter.**, Washington, v. 39, p. 1211-1233, 1995.

BYUN, D. E.; KIM, S. H.; SHIN, J. H.; SUH, S. P. Molecular epidemiologic analysis of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical specimens. **J. Korean Med. Sci.**, Seoul, v. 12, p. 190-198, 1997.

CETINKAYA, Y.; KOCAGÖZ, S.; HAYRAN, M.; UZUN, Ö.; AKOVA, M.; GÜRSU, G.; ÜNAL, S. Analysis of a mini-outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a surgical ward by using arbitrarily primed-polymerase chain reaction. **J. Chemother.**, Firenze, v. 12, p. 138-144, 2000.

CHAMBERS, H. F. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta, v. 7, p. 178-182, Mar., 2001.

COOPER, B. S.; STONE, S. P.; KIBBLER, C. C.; COOKSON, B. D.; ROBERTS, J. A.; MEDLEY, G. F.; DUCKWORTH, G.; LAI, R.; EBRAHIM, S. Isolation measures in the hospital management of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): systematic review of the literature. **BMJ**, London, v. 329, p. 533- 540, 2004.

DASSANAYAKE, R. S. & SAMARANAYAKE, L. P. Randomly amplified polymorphic DNA fingerprint: the basics. **Methods Mol. Biol.**, Totowa, v. 226, p. 117-122, 2003.

DAUTLE, M. P.; ULRICH, R. L.; HUGHES, T. A. Typing and subtyping of 83 clinical isolates purified from surgically implanted silicone feeding tubes by random amplified polymorphic DNA amplification. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 40, p.414-421, 2002.

DIAS, C. A. G.; KADER, I. A.; AZEVEDO, P.; BECKER, A.; JURACH, A.; PESCADOR, M. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in the stethoscopes. **Rev. Microbiol.**, São Paulo, v.28, p.82-84, 1997.

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

FLUIT, A. C.; VISSER, M. R.; SCHMITZ, F. J. Molecular detection of antimicrobial resistance. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, v. 14, p. 836-871, 2001.

FUCHS, P. C.; JONES, R. N.; BARRY, A. L. Interpretative criteria for disk diffusion susceptibility testing of mupirocin, a topical antibiotic. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 28, p. 608-609, 1990.

FUNG, C. P.; HO, M. W.; WANG, F. D.; TSAI, K.; LIU, C. E.; LIU, C. Y.; SIU, L. K. Investigation of an outbreak caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a cardiovascular surgery unit by ribotyping, randomly amplified polymorphic DNA and pulsed-field gel electrophoresis. **APMIS**, Copenhagen, v. 109, p. 474-480, 2001.

GEHA, D. J.; UHL, J. R.; GUSTAFERRO, C. A.; PERSING, D. H. Multiplex PCR for identification of methicillin-resistant staphylococci in the clinical laboratory. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 32, p. 1768-1772, Jul., 1994.

GRADELSKI, E.; VALERA, L.; ALEKSUNES, L.; BONNER, D.; FUNG-TOMC, J. Correlation between genotype and phenotypic categorization of staphylococci based on methicillin susceptibility and resistance. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 39, p. 2961-2963, 2001.

GRAFFUNDER, E. M. & VENEZIA, R. A. Risk factors associated with nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection including previous use of antimicrobials. **J. Antimicrob. Chemother.**, London, v. 49, p. 999-1005, 2002.

HACKBARTH, C. J.; CHAMBERS, H. F. *blaI* and *blaR1* regulate β -lactamase and PBP2a production in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 37, p. 1144-1149, 1993.

HADDADIN, A. S.; FAPPIANO, S. A.; LIPSETT, P. A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in the intensive care unit. **Postgrad Med. J.**, London, v. 78, p. 385-392, 2002.

HARBARTH, S.; DHARAN, S.; LIASSINE, N.; HERRAULT, P.; AUCKENTHALER, R.; PITTET, D. Randomized, placebo-controlled, double-blind trial to evaluate the efficacy of mupirocin for eradicating carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 43, p. 1412-1416, 1999.

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

KLOOS, W. E. & BANNERMAN, T. L. *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. **Manual of Clinical Microbiology**. 7th ed. Washington: ASM Press, 1999. p. 264-282.

KLOOS, W. E. & BANNERMAN, T. L. Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, v. 7, p. 117-140, 1994.

KLUYTMANS, J.; VAN BELKUM, A.; VERBRUGH, H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, v. 10, p. 505-520, 1997.

KONDOH, K.; FURUYA, D.; YAGIHASHI, A.; UEHARA, N.; NAKAMURA, M.; KOBAYASHI, D.; TSUJI, N.; WATANABE, N. Comparison of arbitrarily primed-polymerase chain reaction and pulse-field gel electrophoresis for characterizing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Lett. Appl. Microbiol.**, Oxford, v.35, p.62-67, 2002.

KONEMAN, E. J.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN JR., W. C. **Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido**. 5ª ed., Rio de Janeiro: MEDSI, 2001.

KOTILAINEN, P.; ROUTAMAA, M.; PELTONEN, R.; OKSI, J.; RINTALA, E.; MEURMAN, O.; LEHTONEN, O.; EEROLA, E.; SALMENLINNA, S.; VUOPIO-VARKILA, L.; ROSSI, T. Elimination of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from a university hospital and district institutions, Finland. **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta, v. 9, p. 169-175, 2003.

KRISHMAN, P. U.; MILES, K.; SHETTY, N. Detection of methicillin and mupirocin resistance in *Staphylococcus aureus* isolates using conventional and molecular methods: a descriptive study from a burns unit with high prevalence of MRSA. **J. Clin. Pathol.**, London, v. 55, p. 745-748, 2002.

LABISCHINSKI, H.; EHLERT, K.; BERGER-BÄCHI, B. The targeting of factors necessary for expression of methicillin resistance in staphylococci. **J. Antimicrob. Chemoter.**, London, v. 41, p. 581-584, 1998.

LANDMAN, D.; BRATU, S.; FLORES, C.; SATHE, S.; MACCARIO, E.; RAVISHANKAR, J.; QUALE, J. Molecular epidemiology of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Brooklyn, New York. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, Wiesbaden, v. 22, p. 58-61, 2003.

LEE, J. H. Methicillin (oxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 69, p. 6489-6494, 2003.

LESKI, T. A.; GNIADKOWSKI, M.; SKOCZYNSKA, A.; STEFANIUK, E.; TRZCINSKI, K.; HRYNIEWICZ, W. Outbreak of mupirocin-resistant staphylococci in a hospital in Warsaw, Poland, due to plasmid transmission and clonal spread of several strains. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 37, p. 2781-2788, 1999.

LIVERMORE, D. M. β -lactamases in laboratory and clinical resistance. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, v. 8, p. 557-584, 1995.

LIVERMORE, D. M. Antibiotic resistance in staphylococci. **Int. Antimicrob. J. Agents**, Amsterdam, v. 16, p. 3-10, 2000.

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

MAIDHOF, H.; REINICKE, B.; BLÜMEL, P.; BERGER-BÄCHI, B.; LABISCHINSKI, H. *femA*, which encodes a factor essential for expression of methicillin resistance, affects glycine content of peptidoglycan in methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 173, p. 3507-3513, 1991.

MANRIQUE, E. I. & GALVÃO, L. L. Racionalização e controle de antimicrobianos. In: RODRIGUES, E. A. C.; MENDONÇA, J. S.; AMARANTE, J. M. B. (Eds). **Infecções hospitalares: prevenção e controle**. São Paulo: Sarvier, 1997, p. 117-130.

MARKOULATOS, P.; SIAFAKAS, N.; MONCANY, M. Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. **J. Clin. Lab. Anal.**, New York, v. 16, p. 47-51, 2002.

MARTINEAU, F.; PICARD, F. J.; GRENIER, L.; ROY, P. H.; OUELLETTE, M.; The ESPRIT trial; BERGERON, M. G. Multiplex PCR assays for the detection of clinically relevant antibiotic resistance genes in staphylococci isolated from patients infected after cardiac surgery. **J. Antimicrob. Chemother.**, London, v. 46, p. 527-533, 2000a.

MARTINEAU, F.; PICARD, F. J.; LANSAC, N.; MÉNARD, C.; ROY, P. H.; OUELLETTE, M.; BERGERON, M. G. Correlation between the resistance genotype determined by multiplex PCR assays and the antibiotic susceptibility patterns of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 44, p. 231-238, 2000b.

MASON, W. J.; BLEVINS, J. S.; BEENKEN, K.; WIBONO, N.; OJHA, N.; SMELTZER, M. S. Multiplex PCR protocol for the diagnosis of staphylococcal infection. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 39, p. 3332-3338, 2001.

MEHTAR, S. New strategies for the use of mupirocin for the prevention of serious infection. **J. Hosp. Infect.**, London, v. 40, Suppl. B, p. 539-544, 1998.

MERLINO, J.; WATSON, J.; ROSE, B.; BEARD-PEGLER, M.; GOTTLIEB, T.; BRADBURY, R.; HARBOUR, C. Detection and expression of methicillin/oxacillin resistance in multidrug-resistant and non-multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* in Central Sydney, Australia. **J. Antimicrob. Chemoter.**, London, v. 49, p. 793-801, 2002.

MILLER, M. A.; DASCAL, A.; PORTNOY, J.; MENDELSON, J. Development of mupirocin resistance among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* after widespread use of nasal mupirocin ointment. **Infect. Control. Hosp. Epidemiol.**, New Jersey, v. 17, p. 811-813, 1996.

MONTANARI, M. P.; TONIN, E.; BIAVASCO, F.; VARALDO, P. E. Further characterization of borderline methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and analysis of penicillin-binding proteins. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 34, p. 911-913, 1990.

MULLIGAN, M. E.; MURRAY-LEISURE, K. A.; RIBNER, B. S.; STANDIFORD, H. C.; JOHN, J. F.; KORVICK, J. A.; KAUFFMAN, C. A.; YU, V. L. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a consensus review of the microbiology, pathogenesis and epidemiology with implications for prevention and management. **Am. J. Med.**, San Francisco, v. 94, p. 313-328, 1993.

MURAKAMI, K.; MINAMIDE, W.; WADA, K.; NAKAMURA, E.; TERAOKA, H.; WATANABE, S. Identification of methicillin-resistant strains of staphylococcus by polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 29, p. 2240-2244, 1991.

MYLOTTE, J. M.; MCDERMOTT, C.; SPOONER, J. A.. Prospective study of 114 consecutive episodes of *Staphylococcus aureus* bacteremia. **Rev. Infect. Dis.**, Chicago, v. 9, p. 891-907, 1987.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). **Performance standards for antimicrobials disk susceptibility tests**. 5th ed., Wayne, 2000. Approved Standard M2-A7, v.20, n.1.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. 5th ed., Wayne, Pa., 2000 (Approved Standard M7-A5, v.20, n.2).

NICOLA, F.; BANTAR, C.; CANIGIA, L. F.; RELLOSO, S.; BIANCHINI, H.; SMAYEVSKY, J. Comparison of several methods to determine methicillin-resistance in *Staphylococcus aureus* with focus on borderline strains. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, New York, v. 36, p. 91-93, 2000.

NUNES, E. L. C.; SANTOS, K. R. N.; MONDINO, P. J. J.; BASTOS, M. C. F.; GIAMBIAGI-DEMARVAL, M. Detection of *ileS-2* gene encoding mupirocin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by multiplex PCR. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, New York, v. 34, p. 77-81, 1999.

OLIVE, D. M.; BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 37, p. 1661-1669, 1999.

OLMOS, A.; CAMARENA, J. J.; NOGUEIRA, J. M.; NAVARRO, J. C.; RISEN, J.; SÁNCHEZ, R. Application of an optimized and highly discriminatory method based on arbitrarily primed PCR for epidemiologic analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nosocomial infections. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.36, p. 1128-1134, 1998.

PÉREZ-ROTH, E.; CLAVERIE-MARTÍN, F.; BATISTA, N.; MORENO, A.; MÉNDEZ-ÁLVAREZ, S. Mupirocin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates in a Spanish hospital. Co-application of multiplex PCR assay and conventional microbiology methods. **Diag. Microbiol. Infect. Dis.**, New York, v. 43, p. 123-128, 2002.

PÉREZ-ROTH, E.; CLAVERIE-MARTÍN, F.; VILLAR, J.; MÉNDEZ-ÁLVAREZ, S. Multiplex PCR for simultaneous identification of *Staphylococcus aureus* and detection of methicillin and mupirocin resistance. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 39, p. 4037-4041, 2001.

PETINAKI, E.; ARVANITI, A.; DIMITRACOPOULOS, G.; SPILIOPOULOU, I. Detection of *mecA*, *mecR1* and *mecl* genes among clinical isolates of methicillin-resistant staphylococci by combined polymerase chain reactions. **J. Antimicrob. Chemother.**, London, v. 47, p. 297-304, 2001.

POWER, E. G. M. RAPD typing in microbiology – a technical review. **J. Hosp. Infect.**, London, v. 34, p. 247-265, 1996.

RAMSEY, M. A.; BRADLEY, S. F.; KAUFFMAN, C. A.; MORTON, T. M. Identification of chromosomal location of *mupA* gene, encoding low-level mupirocin resistance in staphylococcal isolates. **Antimicrob. Agents Chemoter.**, Washington, v. 40, p. 2820-2823, 1996.

RODRIGUES, E. A. C. Infecções do trato urinário. In: RODRIGUES, E. A. C.; MENDONÇA, J. S.; AMARANTE, J. M. B. (Eds). **Infecções hospitalares: prevenção e controle**. São Paulo: Sarvier, 1997, p. 135-148.

SAKOULAS, G.; GOLD, H. S.; VENKATARAMAN, L.; DEGIROLAMI, P. C.; ELIOPOULOS, G. H.; QIAN, Q. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: comparison of susceptibility testing methods and analysis of *mecA*-positive susceptible strains. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 39, p. 3946-3951, 2001.

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

SOUSA, M. A. de; SANCHES, I. S.; FERRO, M. L.; DE LENCASTRE, H. Epidemiological study of staphylococcal colonization and cross-infection in two west African hospitals. **Microb. Drug Resist.**, New York, v. 6, p. 133-141, 2000.

STRANDÉN, A.; FREI, R.; WIDMER, A. F. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: can PCR replace pulsed-field gel electrophoresis. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 41, p. 3181-3186, 2003.

SWAMINATHAN, B.; MATAR, G. M. Molecular typing methods. In: PERSING, D. H.; SMITH, T. F.; TENOVER, F. C.; WHITE, T. J. **Diagnostic molecular microbiology: principles and applications**. 1. ed. Washington: ASM Press, 1993. p. 26-50.

TAMBIC, A.; POWER, E. G.; TALSANIA, H.; ANTHONY, R. M.; FRENCH, G.L. Analysis of an outbreak of non-phage-typeable methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by using a randomly amplified polymorphic DNA assay. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 35, p. 3092-3097, 1997.

TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Brasília, v. 33, p. 281-301, 2000.

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

TENOVER, F. C.; ARBEIT, R. D.; GOERING, R. V. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. **Infect. Control. Hosp. Epidemiol.**, New Jersey, v. 18, p. 426-439, 1997.

TENOVER, F. C.; ARBEIT, R. D.; ARCHER, G.; BIDDLE, J.; BYRNE, S.; GOERING, R. V.; HANCOCK, G.; HÉBERT, G. A.; HILL, B.; HOLLIS, R.; JARVIR, W. R.; KREISWIRTH, B.; EISNER, W.; MASLOW, J.; MCDUGAL, L. K.; MILLER, M.; MULLIGAN, M.; PFALLER, M. A. Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 32, p. 407-415, 1994.

VAN BELKUM, A.; KLUYTMANS, J.; VAN LEEUWEN, W.; BAX, R.; QUINT, W.; PETERS, E.; FLUIT, A.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C.; VAN DEN BRULE, A.; KOELEMAN, H.; MELCHERS, W.; MEIS, J.; ELAICHOUNI, A.; VANEECHOUTTE, M.; MOONENS, F.; MAES, N.; STRUELENS, M.; TENOVER, F.; VERBRUGH, H. A. Multicenter evaluation of arbitrarily primed PCR for typing of *Staphylococcus aureus* strains. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.33, p.1537-1547, 1995.

VANDENBERGH, M. F. Q.; YZERMAN, E. P. F.; VANBELKUM, A.; BOELENS, H. A. M.; SIJMONS, M.; VERBRUGH, H. A. Follow-up of *Staphylococcus aureus* nasal carriage after 8 years: redefining the persistent carrier state. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 37, p. 3133-3140, 1999.

VANNUFFEL, P.; GIGI, J.; EZZEDINE, H.; VANDERCAM, B.; DELMEE, M.; WAUTERS, G.; GALA, J. Specific detection of methicillin-resistant *Staphylococcus* species by multiplex PCR. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 33, p. 2864-2867, 1995.

VANNUFFEL, P.; HEUSTERSPREUTE, M.; BOUYER, M.; VANDERCAM, B.; PHILIPPE, M.; GALA, J. Molecular characterization of *femA* from *Staphylococcus hominis* and *Staphylococcus saprophyticus*, and *femA*-based discrimination of staphylococcal species. **Res. Microbiol.**, Paris, v. 150, p. 129-141, 1999.

VARALDO, P.E. The borderline methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. **J. Antimicrob. Chemother.**, London, v. 31, p. 1-4, 1993.

VENEZIA, R. A.; DOMARACKI, B. E.; EVANS, A. M.; PRESTON, K. E.; GRAFFUNDER, E. Selection of high-level oxacillin resistance in heteroresistant *Staphylococcus aureus* by fluoroquinolone exposure. **J. Antimicrob. Chemother.**, London, v. 48, p. 375-381, 2001.

WAGENVOORT, J. H.; SLUIJSMANS, W.; PENDERS, R. J. Better environmental survival of outbreak vs sporadic MRSA isolates. **J. Hosp. Infect.**, London, v. 45, p. 231-234, 2000.

WELLER, T. M. A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* typing methods: which should be the international standard? **J. Hosp. Infect.**, London, v. 44, p.160-172, 2000.

WITTE, W. Antibiotic resistance in Gram-positive bacteria: epidemiological aspects. **J. Antimicrob. Chemother.**, London, v.44, p.1-9, 1999.

YUN, H.; LEE, S. W.; YOON, G. M.; KIM, S. Y.; CHOI, S.; LEE, Y. S.; CHOI E.; KIM, S.; Prevalence and mechanisms of low- and high-level mupirocin resistance in staphylococci isolated from a korean hospital. **J. Antimicrob. Chemother.**, London, v. 51, p. 619-623, 2003.

Anexo I- Modelo do Termo de Consentimento**Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

Eu, _____,
possuidor do RG _____ concordo em participar voluntariamente do projeto de pesquisa “Detecção molecular de resistência e caracterização genotípica de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA)”. Estou ciente de que minha identidade será mantida em sigilo e que os dados obtidos no estudo não poderão ser usados sem minha autorização. Fui esclarecido verbalmente e por escrito dos objetivos desse trabalho e, por aceitar os termos autorizo minha participação.

Responsável pelo projeto: Alexandre Braoios

Telefone para contato: (18) 2291083 e 2291084

Presidente Prudente, _____ de _____ de 2002

Assinatura

Anexo II – Autorização para realização do trabalho no Hospital Universitário da UNOESTE.

Anexo III – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Oeste Paulista

Anexo IV – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Oeste Paulista

**Anexo V – Composição do Kit GFX Genomic Blood (Amersham Biosciences)
para extração do DNA bacteriano**

COMPOSIÇÃO DO KIT GFX GENOMIC BLOOD (*Amersham Biosciences*)

- Solução de lise: 10 mM KHCO₃; 155 mM HH₄Cl; 0,1 mM EDTA
- Solução de extração: tampão contendo agente caotrópico e detergente.
- Solução de lavagem: Tampão Tris-EDTA.
- Colunas GFX: Colunas MicroSpin™ contendo uma matriz de fibra de vidro.
- Tubos: microtubos com capacidade para 2 mL

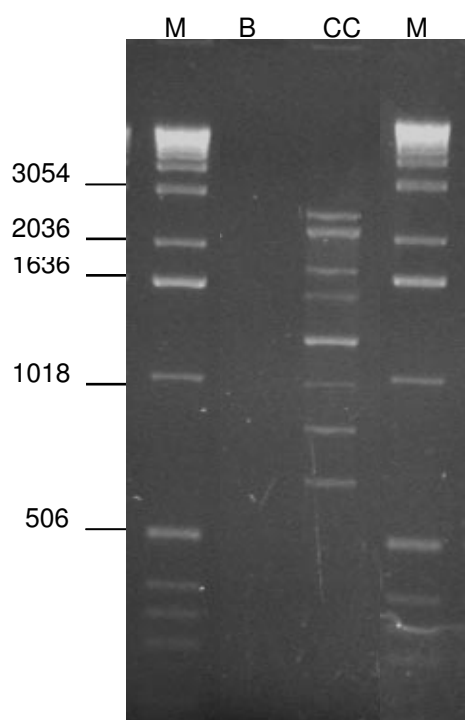
REAGENTES NÃO FORNECIDOS PELO KIT:

- RNase A (Qiagen): 20 mg/mL
- Tampão TE: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0.
- Lisozima (Calbiochem®): 10 mg/mL em 10 mM Tris-HCl, pH 8.0
- Tampão lisozima: 0.1 M NaCl, 10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA, 5% Triton X-100)
- Proteinase K (GIBCO®): 20 mg/mL em 10 mM Tris-HCl pH 8.0.

Anexo VI – Protocolo de extração do DNA bacteriano

- Centrifugar 1,5mL de cultura em caldo (35°C 18 hs), por 30 segundos a 14.000 rpm
- Desprezar o sobrenadante
- Adicionar 40 uL de tampão lizozima (agitar em vortex imediatamente até o total desprendimento)
- Adicionar 10 uL de lizozima e agitar em vortex
- Deixar o tubo por 15min em T° ambiente (agitar ocasionalmente)
- Adicionar 10µL Proteinase K e agitar. Incubar a 55° por 15 min.
- Adicionar 5 uL RNase A, agitar e deixar por 15min em temperatura ambiente.
- Adicionar 500 µL da solução de extração, agitar, deixar por 10 min em temperatura ambiente agitando ocasionalmente.
- Transferir toda a mistura para a coluna GFX encaixada em um microtubo
- Centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto.
- Descartar o líquido do tubo e colocar 500 µL de sol de extração na coluna (Centrifugar 8000 rpm 1 min).
- Descartar novamente o líquido depositado no tubo.
- Adicionar 500 µL de solução de lavagem na coluna GFX.
- Centrifugar a velocidade máxima – 12 a 16000 rpm por 3 minutos.
- Descartar o líquido do tubo e transferir a coluna para um novo tubo de 1,5 mL
- Adicionar 200 µl de tampão TE pré-aquecido a 70°C na coluna encaixada no novo tubo e deixar por 1 minuto em temperatura ambiente.
- Centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto.
- Manter o microtubo coletor a -20°C até o momento do uso.

Anexo VII – Fragmentos gerados pela técnica RAPD utilizando os *primers* OPA5, OPA11 e MecA2 na amostra comunitária utilizada para avaliação da capacidade discriminatória:



M: Peso molecular de 1 Kb

B: Branco (todos os reagentes sem amostra de DNA)

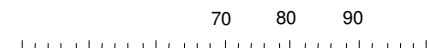
CC: Cepa comunitária

Anexo VIII – Dendrograma gerado pelo programa GelCompar II utilizando a amostra comunitária para avaliação da capacidade discriminatória da técnica RAPD

Dice (Opt:1.00%) (Tol 2.0%-2.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]

RAPD

40 50 60 70 80 90 100



Cepa comunitária

28P	.UTI	B
24P	.UTI	A
23P	.UTI	A
35P	.CI Med	A
37P	.CI Med	A
40P	.CI Cir	A
43P	.UTI	A
49P	.UTI	A
50P	.CI Med	A
47P	.CI Cir	A
29P	.UTI	A
20P	.UTI	A
25P	.CI Cir	A
19E	.CI Med	A
34E	.UTI	A
2P	.CI Med	A
1P	.CI Med	A
4P	.MI	A
7P	.UTI	A
5P	.UTI	A
13P	.CI Med	A
15P	.UTI	A
14P	.UTI	A
10P	.UTI	A
22P	.UTI	A
21P	.UTI	C
41P	.CI Cir	A
38P	.CI Cir	A
18P	.CI Cir	A
2E	.UTI	D
6E	.UTI	A
3P	.CI Med	A
36P	.Hemo	A
24E	.CI Med	B