

UNESP  UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-graduação em Análises Clínicas

FCF/UNESP – Araraquara/SP

**ESTUDO DE CEPAS DE *Staphylococcus aureus* ISOLADAS DE AMOSTRAS  
NASAIS E LINGUAIS DE PORTADORES VOLUNTÁRIOS ADULTOS  
SAUDÁVEIS.**

**VILMA CLEMI COLLI**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do grau de mestre em Análises Clínicas (Área Microbiologia Clínica).

**Orientadora: Profa. Dra. Maria Stella Gonçalves Raddi**

**Co-orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Pizzolitto**

**Araraquara/SP**

**2007**

UNESP  UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-graduação em Análises Clínicas

FCF/UNESP – Araraquara/SP

**ESTUDO DE CEPAS DE *Staphylococcus aureus* ISOLADAS DE AMOSTRAS  
NASAIS E LINGUAIS DE PORTADORES VOLUNTÁRIOS ADULTOS  
SAUDÁVEIS.**

**VILMA CLEMI COLLI**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do grau de mestre em Análises Clínicas (Área Microbiologia Clínica).

**Orientadora: Profa. Dra. Maria Stella Gonçalves Raddi**

**Co-orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Pizzolitto**

**Araraquara/SP**

**2007**

## **DEDICATÓRIA**

Dizer do caráter, perseverança, sabedoria, humor, inteligência, sagacidade, bondade, generosidade e humildade são quase nada e nada que eu escreva será abrangente para ilustrar a trajetória de uma vida honrada e gloriosa!

Ao amigo, **Prof. Dr. Antonio Carlos Pizzolitto**, esta singela dedicatória com carinho, respeito e admiração.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus que me predestinou este objetivo, nele fez-me perseverar e através de seus anjos vigiou meu caminho, livrou-me dos perigos e aqueceu meu coração nos momentos árduos.

À minha orientadora e amiga Maria Stella Gonçalves Raddi pela dedicação e companheirismo em boa parte da desta trajetória.

Aos profissionais e pacientes da Clínica Integrada da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, que viabilizaram a execução deste trabalho, em especial à Profa. Dra. Denise Pedrine Ostine, que me abriu as portas e o coração.

Aos amigos e colaboradores do Laboratório Atual de Análises Clínicas e do Instituto de Criminalística do Núcleo de Araçatuba-SP.

À amiga Aparecida Bernardete Rocatelli que profetizou este tempo anos atrás.

Aos colegas de jornada, a todos os funcionários em especial às incansáveis Cláudia, Laura e Sônia.

## AMOR IMENSO E GRATIDÃO ETERNA

A todos que por mim torceram.

Aos amigos que com paciência e grandeza suportaram minhas inquietudes, serviram-me de estímulo e se alegraram nas minhas conquistas! De modo especial a: **Fátima Maria Antônia Vantini e Vilma Vera Jovino.**

À minha cunhada **Silvana**, meu irmão **Aldo** e meus sobrinhos **Alan** e **Artur** que me acolheram em seu lar com amor e alegria impagáveis.

Aos meus filhos **Leonardo** e **Laura**, que tiveram parte da minha presença subtraída e ainda assim torceram, incentivaram e vibraram por mim.

Aos **meus pais** *in memorium*, os grandes merecedores desta conquista, pela determinação, espírito de luta, dignidade e honra com que constituíram nossa família e nos ensinaram o amor à vida, à ciência, ao trabalho e principalmente o amor às criaturas.

Devemos nos ajudar mutuamente! Os seres humanos são assim!  
Desejamos viver para a felicidade do próximo, não para o seu infortúnio!

Por que havemos de odiar e desprezar uns aos outros?

Neste mundo há espaço para todos!

A terra, que é boa e rica, pode prover a todas as nossas necessidades!

**Charles Chaplin**

Pesquisa realizada no **Setor de Microbiologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, campus da UNESP de Araraquara-SP, Laboratório Atual de Análises Clínicas Ltda, da cidade de Araçatuba-SP, Instituto de Microbiologia Médica Professor Paulo de Góes, Departamento de Microbiologia Médica-UFRJ e Laboratório Especial de Microbiologia Médica da Universidade Federal de São Paulo - SP.**

## **SUMÁRIO**

### **LISTA DE TABELAS**

### **LISTA DE FIGURAS**

### **LISTA DE ABREVIACÕES**

### **RESUMO**

### **ABSTRACT**

<b><u>CAPÍTULO – 1</u></b> .....	<b>15</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>20</b>
<b>2. REVISÃO</b> .....	<b>22</b>
2.1 - <i>Staphylococcus aureus</i> .....	<b>22</b>
2.2 - Resistência de <i>Staphylococcus aureus</i> aos agentes antimicrobianos $\beta$ - lactâmicos, à mupirocina e à clindamicina.....	<b>23</b>
2.3 - Detecção de resistência de <i>Staphylococcus aureus</i> à oxacilina e meticilina.....	<b>27</b>
2.4 - Tipagem de microrganismos.....	<b>29</b>
2.5 - Epidemiologia.....	<b>31</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>39</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODO</b> .....	<b>40</b>
4.1 - Amostra Populacional, procedimentos de coleta e identificação de material.....	<b>41</b>
4.2 - Seqüência de Procedimentos.....	<b>42</b>
4.3 - Teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA).....	<b>43</b>
4.4 - Verificação de resistência à oxacilina através do <i>screening agar</i> .....	<b>43</b>
4.5 - Determinação da concentração inibitória mínima para oxacilina.....	<b>44</b>
4.6 - Detecção de resistência induzida à clindamicina (D-teste).....	<b>44</b>



4.7 - Reação em cadeia da polimerase (PCR) para a detecção do gene <i>mecA</i> .....	45
4.7.1 - Extração do DNA genômico.....	45
4.7.2 - Reação de amplificação.....	46
4.7.3 – Eletroforese.....	46
4.8 - Análise do DNA cromossômico de <i>S. aureus</i> pela técnica de eletroforese em campo pulsado ( <i>PFGE</i> ).....	46
4.8.1 - Extração do DNA genômico.....	47
4.8.2 - Digestão enzimática.....	48
4.8.3 – Eletroforese.....	49
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>45</b>
5.1 - Incidência de <i>S. aureus</i> e distribuição dos portadores.....	50
5.2 - Teste de sensibilidade aos antimicrobianos, Concentração inibitória mínima para oxacilina, Crescimento em “ <i>screening agar</i> ”, Verificação fenotípica de cepas <i>MRSA</i> e <i>BORSA</i> .....	52
5.3 - Verificação de resistência induzida à clindamicina (MLS <sub>BI</sub> ) por D- teste.....	54
5.4 - Verificação de associação entre cepas por métodos fenotípicos.....	56
5.5 - Verificação do índice de portadores com reisolamentos após a segunda coleta e sua distribuição por sítio.....	56
5.6 - Resultados da avaliação de associação clonal das amostras bacterianas pela técnica de eletroforese em campo pulsado – <i>PFGE</i> ..	59
5.7 – Resultados da reação em cadeia da polimerase (PCR) para a detecção do gene <i>mecA</i> .....	63
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	<b>65</b>

<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>70</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>71</b>
<b>9. ANEXOS.....</b>	<b>78</b>
9.1 - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (Anexo 1).....	<b>78</b>
9.2 - Termo de Consentimento Esclarecido (Anexo 2).....	<b>79</b>
9.3 - Soluções e Reagentes (Anexo 3).....	<b>82</b>
<b><u>CAPÍTULO – 2</u>.....</b>	<b>85</b>
<b>1. ARTIGO.....</b>	<b>86</b>

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1</b> - Comparação entre <i>HA-RSA</i> e <i>CA-MRSA</i> .....	<b>35</b>
<b>Tabela 2</b> - Incidência de <i>S. aureus</i> .....	<b>50</b>
<b>Tabela 3</b> - Resultados de teste de sensibilidade aos antimicrobianos CIM; crescimento em SA e produção de $\beta$ -Lactamase.....	<b>53</b>
<b>Tabela 4</b> - Incidência de <i>S. aureus MSLB<sub>i</sub></i> entre os portadores.....	<b>54</b>
<b>Tabela 5</b> - Incidência de <i>S. aureus MSLB<sub>i</sub></i> dentre as cepas.....	<b>55</b>
<b>Tabela 6</b> - Comparação entre cepas pareadas nos dois sítios.....	<b>56</b>
<b>Tabela 7</b> - Distribuição dos portadores com reisolamentos após um intervalo de 5 meses entre as coletas.....	<b>57</b>
<b>Tabela 8</b> - Comparação fenotípica entre cepas dos dois isolamentos.....	<b>58</b>
<b>Tabela 9</b> - Resultados da tipagem molecular pela técnica de <i>PFGE</i> de dez amostras de <i>S. aureus</i> sensíveis à oxacilina.....	<b>60</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 01</b> - Ilustração Esquemática de <i>PFGE</i> .....	<b>47</b>
<b>Figura 02</b> - Distribuição dos portadores em função do sítio de origem das cepas isoladas.....	<b>51</b>
<b>Figura 03</b> - Distribuição das cepas quanto ao sítio de origem.....	<b>51</b>
<b>Figura 04</b> - Cepa 5N ( <i>MRSA</i> ) resistente à oxacilina e sensível à cefoxitna no TSA.....	<b>53</b>
<b>Figura 05</b> - Resultados de D- teste apontando cepa com resistência induzida à clindamicina ( <i>MSLB<sub>i</sub></i> ) e controle com cepa sensível .....	<b>54</b>
<b>Figura 06</b> - Resultados de D-teste positivo apontando o achatamento do halo de clindamicina na junção de sua difusão com eritromicina e o aspecto de letra "D".....	<b>55</b>
<b>Figura 07</b> - Distribuição de cepas <i>MSLB<sub>i</sub></i> .....	<b>55</b>
<b>Figura 08</b> - Distribuição dos portadores após intervalo de 5 meses entre as coletas.....	<b>58</b>
<b>Figura 09</b> - Resultados de <i>PFGE</i> conforme indicados na tabela 9.....	<b>60</b>
<b>Figura 10</b> – Resultados de <i>PFGE</i> com as cepas correspondentes e identificação dos padrões (A, B, C, D, E e F).....	<b>61</b>
<b>Figura 11</b> - Resultados de <i>PFGE</i> para comparação entre cepas isoladas de sítio lingual de portador persistente (LGL) com 5 meses de intervalo entre as coletas (A e B = diferentes padrões= diferentes clones).....	<b>51</b>
<b>Figura 12</b> - Resultados de <i>PFGE</i> para comparação entre cepas isoladas de sítio lingual de portador persistente (40L) com 5 meses de intervalo entre as coletas (C e C = mesmos padrões = mesmos clones).....	<b>62</b>

- Figura 13** - Resultados de *PFGE* para comparação entre cepas isoladas de sítio nasal lingual do portador 4 na mesma data (D e D = mesmos padrões = mesmos clones)..... **62**
- Figura 14** - Resultados de *PFGE* para comparação entre cepas isoladas de sítio nasal lingual do portador 8 na mesma data (E e E = mesmos padrões = mesmos clones)..... **62**
- Figura 15** - Resultados de *PFGE* para comparação entre cepas isoladas de sítio nasal lingual do portador 19 na mesma data (D e D = mesmos padrões = mesmos clones)..... **62**
- Figura 16** - Das cepas (5N e 5N2) resistentes à oxacilina e sensíveis à cefoxitina obtidas de isolado nasal de um mesmo indivíduo com 5 meses de intervalo entre as coletas..... **63**
- Figura 17** - Resultado de *PCR* para pesquisa de gene *mecA* nas duas amostras (5N e 5N2) isoladas do sítio nasal do mesmo indivíduo em duas coletas distintas com intervalo de 5 meses..... **64**

## LISTA DE ABREVIACÕES

<b>TSA</b>	Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos
<b>SA</b>	Screening Agar
<b>PCR</b>	Reação em Cadeia de Polimerase
<b>PFGE</b>	Eletroforese em Campo Pulsado
<b><i>S. aureus</i></b>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<b>NCCLS</b>	National Committee for Clinical Laboratory Standards
<b>MRSA</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à Meticilina e Oxacilina
<b>MSSA</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> sensíveis à Meticilina e Oxacilina
<b>BORSA</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> hiperprodutores de $\beta$ -lactamase
<b>CA MRSA</b>	MRSA Associado à Comunidade
<b>HÁ MRSA</b>	MRSA Associado a Hospital
<b>PBP</b>	Proteínas de Ligação à Penicilina
<b>CIM</b>	Concentração Inibitória Mínima
<b><i>MLS<sub>B</sub>I</i></b>	<i>Staphylococcus aureus</i> com resistência induzida à clindamicina
<b><i>MLS<sub>B</sub>C</i></b>	<i>Staphylococcus aureus</i> com resistência constitutiva à clindamicina
<b>DNA</b>	Ácido desoxiribonucleico
<b><math>\mu</math>g</b>	Micrograma
<b><math>\mu</math>l</b>	Microlitro
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mm</b>	Milímetros
<b>CDC</b>	Centers for Disease Control and Prevention
<b>PVL</b>	leucocidina Panton-Valentine
<b>h</b>	horas
<b>BHI</b>	Infusão de cérebro e coração

## CAPÍTULO 1

## RESUMO

Neste estudo investigou-se a colonização por *S. aureus* e a associação entre cepas isoladas dos sítios nasal e lingual de voluntários adultos saudáveis. Adicionalmente verificou-se a presença de cepas *MRSA*, *BORSA*, com resistência constitutiva ou induzida à clindamicina e os portadores que persistiram após cinco meses. Foram obtidos *swabs* dos sítios nasal e lingual de 100 indivíduos adultos sem histórico de internação hospitalar, sem contato com serviços de saúde, doença de base, diabetes e sem uso de antibióticos. Dos pacientes, 9,0% tiveram *S. aureus* isolados apenas do sítio nasal, 4,0% apenas no sítio lingual e 4,0% nos dois sítios. Uma cepa nasal foi considerada fenotipicamente *MRSA* com características de *CA MRSA* e uma foi considerada *BORSA*. Quatro cepas (19,0%) demonstraram resistência induzida à clindamicina. Uma delas de origem nasal e outra de origem lingual de diferentes indivíduos. As outras duas eram de origem nasal e lingual de um mesmo indivíduo. Entre os portadores 10,0% e 5,0% foram carreadores persistentes nasais e linguais respectivamente. O portador de *MRSA* nasal foi considerado persistente. A associação entre cepas nasal e lingual de um mesmo indivíduo foi excluída para um dos pacientes e confirmada por *PFGE* para os demais. Dentre os portadores persistentes, 2 foram persistentes apenas no sítio lingual. Os resultados de *PFGE* confirmaram que um deles era portador persistente do mesmo clone apenas no sítio lingual. Estes resultados sugerem que uma atenção específica ao sítio lingual nas profilaxias cirúrgicas com mupirocina poderia melhorar o resultado de seu emprego. Adicionalmente a associação clonal entre cepas nasal e lingual sugere que o sítio lingual seja um sítio provável para recolonizações pelos mesmos clones após profilaxia com mupirocina. As cepas caracterizadas fenotipicamente como *CA MRSA* foram submetidas à pesquisa do gene *mecA* por *PCR* e surpreendentemente não foi observada a amplificação dos fragmentos do respectivo gene. Isto significa que



estas cepas não possuem mecanismo de resistência à metilina por produção de *PBP* codificada pelo gene *mecA*, e que estudos adicionais são necessários para verificar os verdadeiros mecanismos envolvidos. Estes resultados chamam a atenção para que cuidados especiais sejam tomados nas cepas identificadas fenotipicamente como *CA MRSA*.

## ABSTRACT

In this study we attempted to investigate *S. aureus* colonization in healthy adult volunteer and tried to establish the correlation between strains isolated from the nasal and lingual sites. Additionally we verified the presence of MRSA, BORSA, clindamycin constitutive and inducible resistant and investigate the persistent carriers after 5 months. The swabs were obtained from nasal and lingual sites from 100 adult patients without a history of hospitalization, health care contact, antimicrobial use, basis disease and diabetes. Of the patients, 9.0% had only nasal colonization, 4.0% only lingual colonization and 4.0% had *S. aureus* colonization in both (nasal and lingual) sites. From the nasal isolations, one was considered a phenotypic methicillin-resistant strain with CA MRSA's characteristics and one a borderline oxacillin resistant. No one constitutive clindamycin constitutive resistant strain was isolated. Four isolations (19.0%) demonstrated inducible clindamycin resistance. One of them was from the nasal and another from the lingual site from different patients. The other two, were isolated from the same patient in both sites. From the nasal and lingual carriers 10.0% and 5.0% respectively were persistent carriers. The nasal methicillin-resistant carrier was considered persistent. The clonally association between nasal and lingual strains in the same patient was excluded for one patient and confirmed by PFGE for the others. From the persistent 2 were only lingual persistent carriers. The PFGE confirmed that one of them was colonized with the same clone. It suggests that special attention should also be directed to this site for the control of nosocomial infection. It should be better the results of prophylaxis. In addition the association between the nasal and lingual strains suggested that lingual site can be a possible site for same clone recolonization after mupirocin prophylaxis. The strains with CA MRSA's characteristics were submitted to *mecA* gene investigation though fragments amplification by PCR and surprisely they weren't observed. It means that the

resistance mechanism of this strain was not for alteration of PBP expressed by gene *mecA* and more studies are necessary to verify the true mechanisms and products involved. These results claimed attention for the necessity of special cares with strains identified as CA MRSA through phenotypic characteristics.

## 1- INTRODUÇÃO

---

Na atualidade, *Staphylococcus aureus* é um dos microrganismos mais amplamente estudados por estar envolvido em grande diversidade de processos infecciosos, pela capacidade de desenvolver resistência antimicrobiana e representar uma das maiores causas de infecções hospitalares adquiridas, contribuindo para elevações dos índices de morbidade/mortalidade (MURRAY et al., 2003).

Sua transmissão ocorre por contato direto ou indireto. As colonizações são assintomáticas, de caráter transitório ou persistente e podem durar anos. Sua distribuição no corpo humano é vasta, porém os estudos de portadores são mais freqüentes em isolados do vestíbulo nasal, pele e pregas perineais (BARON et al., 2001; KONEMAN et al., 2001; MIMS et al., 1999; MURRAY et al., 2003; STUKUS, 1997).

Cepas resistentes à meticilina (*Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* = *MRSA*) têm sido isoladas de infecções desde o início da década de 1980. Elas apresentam resistência aos antimicrobianos com estrutura química  $\beta$ -lactâmica e representam um grande problema de saúde pública. (BARON et al., 2001; KONEMAN et al., 2001; MIMS et al., 1999; MURRAY et al., 2003). A terapia para *MRSA* tornou-se problemática e restrita, pois a resistência múltipla aos antimicrobianos é comum, o que potencializa a importância da identificação de portadores e a prevenção.

A mupirocina é recomendada como profilaxia no controle de infecções hospitalares por *S. aureus*, mas sua eficácia foi demonstrada apenas em portadores nasais e recolonizações com as mesmas cepas provavelmente a partir de sítios extra-nasais foram detectadas (WERTHEIM et al., 2005; PERL et al, 2002).

A identificação de portadores de cepas sensíveis à meticilina (*Methicillin-Sensible Staphylococcus aureus* = *MSSA*) em pessoas de comunidade é comum, porém os carreadores de *MRSA* têm sido descritos em associação com fatores de risco como hospitalização ou profissionais correlacionados a hospitais. As publicações relatam o *MRSA* como “um residente hospitalar” (KONEMAN ET AL., 2001; MIMS et al., 1999; MURRAY et al., 2003; STUKUS, 1997).

Estudos verificaram a presença de cepas *MRSA* em crianças sem associação com os fatores de risco e sugeriram uma modificação lenta na epidemiologia de *MRSA*. (CHAMBERS, 2001; WU et al., 2002; UEMURA et al., 2004; ERDENIZMENLI et al., 2004).

Estudos sugerem que as infecções comunitárias por *MRSA* em indivíduos saudáveis sem fatores de risco vêm aumentando (NIMMO et al., 2000).

De fato, as cepas associadas à comunidade passaram a ser referidas como *CA MRSA* (*Community Associated-MRSA*), enquanto que as relacionadas a hospitais são chamadas *HA MRSA* (*Hospital Associated-MRSA*) (BOYCE, 2003; DELLIT et al., 2004; GWEN et al., 2005).

O relato de *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) isolados de amostras obtidas da cavidade bucal é freqüente (MARTINS et al., 2002; MIAN et al., 2002; HALL, 2003; SMITH et al., 2003), porém o reporte de cepas *MRSA* causa uma grande preocupação de que a cavidade bucal em seus diversos sítios possa ser um reservatório para recolonizações das fossas nasais após a profilaxia com mupirocina (MIAN et al., 2002; SMITH et al., 2003). Estudos com identificação de portadores de *MRSA* em parte posterior da língua foram publicados (SMITH et al., 2003).

A análise conjunta destes dados evidencia a importância da identificação de portadores saudáveis de *MSSA* e *MRSA* (CHAMBERS, 2001; WU et al., 2002; UEMURA et al., 2004; ERDENIZMENLI et al., 2004).

## 2. REVISÃO

---

### 2.1- *Staphylococcus aureus*

As bactérias do gênero *Staphylococcus* são caracterizadas como cocos Gram-positivos, catalase-positivos, imóveis, facultativos e sensíveis à lisostafina. Possuem diversos fatores de virulência (constitutivos ou expressos) que lhes conferem capacidade de rápida colonização e sob condições apropriadas é possível ocorrer sua disseminação através dos diversos tecidos e órgãos do hospedeiro. Dentre seus elementos constitutivos, a cápsula polissacarídica e o ácido teicóico, por exemplo, tem envolvimento nos mecanismos de resistência à opsonização para fagocitose e aderência. Já os fatores expressos são codificados por uma ampla variedade de genes, que pode ser regulada diferentemente dependendo do sinal ambiental, o que permite a adaptação dessa bactéria em ambientes diversos, possibilitando assim, sua invasão, adaptação, sobrevivência e multiplicação não só em diferentes sítios do hospedeiro, mas também em diferentes superfícies (BARON et al., 2001; KONEMAN et al., 2001; MIMS et al., 1999; MURRAY et al., 2003; STUKUS, 1997).

*S. aureus*, também pode produzir um mucopolissacarídeo extracelular amorfo (*slime*), que permite a agregação bacteriana, levando à formação de um verdadeiro biofilme que favorece a colonização dessa bactéria em diversas superfícies não só no hospedeiro, mas também no ambiente externo. Essas colonizações podem favorecer a sua transmissão para o ser humano e para outras áreas. (CHRISTENSEN et al., 1982).

A colonização da pele por essa bactéria ocorre provavelmente por sua capacidade de resistir a altas concentrações de sais e lipídios, bem como por

produzirem proteínas de superfície que se ligam à fibronectina, presente na superfície das células do hospedeiro (FLOCK et al., 1996).

As infecções por estafilococos podem ser didaticamente classificadas com base em dois mecanismos distintos: processo infeccioso agudo e doenças causadas por toxinas. As infecções agudas podem ser localizadas, como pústulas, furúnculos, impetigos ou serem processos mais extensos e graves, como infecção cirúrgica, osteomielite, pneumonia, endocardite, meningite e outros. Ainda podem ser disseminadas, como bacteremia e septicemia. Doenças causadas por toxinas também apresentam amplo espectro de manifestações clínicas, como celulite, síndrome da pele escaldada, síndrome do choque tóxico e intoxicação alimentar (BARON et al., 2001; KONEMAN et al., 2001; MIMS et al., 1999; MURRAY et al., 2003).

## **2.2 - Resistência de *Staphylococcus aureus* aos agentes antimicrobianos $\beta$ -lactâmicos, à mupirocina e à clindamicina**

Os antimicrobianos variam quanto à sua estrutura química e pertencem a grupos diferentes destacando-se, como de grande importância para *S. aureus*, o grupo dos  $\beta$ -lactâmicos. Neste grupo, encontram-se os antimicrobianos representados pelas penicilinas naturais e sintéticas. Os alvos de atuação dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos são enzimas que atuam nas etapas finais da formação da parede celular bacteriana. Essas enzimas, são proteínas de membrana que por se ligarem aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, são chamadas de proteínas de ligação à penicilina (*penicillin binding protein* = *PBP*). A ligação do  $\beta$ -lactâmico, às *PBPs*, impede a formação da camada de peptidoglicano da parede celular, o que parece desencadear a morte bacteriana por um processo ainda desconhecido (WAXMAN &

STROMINGER,1983; TOMASZ et al., 1989; DOMINGUEZ et al., 1997; MARANGONI,1997; MURRAY et al., 2003).

São descritos dois mecanismos principais pelos quais pode ocorrer resistência bacteriana aos  $\beta$ -lactâmicos. Um deles é através da produção de  $\beta$ -lactamases, e o outro é por alteração da proteína alvo de ação da droga (*PBPs*). (LOWY, 2003; HACKBARTH & CHAMBERS, 1993).

As  $\beta$ -lactamases são enzimas responsáveis pelo aparecimento da resistência à penicilina e levaram ao desenvolvimento de penicilinas anti-estafilocócicas, resistentes às  $\beta$ -lactamases, como a oxacilina e a meticilina, que passaram a ser utilizadas no tratamento de infecções estafilocócicas penicilina-resistentes. A síntese de  $\beta$ -lactamase em *S. aureus* é codificada pelo gene plasmidial *blaZ* que é regulado por outros dois genes, um com atividade repressora (*blaI*) e outro com atividade anti-repressora (*blaR1*). Estes genes codificam respectivamente, proteínas repressoras e sinalizadoras da expressão de *blaZ*. (HACKBARTH & CHAMBERS, 1993; LOWY, 2003). Substâncias denominadas inibidores de  $\beta$ -lactamases, como o ácido clavulânico, atuam como inibidores suicidas, ligando-se às  $\beta$ -lactamases e impedindo a destruição dos  $\beta$ -lactâmicos por estas enzimas (MIMS et al., 1999).

O outro mecanismo de resistência dos estafilococos é intrínseco, mediado por cromossomo, não é resultante da ação de  $\beta$ -lactamases e está relacionada com uma *PBP* modificada denominada *PBP2a* ou *PBP2'*. Essa proteína apresenta baixa afinidade de ligação aos  $\beta$ -lactâmicos, inclusive oxacilina e meticilina. A inibição da síntese da parede bacteriana pelo  $\beta$ -lactâmico não ocorre, uma vez que a *PBP2a* pouco se liga ao mesmo e simultaneamente parece funcionar como uma *PBP* substituta na síntese da parede bacteriana (BRAKSTAD & MAELAND, 1997).



A *PBP2a* é produto do gene *mecA*, que é o principal codificador da resistência à meticilina no cromossomo do *S. aureus* (HARTMAM & TOMASZ, 1986; CHAMBERS & HACKBARTH, 1987; BERGER-BÄCHI et al., 1992).

O gene *mecA* está contido no determinante *mec* ou segmento *mec* e a parte central desse segmento (*core*) é composta pelo gene *mecA* e pelos genes *mecR1* e *mecI* que são os genes responsáveis pela regulação do *mecA*. Os genes *mecI* e *mecR1*, tem atividade repressora e anti-repressora, respectivamente, sobre o gene *mecA* (ARCHER et al., 1994). A expressão do gene *mecA* (*PBP2a*) pode gerar na bactéria resistência à oxacilina/meticilina, o que se observa na inativação experimental do gene *mecI* (repressor de *mecA*). A regulação da expressão de resistência ocorre por ligação de um  $\beta$ -lactâmico com a proteína MecR1 (produto de *mecR1* = anti-repressor de *mecA*), que ativada cliva a MecI (produto do gene repressor *mecI*) e permite a transcrição de *mecA* com produção de *PBP2a*. A expressão do gene *mecA* é constitutiva ou induzida por antibiótico  $\beta$ -lactâmico, inclusive oxacilina e meticilina (ARCHER et. al., 1994; LOWY, 2003).

Cepas de *S. aureus* com menor susceptibilidade à meticilina por causa da alta produção de  $\beta$ -lactamase são chamados de *BORSA* (*borderline oxacillin-resistant S. aureus*). Esta resistência parece ser diferente da resistência intrínseca de *MRSA* e no laboratório é difícil distingui-las. Nos estudos de Gerberding et al. (1991) apenas duas das seis cepas *BORSA* isoladas possuíam *PBP2a*. Embora diferentes mecanismos de resistência possam interagir, a resistência *borderline* é considerada primeiramente mediada por plasmídeo e diferente da resistência mediada por cromossomo, como no caso de *MRSA* (GERBERDING et al. 1991).

Se a resistência for independente de *PBP2a*, as infecções podem ser tratadas com oxacilina, meticilina ou com inibidores de  $\beta$ -lactamase associados aos  $\beta$ -lactâmicos, porém as dependentes devem ser tratadas com vancomicina ou

teicoplanina, o que onera o tratamento e favorece a seleção de cepas resistentes a estes antibióticos. Observa-se então a enorme importância da definição laboratorial do mecanismo de resistência envolvido (MIMS et al., 1999; MURRAY et al., 2003).

Alguns genes (*femA*, *femB*, *femC*, *femD* e *femE*), que regulam a síntese e degradação do peptidoglicano podem ter participação indireta na resistência à meticilina/oxacilina em função de diminuição de transcrição ou modificações estruturais de seus produtos que são as proteínas denominadas *Fem* (LABISCHINSKI et al., 1998). A inativação do gene *femA* resulta em diminuição da resistência à meticilina (MAIDHOF et al., 1991).

A mupirocina é um antimicrobiano que atua na inibição da síntese proteica. A resistência à mupirocina, está relacionada com mutação do gene cromossômico *ileS* que codifica a enzima isoleucil RNA-sintetase (IRS), com a qual a mupirocina compete para inibição da síntese proteica. Esta mutação leva à produção de uma enzima modificada de baixa afinidade para mupirocina. Neste caso o nível de resistência tem valores de CIM entre 8 e 256 µg/mL. Algumas cepas possuem um gene *ileS* em um plasmídeo conjugativo (*ileS2*) e o mesmo codifica uma enzima sem afinidade com a mupirocina. Neste caso os níveis de resistência são mais elevados (CIM ≥ 512 µg/mL). Devido à localização plasmidial o gene pode ser transferido para outras bactérias por transconjugação o que representa uma preocupação (YUN et al., 2003).

Os agentes antimicrobianos macrolídeos (eritromicina), lincosaminas (clindamicina) e estreptograminas (quinopristina) são amplamente utilizados no tratamento de infecções estafilocócicas.

A resistência a estas drogas pode ocorrer por mecanismo de efluxo ativo ou por alteração de enzimas ribossômicas. O mecanismo de efluxo ativo é codificado pelo gene *mrsA* que confere resistência a macrolídeos e estreptograminas, mas não

à clindamicina. A resistência por alteração de enzimas ribossômicas ocorre através do gene *erm* (*erythromycin ribosome methylase*) que codifica enzimas que conferem resistência a macrolídeos, estreptograminas e lincosaminas. No caso das lincosaminas esta resistência pode ser induzida ou constitutiva. Estes modelos de resistência são denominadas de *MLS<sub>BI</sub>* (*macrolide lincosamide streptogramin type B inducible resistance*) ou *MLS<sub>BC</sub>* (*macrolide lincosamide streptogramin type B constitutive resistance*) para resistência induzida e constitutiva respectivamente. Enquanto que a resistência constitutiva para lincosamina (clindamicina) pode ser detectada no Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos (TSA), a resistência induzida não é expressa. Este tipo de resistência pode ser identificado por um teste que consiste na utilização de discos padrões de clindamicina e eritromicina em posições adjacentes separados por 15 a 26 mm no TSA. A resistência induzida para clindamicina é verificada por um achatamento ou embotamento da zona de inibição de clindamicina adjacente ao disco de eritromicina dando um formato de letra D para a zona de inibição induzida, motivo pelo qual, este teste é comumente denominado de D-teste (NCCLS, 2004; FERRARO et al., 2005).

### **2.3 - Detecção de resistência de *Staphylococcus aureus* à oxacilina e meticilina**

A detecção da resistência a oxacilina em cepas de *S. aureus* tem sido dificultada devido à variabilidade nas técnicas padronizadas usadas para tal. As cepas resistentes são freqüentemente heterorresistentes aos β-lactâmicos de modo que, duas subpopulações (uma suscetível e outra resistente) coexistem numa mesma cultura. Cada célula na população pode carregar a informação genética para resistência, mas somente uma pequena fração ( $10^{-8}$  a  $10^{-4}$ ) pode realmente expressar o fenótipo resistente sob condições de teste “*in vitro*”. A população resistente geralmente cresce muito mais devagar que a população suscetível e,

portanto, pode não ser detectada quando é feito o teste “*in vitro*”. (MARANGONI, 1997).

O sucesso da detecção das cepas heterorresistentes depende muito da promoção do crescimento das subpopulações resistentes, o que é favorecido por pH neutro, temperaturas mais baixas (30 a 35°C), presença de NaCl (2 a 4%), e possivelmente por incubação prolongada por 48 horas (MURRAY et al., 2003).

Para detecção fenotípica de resistência à meticilina o método de difusão em ágar e discos de oxacilina padronizado por Kirby-Bauer, é rotineiramente empregado, porém o *National Committee for Clinical Laboratory Standards*, 2004 (NCCLS) recomenda a utilização de Ágar Mueller-Hinton suplementado com 2-4 % de NaCl e 6 µg/mL de oxacilina, o “*screening agar*” (SA).

O gene *mecA* pode ser detectado por métodos moleculares, sendo considerada como “padrão ouro” a amplificação de fragmentos deste através da técnica de reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* = PCR) (OLIVEIRA & LENCASTRE, 2002).

Apesar da diferenciação entre cepas hiperprodutoras de β-lactamase e as resistentes à meticilina ser primordial na definição terapêutica, a distinção laboratorial é problemática. As cepas hiperprodutoras (*BORSA*) têm como critério de caracterização a sensibilidade à amoxicilina/ácido clavulânico (inibidor de β-lactamase) com halo maior ou igual a 20 mm, positividade para testes de detecção de produção de β-lactamase, valores de CIM para oxacilina próximos ao ponto de corte (2 µg/mL), ausência de crescimento em SA e sensibilidade à cefoxitina no TSA (NICOLA et al., 2000; NCCLS, 2004).

## 2.4 - Tipagem de microrganismos

Sabe-se, que há suficiente diversidade genética entre as espécies bacterianas para permitir a identificação de diferentes clones. Um clone foi definido como um conjunto de amostras bacterianas geneticamente relacionadas que são indistintas umas das outras por métodos de tipagem molecular, ou amostras tão similares que se presume serem derivadas de um ancestral comum (TENOVER, et al., 1995).

Os métodos de tipagem microbiana podem ser enquadrados em duas grandes categorias: métodos fenotípicos e métodos genotípicos. Os métodos fenotípicos caracterizam os produtos da expressão genética a fim de diferenciar amostras bacterianas. Propriedades como perfis bioquímicos, tipos de bacteriófagos, antígenos presentes na superfície da célula e perfis de suscetibilidade a antimicrobianos são exemplos de propriedades fenotípicas que podem ser determinadas no laboratório. Devido a envolverem expressão genética, todas estas propriedades podem sofrer variações, com base em mudanças nas condições e nas fases do crescimento e de mutação espontânea (TENOVER, 1997).

Os métodos genotípicos baseiam-se na análise da estrutura genética de um organismo e verificação dos polimorfismos nos padrões de restrição do ácido desoxiribonucleico (DNA), de acordo com a clivagem do cromossomo por enzimas de restrição, e a presença ou ausência de DNA extra cromossômico. Os métodos genotípicos são menos sujeitos à variação natural, apesar de poderem ser afetados por: inserções ou deleções de DNA no cromossomo, ganho ou perda de DNA extra cromossômico, ou por mutações ao acaso que podem criar ou eliminar sítios de restrição por endonucleases (TENOVER, 1997).

Os vários métodos utilizados para tipagem de *S. aureus*, porém, não agrupam as amostras da mesma maneira. Alguns estudos têm avaliado e

comparado diferentes métodos de tipagem, e tais estudos mostraram que as características fenotípicas como antibiograma, biotipagem e fagotipagem apresentam uma instabilidade maior do que os resultados das técnicas moleculares.

O sistema de tipagem de *S. aureus* por *Pulsed Field Gel Electrophoresis* ou eletroforese em campo pulsado (*PFGE*) tem sido recomendado por muitos pesquisadores como o método de escolha (TENOVER, 1997; RIBEIRO et al., 2005).

A análise de fragmentos cromossômicos obtidos por restrição é baseada no fato de que os cromossomos não são estáticos e podem sofrer rearranjos e mutações-ponto. Alterações na seqüência de nucleotídeos são refletidas nos padrões de restrição por endonucleases do DNA cromossômico quando os fragmentos são separados em gel de agarose. A eletroforese em campo pulsado (*PFGE*) permite que o DNA genômico total seja separado em um número limitado de fragmentos de restrição com distintas mobilidades eletroforéticas (TENOVER et al., 1995). O *PFGE* tem se demonstrado altamente efetivo em estudos epidemiológicos moleculares de cepas de bactérias e leveduras. Foi proposto um sistema para padronizar a interpretação dos padrões de *PFGE* com relação à determinação da correlação entre cepas. Neste esquema, as amostras bacterianas que geram o mesmo padrão de *PFGE* são consideradas a mesma cepa; amostras bacterianas diferindo em um único evento genético, representado como uma diferença de uma a três bandas, são estreitamente relacionadas; amostras diferindo de quatro a seis bandas, representando duas alterações genéticas independentes, são possivelmente relacionadas e amostras bacterianas contendo seis ou mais bandas diferentes, representativas de três ou mais alterações genéticas, são consideradas não correlacionadas (TENOVER et al., 1995).

## 2.5 - Epidemiologia

A penicilina foi descoberta por Fleming em 1928 e passou a ter aplicação clínica em 1940. A resistência de *S.aureus* à penicilina em foi descrita em 1942. Nas décadas de 1940 e 1950, apesar da penicilina, os *S. aureus* eram os principais causadores das infecções hospitalares. Durante a década de 1950, com o amplo uso dos antibióticos, houve certa negligência nas práticas de assepsia e antisepsia, tornando urgente a necessidade de educação das equipes de saúde dos hospitais (WISE et al., 1989).

Um fato curioso é que, como um dos principais patógenos humanos *S. aureus* é encontrado em um largo espectro de doenças, desde lesões superficiais até severas infecções sistêmicas, principalmente em pacientes imunodeprimidos e no indivíduo sadio esse microrganismo é freqüentemente um comensal das fossas nasais anteriores, pele, axilas e períneo. Quando de sua colonização e subsequente infecção em pacientes hospitalizados, esse microrganismo constitui um elevado risco, principalmente devido à possibilidade de apresentar múltipla resistência aos antibióticos usualmente disponíveis no comércio (BARON et al., 2001; KONEMAN et al., 2001; MIMS et al., 1999; MURRAY et al., 2003).

Poucas semanas após o lançamento da meticilina, que ocorreu em 1961, foi isolada na Inglaterra uma cepa de *S. aureus* resistente à mesma e recebeu a denominação de *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* "MRSA". (JEVONS, 1961). Existem evidências de que esse tipo de resistência já existia antes do uso desse antibiótico  $\beta$ -lactâmico semi-sintético (COOKSON & PHILLIPS, 1990). Tais estirpes não representavam maiores problemas, uma vez que a freqüência de isolamento de mutantes resistentes à meticilina era muito baixa. A partir de 1975, a incidência de *MRSA* na Europa e outros continentes aumentou (INGLIS et al., 1993).

Nos Estados Unidos, no início da década de 1980, 56,0% dos hospitais notificaram presença de *MRSA* e em 1989 era relatado em 97,0% dos hospitais americanos (LAYTON et al., 1995). No final dos anos 1970 já havia sido observada a resistência a outros antibióticos, como aminoglicosídeos, tetraciclina, mupirocina, eritromicina, sulfonamidas, lincomicina e aos metais pesados cádmio e mercúrio (BRUMFITT, et al., 1989). Cepas de *S. aureus* multirresistentes são hoje comuns nos grandes hospitais de todo o mundo, limitando as opções terapêuticas apenas aos antibióticos vancomicina e teicoplanina (BARON et al., 2001; KONEMAN et al., 2001; MIMS et al., 1999; MURRAY et al., 2003). Em algumas situações não há opção terapêutica eficaz (MANRIQUE et al., 1997; BARIE, 1998; LOWY, 2003).

A problemática das infecções por *MRSA* tornou-se ainda mais severa com a emergência de cepas apresentando suscetibilidade diminuída à vancomicina (HIRAMATSU et al., 1997a; HIRAMATSU et al., 1997b; TENOVER et al., 1998). A emergência destas estirpes com sensibilidade diminuída à vancomicina, agravou a preocupação quanto à possibilidade de surgirem cepas resistentes à vancomicina e em 1999 passou-se a investir muito em diversos mecanismos e medidas de controle na tentativa de se evitar o aparecimento destas cepas. Todavia, os altos investimentos financeiros e todos os esforços não conseguiram evitar o problema e em 2002 o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) relatou cepas de *S. aureus* resistentes a este antimicrobiano.

Os *MRSA* começaram a se disseminar em hospitais e são responsáveis por um elevado número de infecções hospitalares, oriundas da transmissão do patógeno horizontalmente, via transmissão direta, através de auto-infecção, quando o microrganismo parte de um sítio do corpo para outro; de transmissão cruzada, quando o microrganismo é transmitido pelos profissionais de saúde ou por pacientes colonizados; e finalmente, através de via indireta, devido a contaminações oriundas



do ambiente, veiculadas pelo uso de cateteres e equipamentos cirúrgicos ou outros equipamentos hospitalares. O constante trânsito de pacientes faz com que uma instituição funcione como reservatório de *MRSA* (COHEN, 1992).

A transmissão *S. aureus* de um paciente a outro ocorre principalmente, através das mãos da equipe de saúde, que se tornam transitoriamente contaminadas após contato direto com pacientes infectados ou colonizados (MATTHEWS & STEWART, 1984; BOYCE, 1992; TAKAHASHI et al., 1997; KONEMAN et al., 2001).

Medidas como isolamentos do paciente com *MRSA* por barreiras são adotadas em muitos lugares, em especial no Canadá. Estudos não verificaram reduções significativas de propagação com o isolamento do paciente de unidades de terapia intensiva se o mesmo é adotado como medida única ou principal. Por outro lado, ressaltam que a higienização das mãos entre um paciente e outro reduz drasticamente estes números (CEPEDA et al., 2005).

Nos Estados Unidos, infecções comunitárias por *MRSA* foram inicialmente relatadas em 1981, pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (apud LAYTON, et al., 1995). Tem-se procurado relacionar uma maior gravidade das infecções com o fenômeno de multirresistência, porém alguns estudos conseguiram apenas estabelecer um aumento da morbi-mortalidade, que parece ser mais atribuída à falta de opções terapêuticas do que à maior virulência dessas cepas (RESENDE & FIGUEIREDO, 1997). Uma vez que os *MRSA* tenham sido detectados em um determinado hospital, tendem a persistir, aumentando progressivamente sua prevalência (HAMILTON & MILLER, 1997; SULLER et al., 1997).

Não há dúvida de que é um problema global e extremamente sério e cada vez mais freqüente em diferentes países. Apesar da multirresistência dos *MRSA*, as cepas sensíveis à meticilina (*MSSA*) continuam mais frequentemente relacionadas a

infecções hospitalares (CHAMBERS & HACKBARTH, 1987/HACKBARTH & CHAMBERS, 1989; RESENDE & FIGUEIREDO, 1997; MIMS et al., 1999; KONEMAN et al., 2001; MURRAY et al., 2003; GRINBAUM et al., 2005).

*MRSA* emergiu na comunidade, causando infecções supurativas da pele e pneumonia necrotizante em pacientes jovens e previamente saudáveis. Os principais fatores de risco identificados para aquisição de *MRSA* fora do ambiente hospitalar incluem residência em casa de repouso, uso de drogas endovenosas, antibioticoterapia prévia e doenças de base tais como doenças cardiovasculares e pulmonares, diabetes melitus, neoplasias e doenças crônicas de pele (ZETOLA et al., 2005).

Alguns autores atribuem esta mudança na epidemiologia das cepas *MRSA* a dois prováveis mecanismos: o movimento das cepas *MRSA* hospitalares para a comunidade e o surgimento de cepas comunitárias resultantes da transferência de material genético de microrganismos resistentes a meticilina para cepas *MSSA* (BUKHARIE et al., 2001).

Algumas características individualizadoras entre cepas *CA MRSA* e cepas de *HA MRSA* passaram a ser observadas. As *CA MRSA* eram isoladas de paciente sem internação hospitalar no ano anterior; apresentavam resistência somente aos  $\beta$ -lactâmicos e/ou eritromicina e sensibilidade à maioria dos antimicrobianos. As Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de oxacilina variavam do ponto de corte ( $2\mu\text{g}/\text{mL}$ ) até  $32\mu\text{g}/\text{mL}$ , enquanto que nas *HA MRSA* os valores eram geralmente  $\geq 32\mu\text{g}/\text{mL}$ . Os padrões de eletroforese em campo pulsado (*PFGE*) de *CA MRSA* diferiam dos padrões locais de *HA MRSA*. A maioria das cepas *CA MRSA* causavam primariamente infecções em pele e tecidos moles ou pneumonia necrotizante por produzirem a leucocidina *Panton-Valentine (PVL)* o que significava possuírem o gene codificador (*lukS-lukF*) (BOYCE, 2003).

Outros estudos demonstraram que genética e epidemiologicamente *CA MRSA* e *HA MRSA* são diferentes e os critérios de diferenciação foram elaborados (Tabela1).

Tabela 1. Comparação entre *HA-MRSA* e *CA-MRSA*

	<b><i>HA-MRSA</i></b>	<b><i>CA-MRSA</i></b>
Contato em serviços de saúde	Sim	Não
Média de idade na infecção	Idosos	Jovens
Infecções de pele e tecidos mole	35%	75%
Resistência a antibióticos	Muitos agentes	Alguns agentes
Gene de resistência	SCC <i>mec</i> Tipo I, II, III, V	SCC <i>mec</i> Tipo IV
Tipos de cepa	USA 100 e 200	USA 300 e 400
Gene para toxina PVL	Raro (5%)	Freqüente (quase 100%)

Fonte: Dellit et al., 2004; Gwen et al., 2005

O *CA MRSA* é definido como uma infecção com *MRSA* em uma pessoa que não tem história prévia de exposição a serviços de saúde como hospitalização, cirurgia, hemodiálise ou outros tipos de serviços semelhantes. É sempre resistente aos  $\beta$ -lactâmicos e frequentemente à eritromicina, mas permanece sensível a vários outros antibióticos. O *HA MRSA* é resistente a todas as classes de antibióticos exceto vancomicina, linezolida, quinopristina, dalfopristina, daptomicina e tigecilina (GWEN et al., 2005).

Apesar de sensíveis a vários antimicrobianos, os *CA MRSA* tendem a representar um grande problema de saúde pública por sua ocorrência na comunidade, onde a terapia com antimicrobiano  $\beta$ -lactâmico é amplamente empregada. O controle de sua transmissão implica em modificações culturais nas condutas terapêuticas ambulatoriais e na atenção populacional às infecções de pele como as espinhas, pois os mesmos tanto causam espinhas como pneumonia necrotizante grave (LOPES, 2005; ZETOLA et al., 2005).

Devido às diversas definições de *CA MRSA* encontradas e o número limitado de estudos populacionais que incluem utilização de métodos moleculares de tipagem, a prevalência de *MRSA* na comunidade varia consideravelmente. No entanto, apesar das dificuldades em relação às definições, essa prevalência parece estar aumentando (ZETOLA et al., 2005). Os três primeiros casos brasileiros de infecção por *MRSA* adquirida na comunidade foram relatados em 2005 por RIBEIRO et al.

O estudo de pacientes da comunidade portadores destas cepas tem se mostrado de grande importância na prevenção de infecção e transmissão. Estratégias com relativo sucesso incluem um maior estado de alerta e detecção precoce (DELLIT et al., 2004; GWEN et al., 2005).

Guias com medidas padrões de descolonização e transmissão de *MRSA* e *MSSA*, foram elaborados e são periodicamente atualizados em versão eletrônica livre no site: [www.doh.wa.gov/Topics/Antibiotics/providers\\_MRSA\\_guidelines.htm](http://www.doh.wa.gov/Topics/Antibiotics/providers_MRSA_guidelines.htm). A última atualização foi em 2006. Nestes guias a profilaxia com mupirocina é padronizada para os portadores com indicação de erradicação, como um dos principais procedimentos (DELLIT et al., 2004; GWEN et al., 2005).

Embora a profilaxia com mupirocina seja recomendada no controle de infecções hospitalares por *S. aureus*, um estudo comparou o emprego de mupirocina

nasal contra placebo, aplicados rotineiramente no pré-operatório de cirurgias eletivas. Foi observada uma redução significativa do número de portadores nasais de *S.aureus*, todavia, a incidência de infecção do sítio cirúrgico não diferiu significativamente nos dois grupos, exceto quando os pacientes já eram portadores nasais. Assim, esta medida só se mostrou efetiva nos portadores nasais (PERL et al., 2002).

Wertheim et al. (2005), verificaram uma redução significativa de portadores de *S. aureus* após uso de mupirocina, no entanto relataram recolonizações de 35% por aquisição de cepas exógenas e de 65% com as mesmas cepas, supostamente a partir de sítios extra-nasais. Evidenciaram a importância de estudar a associação entre cepas nasais e de outros sítios de um mesmo portador.

*S. aureus* tem sido frequentemente isolados de sítios cavidade bucal, como a língua (MARTINS et al., 2002; MIAN et al., 2002; HALL, 2003; SMITH et al., 2003), porém o relato de cepas *MRSA* nestes sítios é preocupante (MIAN et al., 2002; SMITH et al., 2003).

O uso de bochechos com clorexidina 0,12% em pacientes hospitalizados mostrou, em média, 65% de diminuição da incidência de pneumonia hospitalar por *S. aureus*, fortalecendo a suspeita de que a cavidade bucal e seus sítios podem servir como reservatório desta bactéria (HALL, 2003). Publicações concluíram que cepas *MRSA*, faziam parte da microbiota bucal normal de indivíduos saudáveis e assim poderiam servir de fonte de infecção no consultório odontológico. (MYAN et al., 2002).

Num estudo de 5000 amostras de diferentes sítios bucais, *S. aureus* foram isolados em 28,0% das amostras. Dos isolados de parte posterior da língua 4,0% eram *MRSA* e não denotavam evidências de colonizações nasais correlatas. Estudos adicionais com o intuito de verificar colonizações nasais de portadores

linguais foram indicados, sugerindo a língua como um provável sítio extra-nasal para portadores. (SMITH et al., 2003).

É notório que a identificação de portadores de *S. aureus* é um dado importante não só na epidemiologia da doença, mas também nos casos que requeiram intervenções cirúrgicas, procedimentos invasivos ou condutas clínicas que possam alterar a condição de equilíbrio da saúde do indivíduo colonizado e em consequência desencadear doença infecciosa passível de prevenção. Como visto, após a erradicação com mupirocina, podem ocorrer recolonizações a partir de sítios extra-nasais, e há indícios de que a língua possa ser um deles (SMITH et al., 2003; WERTHEIM et al., 2005).

Estudos de portadores com abrangência para *MRSA*, são mais concentrados em hospitais e população correlata, porém na comunidade os portadores não identificados podem servir de fonte de infecção (KONEMAN et al., 2001; MIMS et al., 1999; MURRAY et al., 2003).

### 3 - OBJETIVOS

---

A meta desta pesquisa foi:

- Verificar a incidência de *Staphylococcus aureus* na língua e fossas nasais de pacientes saudáveis da Clínica Integrada da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP;
  
- Nos indivíduos com cepas isoladas nos dois sítios verificar com testes fenotípicos e *PFGE* a possibilidade de associação entre as mesmas;
  
- Verificar a distribuição de cepas nasais e linguais de *MSSA*; *BORSA* e *MRSA*, bem como avaliar os resultados dos métodos fenotípicos de rotina, frente aos resultados de metodologia molecular para *MRSA*;
  
- Verificar a presença de cepas de *Staphylococcus aureus* com resistência *MSL<sub>BI</sub>*;
  
- Realizar novas coletas nos portadores detectados para verificar a incidência de reisolamentos e avaliar a possibilidade de associação entre cepas dos indivíduos com isolamento persistente apenas no sítio lingual.

## 4 - MATERIAL E MÉTODO

---

### 4.1 – Amostra populacional, procedimentos de coleta e identificação de material

Foram colhidas amostras de 100 pacientes com muito baixo grau de relacionamento físico entre si, de diferentes núcleos habitacionais de Araçatuba e cidades adjacentes atendidos na Clínica Integrada da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP. Todos eram maiores de 18 anos e a renda familiar variava entre um e três salários mínimos.

Foram determinados os seguintes critérios de exclusão: diabéticos diagnosticados, portadores de faringite aguda no momento da coleta, relato de uso recente de antibióticos e portadores de doença de base suspeita ou diagnosticada. A coleta foi processada antes do início do atendimento odontológico.

O recrutamento foi voluntário após exposição do projeto ao paciente que deu o seu consentimento em Termo de Consentimento Esclarecido (anexo 2), conforme aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, daquela unidade em conformidade com a Resolução nº 01 de 13/06/98 – CNS (Processo FOA 2004-01112 - anexo 1).

Os pacientes forneceram material de fossa nasal e língua, colhidos com hastes flexíveis estéreis (*swab*) que foram transferidos para tubo com infusão de cérebro e coração (BHI-DIFCO- Detroit, USA).

As amostras colhidas foram identificadas pelo número do *box* , ocupado pelo indivíduo seguido da letra “N” para amostras nasais e “L” para amostras linguais. Em caso de ocuparem o mesmo *box* em diferentes períodos a inicial do nome do primeiro em ordem alfabética foi adicionada ao número do *box* para distinção dos indivíduos (ex: 4 e 4A). Quando o indivíduo não ocupava *box* fixo, a identificação ocorreu através das iniciais de nome e sobrenome (ex: LG). Este critério de



identificação das amostras também foi seguido para a identificação das cepas isoladas.

#### 4.2 – Seqüência de Procedimentos

Após 18 a 24 h de incubação (aerobiose - 35 a 37°C), as amostras foram repicadas para Ágar Sangue de Carneiro a 5% com base *Tryptic Soy Agar* (DIFCO-Detroit,USA) e *Mannitol Salt Agar* (DIFCO-Detroit, USA), para isolamento e identificação de *Staphylococcus aureus*, de acordo com as seguintes características bioquímico-fisiológicas: coloração de Gram; produção da catalase, resistência à polimixina, produção de coagulase livre e ligada, produção de DNase e fermentação do manitol (MACFADIN et al., 2000).

Uma vez identificadas, as cepas foram submetidas ao Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos (TSA), Concentração Inibitória Mínima (CIM) para oxacilina e verificação de produção de urease. A resistência induzida à clindamicina foi avaliada através do D-teste (NCCLS, 2004; MURRAY et al., 2003; MACFADIN et al., 2000).

Após um intervalo de cinco meses foram realizadas novas coletas dentre os portadores inicialmente identificados para verificação dos portadores com reisolamentos. As amostras e cepas foram identificadas com os mesmos critérios das primeiras acrescidas do número 2 (ex: 4N2, 4AL2, LGL2, etc.) e submetidas aos mesmos procedimentos laboratoriais.

Considerou-se *MRSA*, as cepas que cresceram em “*screening agar*”, tiveram CIM de oxacilina > 2µg/mL e demonstraram resistência à oxacilina no TSA. (NCCLS, 2004). Considerou-se *BORSA* as amostras com resistência intermediária à oxacilina no TSA, com CIM de oxacilina entre próximos ao ponto de corte (2µg/mL), sem crescimento em “*screening agar*”, com halo > 20mm para amoxicilina + ácido

clavulânico e verificação de produção de  $\beta$ -lactamase por teste de cefalosporina cromogênica (Nitrocefim-ROCHE-Basel, Switzerland) (NICOLA ET AL., 2000; NCCLS, 2004).

As provas de produção de catalase, coagulase livre e ligada, DNase, urease, fermentação do manitol resistência à polimixina B foram executadas de acordo com o recomendado por: (KONEMAN et al, 2001; MURRAY et al., 2003; MACFADDIN et al., 2000; MIMS et al., 1999).

Os discos empregados foram de procedência CECOM-São Paulo, Brasil e DME-Araçatuba, São Paulo, Brasil. Os meios de Ágar Mueller Hinton, Ágar Cistina Triptona, Ágar Manitol Salgado e Caldo de Infusão de Cérebro e Coração (BHI), os meios para produção de DNase e de urease foram de procedência procedência DIFCO-Detroit, USA.

Nas provas de produção de coagulase foram utilizadas cepas controles de *Staphylococcus aureus* ATCC 12600 (controle positivo) e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990 (controle negativo). Na verificação de produção urease foram utilizados como controles positivo e negativo, cepas de *Proteus* sp. e *Escherichia coli*, respectivamente.

Os procedimentos laboratoriais de confirmação de gene *mecA* por amplificação de fragmento interno de gene *mecA* por *PCR* (Oliveira & Lencastre, 2002), foram realizados no Laboratório de Microbiologia Clínica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia Médica Professor Paulo de Góes, Departamento de Microbiologia Médica- RJ com a colaboração da Dra. Agnes Marie Figueiredo.

Os procedimentos de tipagem molecular por *PFGE* (Tenover, 1997) foram executados no Laboratório Especial de Microbiologia Médica da Universidade Federal de São Paulo - SP. , com a colaboração do Dr. Antônio Carlos Campos Pignatari.

### 4.3 – Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

Cultivos de 18 a 24 h foram submetidos ao Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos frente aos seguintes antimicrobianos: amicacina (30 µg), amoxicilina+ácido clavulânico (20/10µg), ampicilina (10 µg), cefoxitina (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), cloranfenicol (30µg), eritromicina (25 µg), gentamicina (10 µg), oxacilina (1 µg), penicilina G(10U), sulfazotrim (25 µg), teicoplanina (30 µg), tetraciclina (30 µg), vancomicina (20µg) e mupirocina (5 µg). Os discos foram de procedência CECON-São Paulo, Brasil e DME-Araçatuba, São Paulo, Brasil. O teste foi executado em Ágar Mueller Hinton-DIFCO-Detroit, USA, preparado de acordo com as especificações do fabricante, e semeado com inóculo equivalente ao padrão 0,5 de MacFarland ( $10^7$ - $10^8$  microrganismos/mL) . Incubou-se a 35-37°C por 18-24 h para leitura dos halos e utilizou-se cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 como controle, de acordo com o recomendado pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 2004).

### 4.4 – Verificação de resistência à oxacilina através do “screening agar”

Empregou-se Ágar Mueller Hinton-DIFCO-Detroit, USA acrescido de NaCl 4% e 6µg/mL de oxacilina (SIGMA). Preparou-se o inóculo como descrito para Teste de Sensibilidade aos Antibimicrobianos e fez-se a semeadura por ponto ou *spot*, técnica que consiste em tocar a superfície do ágar com *swab* estéril previamente mergulhado no inóculo preparado. As placas foram invertidas, incubadas a 35-37°C em aerobiose por 18-24 h e posteriormente examinadas com lupa e luz transmitida para observar crescimento bacteriano. A presença de uma só colônia é suficiente para confirmar a resistência à oxacilina (NCCLS, 2004).

#### **4.5 – Determinação da concentração inibitória mínima para oxacilina**

A atividade antimicrobiana de um composto pode ser quantificada com base na determinação da concentração mínima do composto capaz de inibir o crescimento de um dado microrganismo, um valor chamado de Concentração Inibitória Mínima (CIM).

Foi empregado o método das diluições sucessivas, e foram preparados tubos de ensaio contendo o Caldo Mueller-Hinton-DIFCO, suplementado com concentrações crescentes de oxacilina-SiGMA e 2% NaCl (NCCLS, 2004). Calculou-se a quantidade necessária do antimicrobiano utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\text{Peso (mg)} = \frac{\text{Volume (mL)} \times \text{Concentração } (\mu\text{g/mL})}{*\text{Potência } (\mu\text{g/mg})}$$

\* = expressa no rótulo

Cada um dos tubos foi inoculado com os microrganismos a ensaiar e a seguir incubados 35-37°C em aerobiose por 18-24 h. Após a incubação, a concentração inibitória mínima foi considerada como a menor concentração de agente antimicrobiano para a qual não se observou crescimento do microrganismo avaliado por turbidez visível (NCCLS, 2004).

#### **4.6 – Detecção de resistência induzida à clindamicina (D-teste)**

O inóculo foi preparado e semeado como no TSA. Os discos de eritromicina (15 µg) e clindamicina (2 µg) foram colocados lateralmente a uma distância entre 15 e 23 mm e incubado por 16-18 h a 35-37° C. Considerou-se o D-teste positivo a presença de qualquer achatamento no halo de clindamicina na zona de confluência dos dois antibióticos (NCCLS-2004).

#### 4.7 - Reação em cadeia da polimerase (*PCR*) para a detecção do gene *mecA*

Os isolados resistentes a oxacilina detectados pelo método de triagem em “*screening agar*” foram submetidos à confirmação do gene *mecA* através da técnica de *PCR multiplex* (OLIVEIRA& LENCASTRE, 2002).

Foram utilizados os seguintes *primers* :

##### *mecA*

*Forward*: MECA P4      5'-TCCAGATTACAACCTTCACCAGG-3'

*Reverse*: MECA P7      5'-CCACTTCATATCTTGTAACG-3'

**Tamanho do produto**: 162 pares de base

##### KDP

*Forward*:      KDP F1      5'-AATCATCTGCCATTGGTGATGC-3'

*Reverse*:      KDP R1      5'-CGAATGAAGTGAAAGAAAGTGG-3'

**Tamanho do produto**: 284 pares de base

##### DCS

*Forward*: DCS F2      5'-CATCCTATGATAGCTTGGTC-3'

*Reverse*: DCS R1      5'-CTAAATCATAGCCATGACCG -3'

**Tamanho do produto**: 342 pares de base

##### 4.7.1. Extração do *DNA* genômico

Para a extração do *DNA* genômico foi utilizado o kit comercial “Genomic Prep Cels and Tissue *DNA* Isolation” (Amersham Pharmacia Biotech, Germany), conforme as instruções do fabricante. O *DNA* extraído foi quantificado espectrofotometricamente no equipamento GeneQuant *RNA/DNA* calculator (Amersham Pharmacia Biotech), empregando-se os comprimentos de onda de 260nm e 280 nm, e foi calculada a relação densidade óptica (D.O. 260/D.O.280) neste mesmo equipamento (SAMBROOK et al., 1989).

#### 4.7.2. Reação de amplificação

Para a reação de amplificação foi utilizada a seguinte mistura de reação: tampão de reação da Taq 1x, 200mM de cada dNTP, 800nM dos *primers* DCS F2, DCS R2, MECA P4, MECA P7; 200nM dos *primers* KDP F1, KDP R1; 1,25U de Taq DNA polimerase (Invitrogen) e aproximadamente 20ng do DNA molde.

A reação de amplificação foi realizada no termociclador GeneAmp PCR System 2400 (Perkin-Elmer), utilizando o seguinte programa: 4 minutos a 94°C, seguido por 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 53°C e 1 minuto a 72°C. O programa terminou com uma extensão adicional de 4 minutos a 72°C. Após, os tubos foram mantidos a 4°C até o momento da eletroforese (OLIVEIRA & LENCASTRE, 2002).

Foram utilizados controles cepas Ilha *mec* tipo IV (amplificação *mec* A +, DCS+ e KDP-) e Ilha *mec* tipo II: (DCS+ e KDP+).

#### 4.7.3 - Eletroforese

Após a reação de amplificação, os produtos de *PCR* foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 0,5X por 1h a 110V. Como padrão de peso molecular foi utilizado um marcador de peso molecular de 100 pares de base (Invitrogen) e cepas com ilha *mec* tipo II (DCS+; KDP+) e com Ilha *mec* tipo IV(DCS+; KDP-). O DNA foi corado em solução aquosa de brometo de etídio 0,5µg/mL e posteriormente observado e fotografado sob transiluminação ultravioleta. (SAMBROOK et al.,1989).

#### 4.8 - Análise do *DNA* cromossômico de *S. aureus* pela técnica de eletroforese em campo pulsado (*PFGE*)

A análise do *DNA* cromossômico baseia-se no princípio que existem sítios de restrição localizados na molécula do *DNA*. Enzimas de restrição reconhecem estes sítios e clivam o *DNA* em fragmentos grandes. O número de fragmentos vai variar de um isolado clínico para outro. Para dissolução da parede celular bacteriana, detergentes apropriados, enzimas líticas e proteinase K são utilizadas.

Na técnica da *PFGE* o *DNA* cromossômico é extraído, digerido com enzimas de restrição, separado por eletroforese em campo pulsado, corado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta (Figura 1).

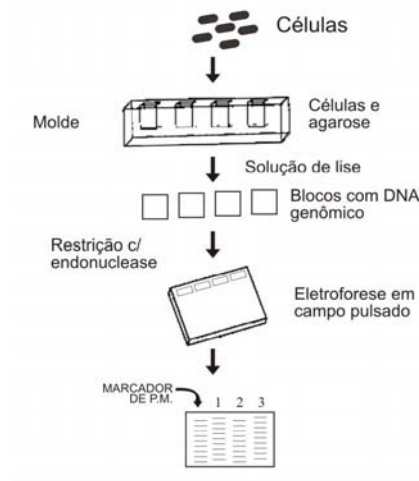


Figura 1 – Ilustração esquemática da técnica de *PFGE*  
Fonte: Swaminathan & Mattar, 1993

##### 4.8.1. Extração do *DNA* genômico

As cepas de *S. aureus* foram semeadas em ágar-sangue de carneiro a 5% (DIFCO-Detroit, USA) e incubadas a 37°C durante 24 horas. Posteriormente foram repicadas em caldo de soja-tripticaseína-DIFCO e incubadas a 37°C por uma noite. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 3.345×g durante 10 minutos.

O sedimento foi resuspenso em 1mL de solução salina estéril e transferido para um tubo de microcentrífuga previamente pesado. Essa suspensão foi centrifugada a 23.100×g durante 15 minutos e o sobrenadante foi descartado. A seguir, o sedimento foi re-suspenso com 1mL de solução salina estéril, centrifugado a 23.100×g durante 15 minutos e o sobrenadante descartado. Esse procedimento foi repetido três vezes. O sedimento foi então pesado e re-suspenso em EDTA 50mM pH8,0, para uma concentração final de 100µg de massa bacteriana por µL. Desta suspensão, 15µL foram transferidos para um tubo de micro-centrífuga contendo 215µL de tampão EC (anexo 3), adicionado de 250µL de agarose a 2% de baixo ponto de fusão (SIGMA) e 20µL de solução de lisostafina (100µg/mL) (SIGMA) (anexo 3). Esta suspensão foi transferida para os moldes, onde permaneceu a 4°C por 30 minutos até que os blocos se solidificassem. A seguir os blocos foram transferidos para uma placa de cultura de 25 orifícios contendo 1mL de tampão EC e incubadas a 37 °C por 5 horas sob agitação suave. Após a incubação os blocos foram lavados com 25mL de tampão CHEF TE (anexo 1) e a seguir incubados com 2mL de tampão ES (anexo 3) adicionado de 100µL de solução de proteinase K (20mg/mL) (GIBCOBRL, LIFE TECHNOLOGIES) (anexo 3), por uma noite à temperatura de 50 °C. Os blocos foram então lavados com 2,5mL de tampão CHEF TE (4 lavagens com incubações de 1 hora cada) e armazenados nesta solução até serem submetidos à digestão enzimática e eletroforese (PFALEER, 1993).

#### **4.8.2. Digestão enzimática**

A digestão do DNA cromossômico foi realizada com a enzima de restrição *Sma*I (CCC↓GGG) (PHARMACIA ), que reconhece de 12 a 20 sítios de restrição e cliva seqüências de nucleotídeos que aparecem poucas vezes ao longo do DNA de *S. aureus* (PREVOST et al., 1992; STRUELENS et al., 1992).



Para o tratamento com enzimas de restrição, um bloco de agarose de cada amostra foi transferido para uma placa de cultura de células de 96 orifícios contendo 300µL de tampão DNS (anexo 3). A seguir, o tampão DNS foi retirado e novamente foram adicionados 300µL de tampão DNS, o bloco foi incubado a temperatura ambiente durante 1 hora. Este processo foi repetido quatro vezes. Após este período, o tampão DNS foi substituído por 200µL de tampão da enzima de restrição e o bloco incubado a temperatura ambiente por 2 horas. Em seguida o tampão foi descartado e então foram adicionados 200µL de tampão da enzima de restrição e 40U da enzima *SmaI*. Os blocos, então, foram incubados por 2 horas a 4°C e a seguir por 15 horas a 30°C (PFALER, 1993).

#### **4.8.3. Eletroforese**

A eletroforese em campo pulsado foi realizada em gel de agarose a 1% (SIGMA) em TBE 0,5× (90mM Tris, 90mM ácido bórico, 2mM EDTA (PHARMACIA]) (SAMBROOK et al., 1989), no equipamento CHEF DRI System (BIO-RAD) com intervalos de tempo de pulso de 1 a 30 segundos por 24 horas, ângulo de 120°, temperatura de 14°C e voltagem de 6,0 volts/cm. Após, os géis foram corados com solução aquosa contendo 0,5µg/mL de brometo de etídio (SIGMA) e fotografados sob transiluminação com luz ultravioleta. Foi utilizado como padrão de peso molecular *Lambda DNA ladder PFG* (BIOLABs), com extensão das bandas de 48,5Kb até 1,0Mb (PFALER, 1993).

---

## 5 - RESULTADOS

---

### 5.1 – Incidência de *S. aureus* e distribuição dos portadores

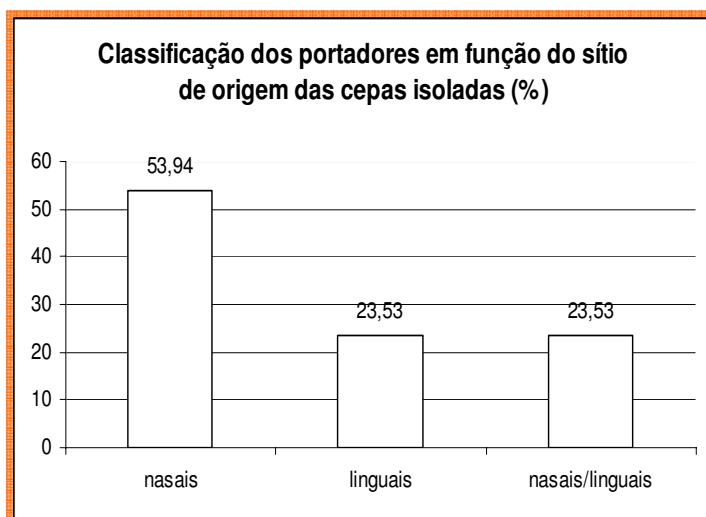
Dos 100 pacientes voluntários foram isoladas 21 cepas de *Staphylococcus aureus* distribuídas em 17 portadores. A incidência foi de: 9% apenas com isolados nasais, 4% apenas isolados linguais e 4% com isolamentos nos dois sítios (Tabela 2).

Tabela 2. Incidência de *S.aureus* entre os pacientes

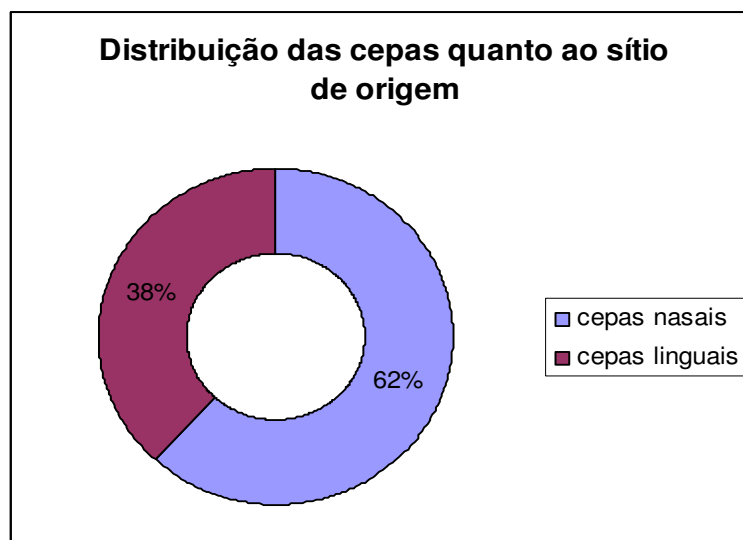
Sítios de Isolamento		Incidência (%)
nasal	língual	n=100
(+)	(-)	9
(-)	(+)	4
(+)	(+)	4
(-)	(-)	83

(+)=isolamento positivo;(-)=isolamento negativo

Dentre os que albergavam *S. aureus* 9 (53,94%) eram portadores nasais, 4 (23,53%) portadores linguais e 4 (23,53%) portadores nasais e linguais (figura 2). Do total de 21 cepas isoladas, 13 (61,9%) foram de origem nasal e 8 (38,1%) de origem lingual (Figura 3).



**Figura 2 – Distribuição dos portadores em função do sítio de origem das cepas isoladas**



**Figura 3 - Distribuição das cepas quanto ao sítio de origem**

## 5.2 - Perfil de sensibilidade antimicrobiana observado no Teste de sensibilidade aos antimicrobianos – Concentração inibitória mínima para oxacilina - Crescimento em “*screening agar*” - Verificação de cepas *MRSA* e *BORSA*

Os padrões de sensibilidade/resistência das 21 cepas de *S. aureus* isoladas, de 17 portadores acrescidos de suas Concentrações Inibitórias Mínimas para oxacilina, resultado de crescimento “*screening agar*” e produção de  $\beta$ -lactamase estão representados na Tabela 3.

Todos os *S. aureus* isolados revelaram halo maior que 20 mm para amoxicilina+ácido clavulânico e foram sensíveis à mupirocina, amicacina, cloranfenicol, gentamicina, sulfazotrim, tetraciclina, ciprofloxacina, teicoplanina, ceftriaxona, cefoxitina e vancomicina.

Das 21 cepas isoladas apenas uma (4,9%), a 24N, foi sensível a todos os antimicrobianos inclusive penicilina e não foi considerada produtora de  $\beta$ -lactamase. Cinco cepas (37N; LCN; CNN; 36L; 38L), foram resistentes à penicilina/ampicilina e sensíveis aos demais antimicrobianos. As demais (71,5%) foram resistentes à penicilina/ampicilina e eritromicina (Tabela 3).

Uma cepa nasal (5N) foi considerada *MRSA* (CIM = 8 $\mu$ g/mL de oxacilina, crescimento em SA e resistente à oxacilina no TSA (Tabela 3; Figura 4).

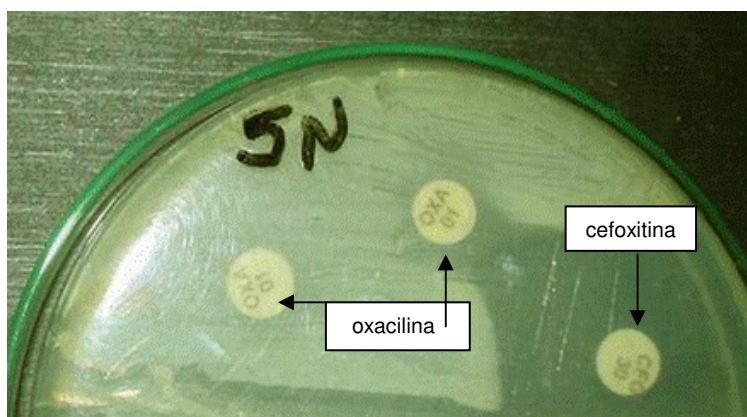
Outra cepa nasal (4AN) foi considerada *BORSA* (CIM = 2  $\mu$ g/mL de oxacilina, halo > 20 mm à amoxicilina+ácido clavulânico, produção de  $\beta$ -lactamase no teste da cefalosporina cromogênica e resistência Intermediária à oxacilina no TSA). Esta revelou comportamento adverso da pareada lingual (4AL) que foi sensível à oxacilina com CIM = 0,2  $\mu$ g/mL, demonstrando que pertencem a diferentes clones.

Do total de 21 cepas, 19 (90,5%) foram consideradas *MSSA*. (Tabela 3).

**Tabela 3- Resultados de teste de sensibilidade aos antimicrobianos; CIM; crescimento em SA e produção de  $\beta$ -Lactamase**

ANTIMICROBIANOS										
CEPAS	G1	PEN	AMP	ERI	CLI	CFO	OXA	CIM	SA	$\beta$ -L
24N	S	S	S	S	S	S	S	$\leq 0,1$	não	-
37N	S	R	R	S	S	S	S	$\leq 0,1$	não	+
LCN	S	R	R	S	S	S	S	$\leq 0,1$	não	+
CNN	S	R	R	S	S	S	S	$\leq 0,1$	não	+
36L	S	R	R	S	S	S	S	$\leq 0,1$	não	+
38L	S	R	R	S	S	S	S	$\leq 0,1$	não	+
4N	S	R	R	R	S	S	S	$\leq 0,1$	não	+
4L	S	R	R	R	S	S	S	$\leq 0,1$	não	+
19N	S	R	R	R	S	S	S	$\leq 0,1$	não	+
19L	S	R	R	R	S	S	S	$\leq 0,1$	não	+
1N	S	R	R	R	S	S	S	$\leq 0,1$	não	+
7N	S	R	R	R	S	S	S	0,1	não	+
21N	S	R	R	R	S	S	S	0,2	não	+
40L	S	R	R	R	S	S	S	0,2	não	+
4AL	S	R	R	R	S	S	S	0,2	não	+
4AN	S	R	R	R	S	S	I	2	não	+
5N	S	R	R	R	S	S	R	8	sim	+
LGL	S	R	R	R	S*	S	S	0,2	não	+
32N	S	R	R	R	S*	S	S	$\leq 0,1$	não	+
8N	S	R	R	R	S*	S	S	0,2	não	+
8L	S	R	R	R	S*	S	S	0,2	não	+

**Legenda:** N=isolado nasal; L=isolado lingual; R=Resistente; S=sensível; **G1**=amicacina (30 $\mu$ g); amoxicilina+acido clavulânico(20/10 $\mu$ g), ciprofloxacina(5 $\mu$ g); cloranfenicol(30 $\mu$ g), gentamicina(10 $\mu$ g); sulgatzotrim; (25 $\mu$ g), tetraciclina(30 $\mu$ g), vanco-micina(20 $\mu$ g); **PEN**= penicilinaG (10u); **AMP**=ampicilina(10 $\mu$ g), **ERI**=eritromicina(25 $\mu$ g), **CLI**=clindamicina (2 $\mu$ g); **OXA**=oxacilina (1 $\mu$ g); **CFO**=cefoxitina(30 $\mu$ g); **CIM**=Concentração Inibitória Mínima para OXA ( $\mu$ g/mL); **SA**=crescimento em "Screening Agar";  **$\beta$ -L**= produção de  $\beta$ -lactamase (+)=produção, (-)=não produção; \* = cepas sensíveis à clindamicina no TSA e resistentes na indução por D-Teste



**Figura 4 - Cepa 5N (MRSA) resistente à oxacilina e sensível à cefoxitina no TSA**

### 5.3 – Verificação de resistência induzida à clindamicina ( $MLS_{Bi}$ ) por D-teste

Os resultados do TSA não revelaram cepas com resistência constitutiva à clindamicina ( $MSL_{BC}$ ), ou seja, todas foram sensíveis.

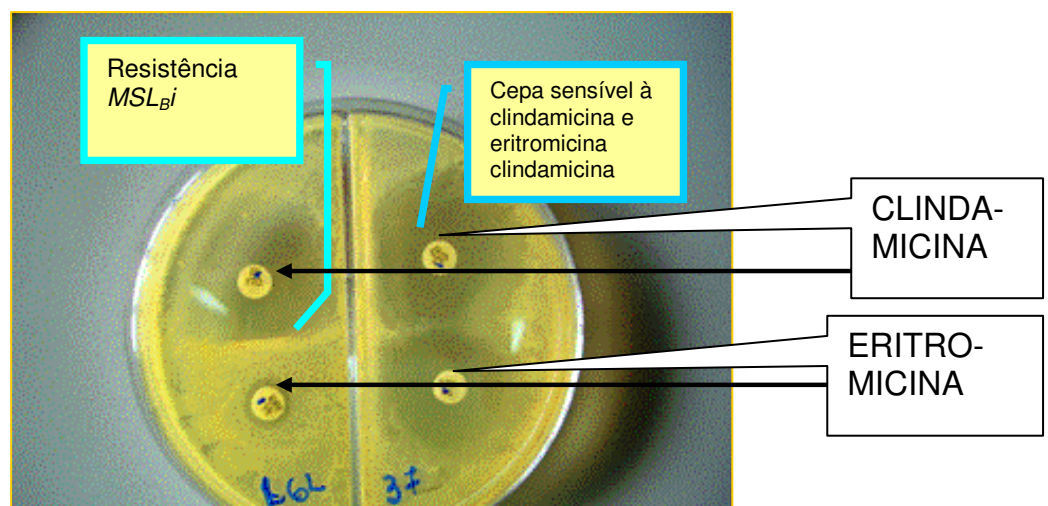
Conforme resultados obtidos pelo D-teste, dos 100 indivíduos avaliados, 3% (4 cepas) foram considerados portadores de *S. aureus* com resistência induzida à clindamicina ( $MSL_{Bi}$ ). Duas cepas eram de diferentes indivíduos (LGL, 32N) e de origem lingual e nasal respectivamente. As outras duas eram de um mesmo paciente (8N, 8L), porém isoladas nos dois sítios (Tabela 4, Figuras 5 e 6).

Considerando o total de 21 cepas, 4 (19%) apresentavam resistência do tipo induzida ( $MSL_{Bi}$ ), conforme Tabela 5 e Figura 7.

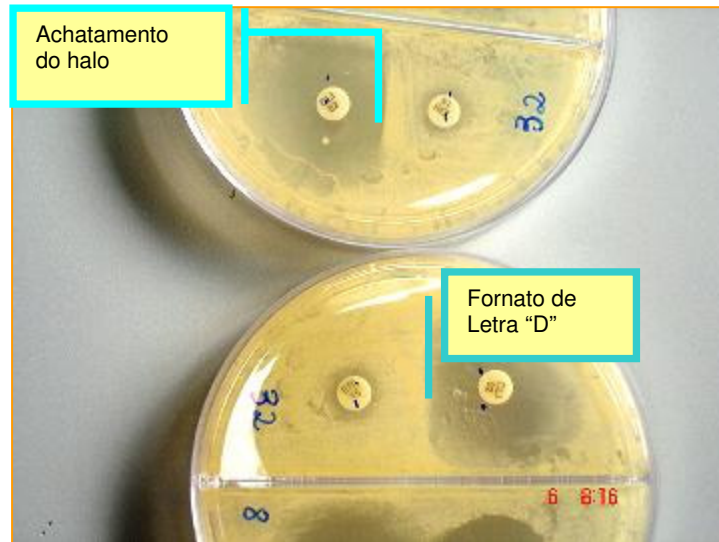
**Tabela 4. Incidência de *S.aureus*  $MSL_{Bi}$  dentre os portadores**

Sítios de Isolamento		Incidência (%)
nasal	língual	n=100
(+)	(-)	1
(-)	(+)	1
(+)	(+)	1
(-)	(-)	97

(+)=ipresença;(-)=ausência



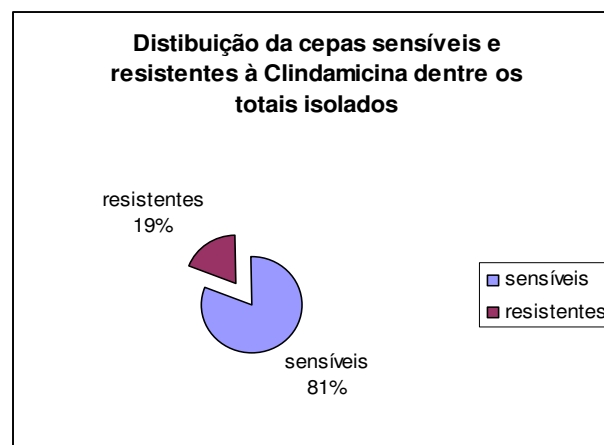
**Figura 5 – Resultados de D-teste apontando cepa com resistência induzida à clindamicina ( $MSL_{Bi}$ ) e controle com cepa sensível .**



**Figura 6-** Resultado de D-teste positivo apontando o achatamento do halo de clindamicina na junção de sua difusão com eritromicina e o aspecto de letra “D”.

**Tabela 5. Incidência de *S.aureus MSL<sub>BI</sub>* dentre as cepas isoladas**

Sítios de Isolamento	Incidência (%) n = 21
nasal	(2) 9,5
lingual	(2) 9,5
<b>TOTAL</b>	<b>(4)19</b>



**Figura 7 –** Distribuição de cepas sensíveis à clindamicina e com resistência *MSL<sub>BI</sub>*

#### 5.4 – Verificação de associação entre cepas com métodos fenotípicos

A verificação fenotípica da associação entre as cepas nasal e lingual de um mesmo portador, dentre os quatro nesta condição (4A, 4, 8 e 19), foi excluída para o paciente 4A, uma vez que as cepas lingual e a nasal eram respectivamente sensível e de sensibilidade intermediária à oxacilina, bem como as CIMs eram distintas (0,2 e 2,0 µg/mL de oxacilina). Para os demais (4; 8 e 19), apesar dos resultados equivalentes, não foi possível excluir a associação com os testes empregados. Para o paciente 8, a possibilidade de associação foi reforçada em função do resultado de D-Teste e produção de urease positivos nos dois isolados (Tabela 6).

**Tabela 6 - Comparação entre cepas pareadas (dois sítios)**

Nº <sup>(1)</sup>	Cepas	fenótipos			
		OX <sup>(2)</sup>	D-teste <sup>(3)</sup>	Urease <sup>(4)</sup>	CIM(µg/mL)
1	4AN	I	-	+	2
	4AL	S	-	-	0,2
2	4N	S	-	-	≤0,1
	4L	S	-	-	≤0,1
3	19N	S	-	+	0,1
	19L	S	-	+	0,1
4	8N	S	+	+	0,2
	8L	S	+	+	0,2

**Legenda:**(1)Cada indivíduo forneceu uma cepa nasal(N) e uma lingual(L);(2):Oxacilina (S= sensível,I=intermediário);(3)+,positivo, -,negativo;(4),+,produção;- ,não produção; CIM = Concentração Inibitória Mínima (oxacilina)

As cepas nasais e linguais dos pacientes sem exclusão de associação através dos métodos fenotípicos empregados (4, 8 e 19) foram submetidas à *PFGE*.

#### 5.5 – Verificação do índice de portadores com reisolamentos após a segunda coleta e sua distribuição por sítio

Os 17 indivíduos detectados como portadores na coleta inicial foram submetidos à segunda coleta após um intervalo de 5 meses. Em 10 dos indivíduos



(10% da população inicial) foram reisolados *S.aureus* na seguinte distribuição quanto aos sítios: 5% (da população inicial) reisolamentos apenas nasais, 2% (da população inicial) reisolamentos apenas linguais e 3% (da população inicial) com reisolamentos nos dois sítios (Tabela 7).

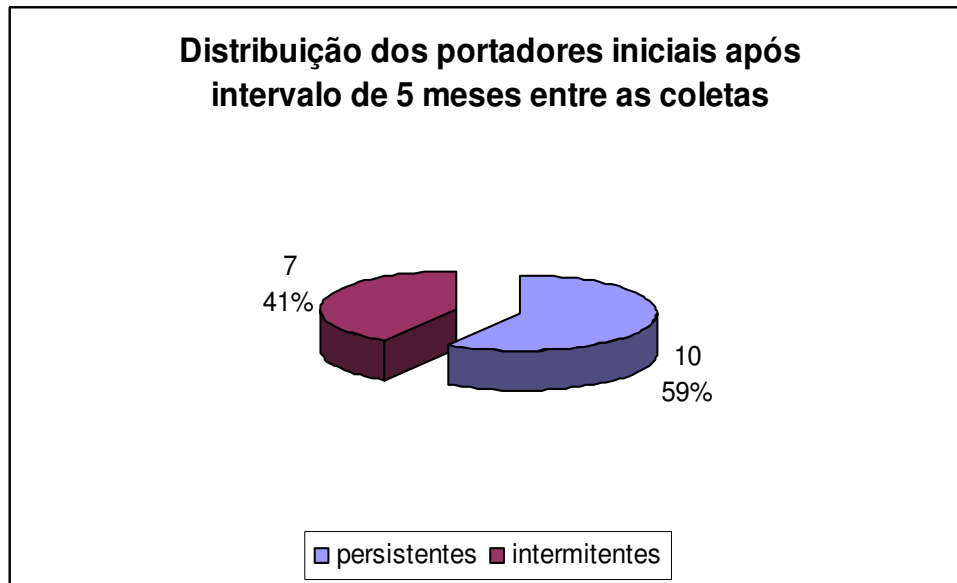
**Tabela 7 - Distribuição dos portadores com reisolamentos após um intervalo de 5 meses entre as coletas**

<b>Coletas</b> <b>Sítios Isolamentos</b>	Incidência Primeira coleta (n=100)	Sem isolamento na segunda coleta (n=17) (portador intermitente)	Com isolamento na segunda coleta (n=17) (portador persistente)
<b>Nasais</b>	9	4	5
<b>Linguais</b>	4	2	2
<b>Nasais e linguais</b>	4	1	3
<b>Total</b>	17 (100%)	7 (41%)	10 (59%)

Dentre os 17 portadores de primeira coleta, 10 (59%) apresentaram reisolamentos e 7 (41%) não apresentaram (Tabela 7 e Figura 8).

Como três indivíduos apresentaram reisolamentos nos dois sítios, o total de cepas reisoladas foi de 13. A cepa de *MRSA* foi reisolada no mesmo indivíduo.

A comparação dos resultados obtidos nos testes fenotípicos realizados em isolados de primeira e segunda coleta revelou os resultados constantes na tabela 8.



**Figura 8 - Distribuição dos portadores após 5 meses de intervalo entre as coletas**

**Tabela 8 – Comparação fenotípica entre cepas dos dois isolamentos**

Cepas	fenótipos		
	OX <sup>(2)</sup>	D-teste <sup>(3)</sup>	Urease <sup>(4)</sup>
5N	R	-	+
5N2	R	-	+
7N	S	-	-
7N2	S	-	-
32N	S	+	-
32N2	S	+	-
21N	S	-	-
21N2	S	-	-
1N	S	-	+
1N2	S	-	+
40L	S	-	-
40L2	S	-	-
LGL	S	+	+
LGL2	S	+	+
4N	S	-	-
4N2	S	-	-
4L	S	-	-
4L2	S	-	-
8N	S	+	+
8N2	S	+	+
8L	S	+	+
8L2	S	+	+
19N	S	-	+
19N2	S	-	+
19L	S	-	+
19L2	S	-	+

**Legenda:** Cada sítio (N= nasal, L=lingual) forneceu duas cepas; 1 (primeira coleta) e 2 (segunda coleta)  
<sup>(2)</sup>:OX = resultados para oxacilina no TSA (S=sensível, R= resistente); <sup>(3)</sup> resultados de D-Teste (+,positivo; - =negativo); <sup>(4)</sup> produção de urease (+ =produção; - = não produção)

Foram detectados dois portadores com isolamentos consecutivos apenas no sítio lingual (40 e LG). Os testes fenotípicos não excluíram associação clonal entre cepas e foram submetidos à *PFGE*.

### **5.6 – Resultados da avaliação de associação clonal das amostras bacterianas pela técnica de eletroforese em campo pulsado – *PFGE***

Uma vez que a exclusão de associação clonal entre as cepas dos portadores com isolamento consecutivo apenas no sítio lingual não foi possível com os métodos fenotípicos, as mesmas (LGL e LGL2; 40L e 40L2), foram submetidas à *PFGE*.

A verificação de associação entre cepas isoladas na mesma data e nos dois sítios de um mesmo indivíduo, realizada com testes fenotípicos foi excluída para o portador 4A, porém não foi possível para as cepas dos indivíduos 4, 8 e 19. As cepas nasais e linguais destes indivíduos (4N e 4L; 8N e 8L; 19N e 19L) foram submetidas à *PFGE* para verificação de associação.

A técnica de *PFGE* foi realizada para dez amostras. Quatro para verificação de portador persistente do mesmo clone apenas no sítio lingual (LGL e LGL2; 40L e 40L2) e seis para verificação de associação clonal entre cepas isoladas de um mesmo portador nos dois sítios e na mesma data (4N e 4L; 8N e 8L; 19N e 19L).

Foram encontrados seis padrões diferentes de *PFGE* entre as 10 amostras de *S. aureus* analisadas (Tabela 9 e Figuras 9, 10, 11, 12, 13, 14 e 15).

Os padrões de *PFGE* “A” e “B” foram encontrados em duas amostras isoladas do mesmo paciente (LG) em datas diferentes o que indica pertencerem a diferentes clones (Tabela 9, Figuras 9,10 e 11).

Cada um dos padrões “C” , “D” , “E” e “F” foi encontrado em duas amostras isoladas em datas (40L) ou sítios (4; 8; 19) diferentes de um mesmo

indivíduo, ou seja, cada padrão foi encontrado em uma dupla de amostras provenientes do mesmo portador (Tabela 9, Figuras 9, 10, 12, 13, 14 e 15). Estes resultados inferem que as cepas com o mesmo padrão de *PFGE* pertencem a um mesmo clone e podem ter se originado de uma fonte comum de contaminação.

Tabela 9 - Resultado da tipagem molecular pela técnica de *PFGE* de dez amostras de *S. aureus* sensíveis à oxacilina

Iniciais do Paciente	N° da Amostra	Sítio de Isolamento	Data de Isolamento	Padrão de PFGE
L.G.L.	LGL	Lingual	24/11/05	A
L.G.L.	LGL2	Lingual	05/04/06	B
C.P.S.	40L	Lingual	16/11/05	C
C.P.S.	40L2	Lingual	05/04/06	C
A.K.C.	4N	Nasal	23/11/05	D
A.K.C.	4L	Lingual	23/11/05	D
M.C.A.	8N	Nasal	10/11/05	E
M.C.A.	8L	Lingual	10/11/05	E
N.M.A.	19N	Nasal	24/11/05	F
N.M.A.	19L	Lingual	24/11/05	F

clones diferentes

mesmos clones

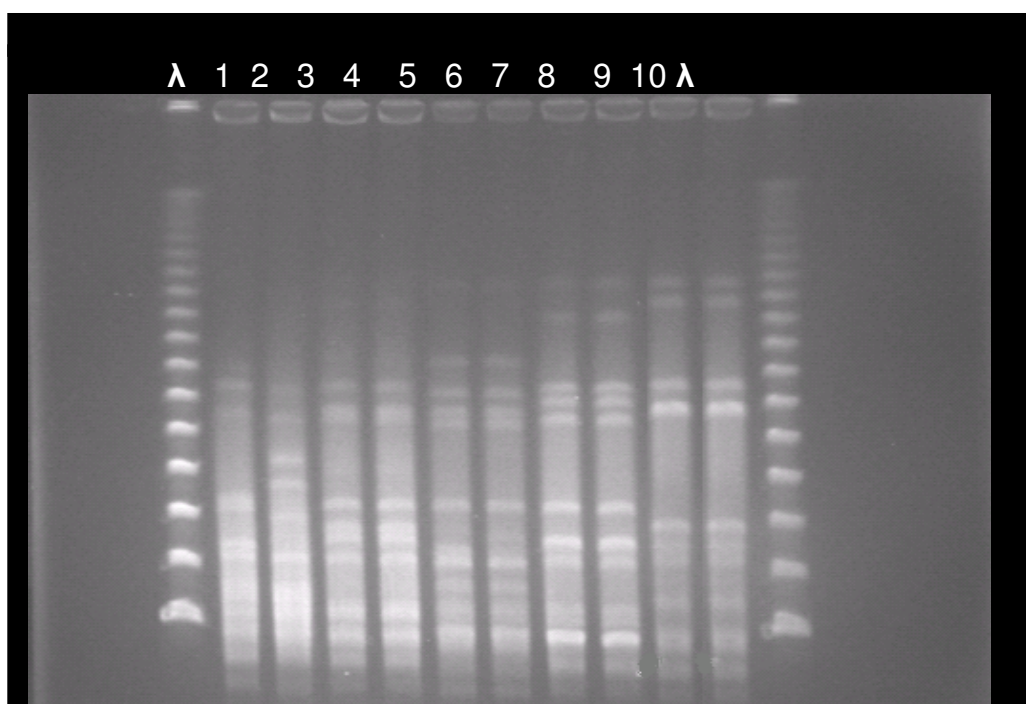


Figura 9 - Resultados de *PFGE* conforme identificados na Tabela 9

\*Os padrões de *PFGE* são designadas com a letra maiúscula (A até F).

Subtipos, isto é amostras com padrões semelhantes, mas não idênticos, são designados com a mesma letra maiúscula, porém com número arábico após (A1, A2, A3 etc). Padrão de peso molecular ( $\lambda$ ) – Lambda ladder 48.5 Kb

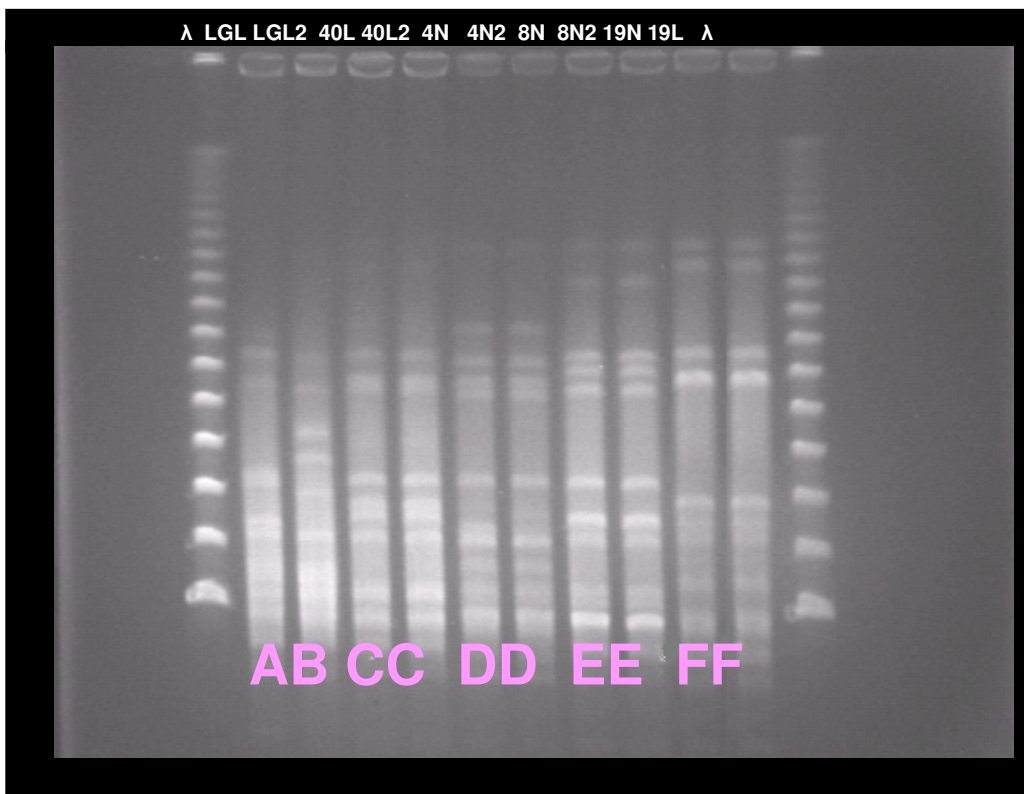


Figura 10 - Resultados de *PFGE* com as cepas correspondentes e identificação dos padrões (A, B, C, D, E e F).

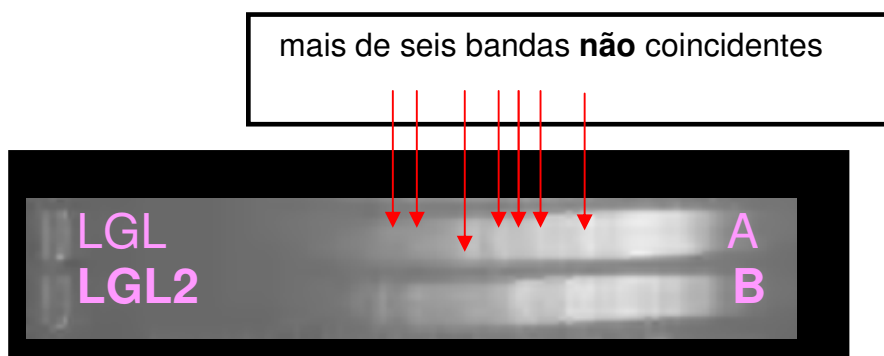


Figura 11 - Resultados de *PFGE* para comparação entre cepas isoladas do sítio lingual de portador persistente com 5 meses de intervalo entre as coletas (A e B = diferentes).

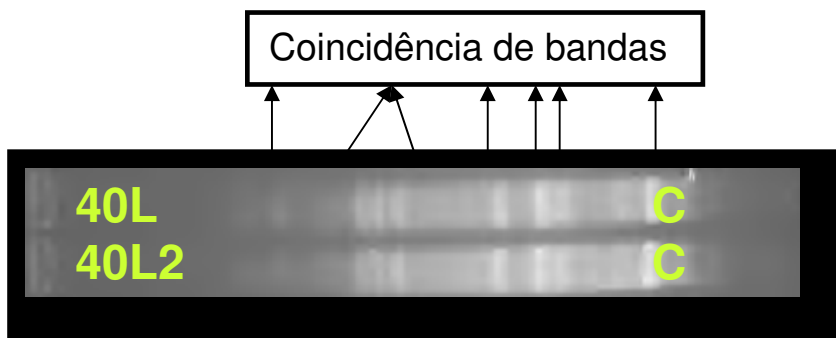


Figura 12 - Resultados de *PFGE* para comparação entre cepas isoladas do sítio lingual de portador persistente com intervalo de 5 meses entre as coletas (C e C = mesmos padrões = mesmos clones).

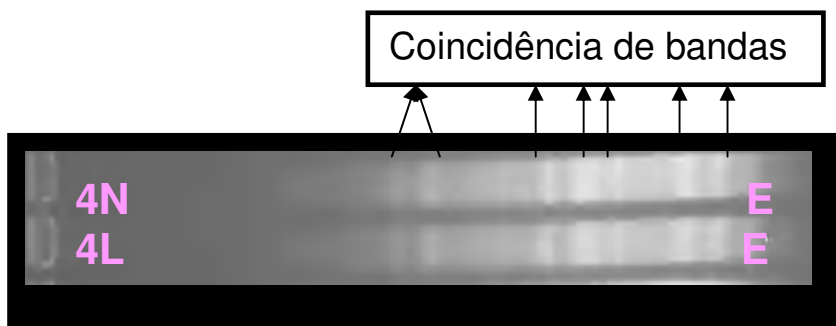


Figura 13 - Resultados de *PFGE* para comparação entre cepas isoladas de sítio nasal e lingual do portador 4 na mesma data (E e E = mesmos padrões = mesmos clones).

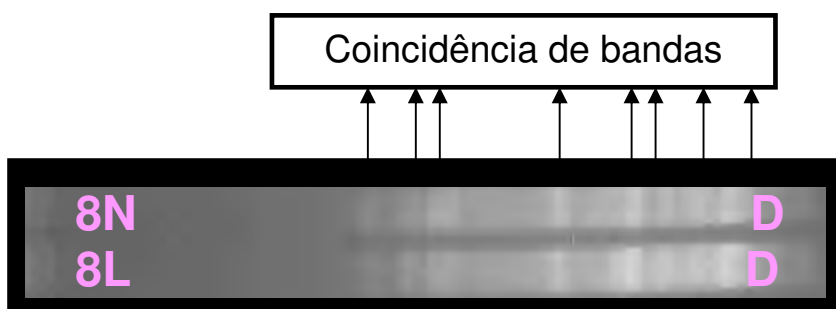


Figura 14 - Resultados de *PFGE* para comparação entre cepas isoladas de sítio nasal e lingual do portador 8 na mesma data (E e E = mesmos padrões = mesmos clones).

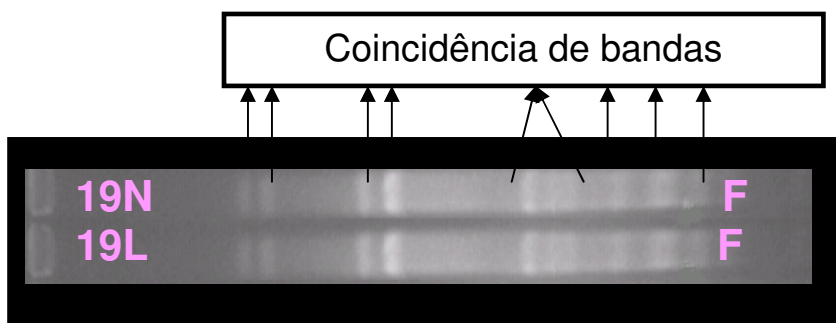


Figura 15 - Resultados de *PFGE* para comparação entre cepas isoladas de sítio nasal e lingual do portador 19 na mesma data (F e F = mesmos padrões = mesmos clones)

### 5.7 – Resultado de PCR para pesquisa de gene *mecA*

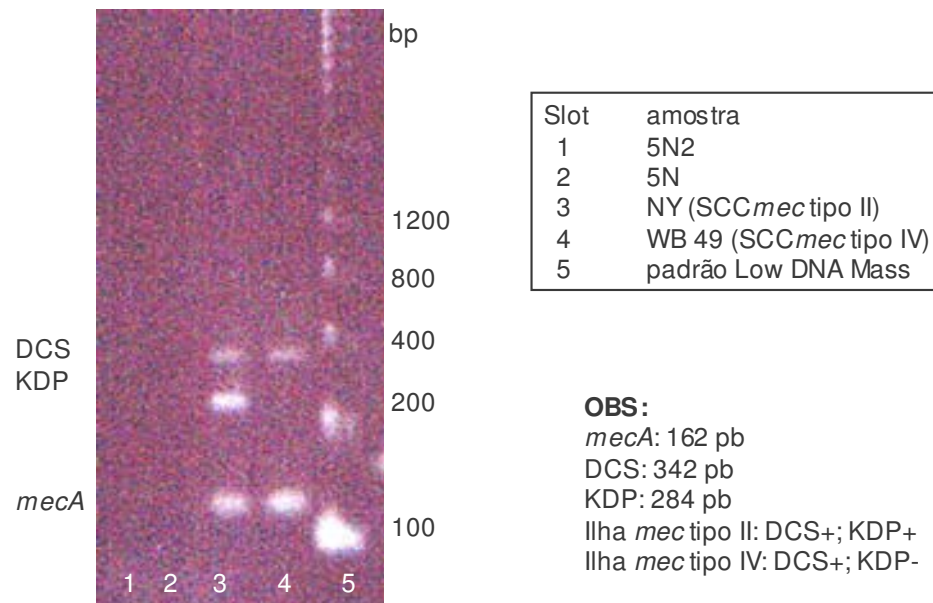
O indivíduo portador da cepa sugerida como *MRSA* (5N) foi considerado portador nasal persistente após a segunda coleta e a segunda cepa isolada (5N2) apresentava resultados fenotípicos pareados à primeira (5N), como mostra a Figura 16.



Figura 16 - Cepas (5N e 5N2) resistentes à oxacilina e sensíveis à cefoxitina obtidas de isolados nasais de um mesmo indivíduo com 5 meses de intervalo entre as coletas

As cepas fenotipicamente caracterizadas como *MRSA* possuem enquadramento fenotípico de *CA MRSA*: paciente saudável, sem fatores de risco, cepa com CIM para oxacilina de 8µg/mL (entre 2 e 32 µg/mL); resistente à oxacilina no TSA e sensível aos outros antimicrobianos testados, exceto eritromicina e crescimento em “*screening agar*”.

O resultado da pesquisa do gene *mecA* nas duas amostras identificadas como *MRSA* pelos critérios fenotípicos foi negativo (Figura 17).



**Figura 17 - Resultado de PCR para pesquisa gene *mecA* nas duas amostras (5N e 5N2) isoladas do sítio nasal do mesmo indivíduo em duas coletas distintas com intervalo de 5 meses**

Apesar do enquadramento fenotípico desta cepa nos critérios para *MRSA*, do tipo *CA MRSA*, a mesma não apresenta o gene *mecA*, o que descarta o mecanismo de resistência por produção de *PBP* modificada, já que o gene *mecA* é o principal codificador deste tipo de resistência.



## 6 - DISCUSSÃO

---

Dos 100 pacientes saudáveis foram identificados 17% de portadores de *Staphylococcus aureus* no isolamento inicial. Estes dados são comparáveis aos 17,8% obtidos em estudo de ZENSHI et al (2002) com indivíduos adultos saudáveis.

A interpretação comparativa dos resultados obtidos com estudos publicados foi equivalente para portadores nasais de *MSSA* (9,0 e 9,4% respectivamente) (ERDENIZMENLI et al., 2004; UEMURA et al., 2004).

Com relação ao isolamento de *MRSA*, em publicação com diferenciação específica para o sítio lingual (SMITH et al., 2003) verificaram 4% de portadores de *MRSA* neste sítio sem evidência de colonização nasal. Este dado não foi coincidente para a amostra examinada. A justificativa para esta diferença pode ser encontrada na faixa etária estudada. Estudo de portadores de *MRSA* efetuados em dois grupos divididos por faixa etária (adultos e crianças), revelou resultados considerados estatisticamente significantes. (UEMURA et al., 2004). No presente estudo, o critério de inclusão pertinente a maiores de 18 anos refinou o perfil da população e excluiu crianças. (ERDENIZMENLI et al., 2004; UEMURA et al., 2004).

No que tange aos *MRSA* e sua disseminação na comunidade deve-se levar em conta os critérios de diferenciação entre *CA MRSA* e *HA MRSA*, já que os isolados obtidos enquadram-se na classificação fenotípica sugerida para *CA MRSA*, ou seja, paciente sem internação hospitalar no ano anterior, cepa resistente à oxacilina e eritromicina e sensível à maioria dos antimicrobianos, CIM de oxacilina de 8µg/mL (entre 2 e 32µg/mL) e crescimento em “*screening agar*” (BOYCE, 2003). Contudo, os resultados obtidos com teste genotípico (*PCR*) para pesquisa do gene *mecA*, foram negativos. Isto infere que estas cepas não possuem resistência por expressão de *PBP* alterada de codificação pelo gene *mecA*. A sensibilidade destas

cepas à amoxicilina + ácido clavulânico, produção de  $\beta$ -lactamase, leva a pensar que seriam hiperprodutoras de  $\beta$ -lactamases (*BORSA*), todavia, CIM de oxacilina de 8 $\mu$ g/mL e crescimento em “*screening agar*” não são comuns neste tipo de resistência.

Cumprido ressaltar que apesar dos resultados de CIM de oxacilina (8 $\mu$ g/mL), crescimento em “*screening agar*” e resistência à oxacilina no TSA, estas cepas foram sensíveis à cefoxitina, que foi recomendada pelo NCCLS em 2004 como melhor indutor na verificação de expressão de *PBP2a*. As cepas de *S. aureus* resistentes à cefoxitina devem ser relatadas como *MRSA*. Dentre os testes fenotípicos empregados a sensibilidade à cefoxitina foi o único a não prever as cepas isoladas como *MRSA*.

A complexidade dos mecanismos de resistência utilizados por *S. aureus*, infere que estudos adicionais seriam necessários para verificar os reais processos envolvidos na resistência destas cepas. O resultado surpreendente negativo para gene *mecA* em cepas fenotipicamente enquadradas como *CA MRSA* demonstram que estes critérios fenotípicos devem ser avaliados com precaução e talvez estudos complementares, em especial com utilização de cefoxitina, poderiam auxiliar a classificação, já que os métodos moleculares são inviáveis para laboratórios clínicos e para a grande maioria dos hospitais.

Há que se ressaltar que os erros de interpretação interferem na conduta terapêutica, pois, as cepas *BORSA* são tratadas com  $\beta$ -lactâmicos associados a inibidor de  $\beta$ -lactamase, enquanto as *MRSA* têm a vancomicina como terapia indicada.

Considerando que os *CA MRSA* são causadores de pneumonia necrotizante de rápida evolução e que na terapia empírica de pneumonia em pacientes

ambulatoriais os  $\beta$ -lactâmicos são amplamente empregados, a rápida e correta classificação é fundamental para a conduta terapêutica adequada.

Com relação à prevenção e controle de infecção por *S.aureus*, muitos estudos ainda são necessários para determinar os melhores métodos. Estratégias incluem um maior estado de alerta na detecção de portadores e aplicação dos guias propostos (DELLIT et al., 2004; GWEN et al., 2005).

Sugere-se que a atenção direta somente para o vestíbulo nasal possa ser a razão da dificuldade de controle das infecções principalmente as hospitalares de cirurgia eletiva passíveis de prevenção, visto que as recolonizações a partir de sítios extra-nasais após profilaxia com mupirocina foram estudadas e relatadas (WERTHEIM et al., 2005).

Os resultados obtidos são concordantes com a literatura no que tange ser a língua um provável sítio extra-nasal de colonização (MARTINS et al., 2002; MIAN et al., 2002; HALL, 2003; SMITH et al., 2003). Dois dos indivíduos foram considerados portadores linguais persistentes sem isolamento nasal. Um deles (LG) foi considerado portador persistente de diferentes clones de *S. aureus*, porém, o outro (40) foi considerado portador persistente do mesmo clone num intervalo de cinco meses entre as coletas. Isto sugere um alerta especial a este sítio no controle de infecções por *S. aureus*.

Com relação à verificação de associação entre cepas isoladas nos dois sítios de um mesmo indivíduo, sabe-se que classicamente a origem das microbiotas nasal e bucal é de diferentes clones, no entanto, estudos específicos envolvendo o sítio lingual são raros (UEMURA et al., 2004). Dos quatro indivíduos com isolamentos nos dois sítios (4, 4A, 8 e 19), as cepas nasal e lingual do paciente 4A foram respectivamente intermediária e sensível à oxacilina no TSA. Seus CIMs foram de 2 e 0,2 ug/mL de oxacilina respectivamente, o que indica serem diferentes

clones em diferentes sítios de um mesmo indivíduo. Os três outros indivíduos (4, 8 e 19) forneceram cepas de comportamentos semelhantes, e a exclusão de associação não pode ser estabelecida mediante os critérios fenotípicos empregados. Quando submetidas à *PFGE*, os resultados confirmaram a associação clonal entre cepas do sítio nasal e lingual de cada um dos três indivíduos (4N e 4L; 8N e 8L; 19N e 19L). Isto indica que estes indivíduos seriam cada qual portador de determinado clone e manteriam colonização nos dois sítios, provavelmente em estado persistente, já que cepas com as mesmas características fenotípicas das primeiras foram isoladas nos dois sítios dos três indivíduos na segunda coleta. A associação entre as cepas nasais e linguais destes portadores, reforça a idéia já sugerida de que a língua seria um provável sítio para recolonizações após profilaxia com mupirocina.

Com relação aos resultados de resistência induzida à clindamicina por D-Teste, estudos com esta finalidade concluíram que 19 a 20% dos estafilococos *MSSA* possuem este tipo de resistência (ILENDO et al., 2004; STEWARD et al., 2005). O estudo foi compatível com o resultado destes autores.

Vale ressaltar que no laboratório clínico, este dado é relevante, pois cerca de 20% dos *S. aureus* relatados como sensíveis à clindamicina apenas com a realização do TSA, são na verdade resistentes e implicam em falhas terapêuticas. A introdução do D-teste nas rotinas laboratoriais é fácil, não exige sofisticação, tem baixo custo e aumenta em 20% a possibilidade de detecção de resistência à clindamicina o que representa um valor considerável (a cada 5 *MSSA* relatados como sensível no TSA um é resistente).

Portadores persistentes foram detectados em 10% dos indivíduos, dos quais 8% de portadores nasais persistentes, dados compatíveis para população adulta saudável (KONEMAN et al., 2001, SANTOS, 1999). Dos 2 portadores persistentes apenas no sítio lingual, um deles estava colonizado com diferente clone e um com

mesmo clone o que indica que este sítio merece uma atenção especial não só no estudo de portadores, como situações de profilaxia cirúrgica. Sugere-se que estudos adicionais sejam realizados com este direcionamento.

Ainda com relação aos portadores persistentes, vale lembrar que os três indivíduos com colonização nasal e lingual pelos mesmos clones foram portadores persistentes de cepas com resultados fenotípicos semelhantes nos dois sítios.

## 7 – CONCLUSÕES

---

7.1 - Foram identificados 17% de portadores de *Staphylococcus aureus*, dos quais 9% nasais, 4% linguais e 4% nasais/linguais no primeiro isolamento. Três dos quatro portadores com isolamentos nos dois sítios estavam colonizados pelos mesmos clones nos dois sítios.

7.2 - Apenas uma cepa foi sensível à penicilina e não produtora de  $\beta$ -lactamase e 71,5% das cepas foram resistentes à eritromicina.

7.3 - Duas cepas de um mesmo indivíduo, isoladas de fossa nasal com intervalo de 5 meses foram consideradas *MRSA* pelos métodos fenotípicos, porém a verificação do gene *mecA* por PCR foi negativa.

7.4 - Uma cepa foi considerada *BORSA*.

7.5 – Dezenove cepas foram consideradas *MSSA*

7.6 - A verificação de resistência à clindamicina revelou um resultado de 19% para cepas com resistência induzida e não revelou nenhuma cepa com resistência constitutiva.

7.6 – a) Do total de indivíduos analisados 10% foi considerado portador persistente na seguinte distribuição: 5% apenas nasais; 2% apenas linguais e 3% nasais e linguais; b) Dentre os 17% de portadores na primeira coleta, 59% foram portadores persistentes na segunda coleta.

7.7 - Do total de indivíduos analisados 1% foi considerado portador persistente lingual de mesmo clone com intervalo de 5 meses entre as coletas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARCHER, G.L.; NIEMEYER, D.M.; PUCCI, M.J. Dissemination among staphylococci of DNA sequences associated with methicillin resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 38, p. 447-454, 1994.
- BARIE, P. S. Antibiotic-resistant gram-positive cocci: implications for surgical practice. *World J. Surg.*, v. 22, p. 118-126, 1998.
- BARON, S.; FOSTER, T.; WASHINGTON, J. A. et al., *Medical microbiology-on line version*, ch 12 by Foster, T., 2001; MURRAY, 2003 disponível em <http://www.gsbs.utmb.edu/microbook/ch012.htm> acesso em: 28/12/2006
- BERGER-BÄCHI, B. Expression of resistance to methicillin. *Trends Microbiol.*, v. 10, p. 389-393, 1994.
- BERGER-BÄCHI, B. Genetic basis of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Cell.Mol.Life Sci.*, v. 56, p. 764-770, 1999.
- BERGER-BACHI, B.; STRÄSSLE, A.; GUSTAFSON, J.E. Mapping and characterization of multiple chromosomal factors involved in methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 36, p. 1365, 1992.
- BRAKSTAD, O. G.; MAELAND, J. A. Mechanisms of methicillin resistance in staphylococci. *APMIS.*, v.105, p. 264-276, 1997.
- BOYCE, J.M. Increasing prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the United States. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.*, v. 11, p. 639-642, 1992
- BOYCE J.M. Update on resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Clin. Upd. Infect. Dis.*, v.6, p1-4; 2003.
- BRUMFITT, W.; HAMILTON-MULLER, J. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *N. Engl. J. Med.*, v. 320, p. 1188-1196, 1989.
- BUKHARIE, H.A. ; ABDELHADI, M.S. ; SAEED, I.A. et al. Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a community pathogen. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* v. 40, p. 1-4, 2001.
- CDC. Community-associated MRSA (CA-MRSA) information for clinicians, 2005. disponível em: [http://www.cdc.gov/mcodpd/hip/ARESIST/ca\\_mrsa\\_clinician.htm](http://www.cdc.gov/mcodpd/hip/ARESIST/ca_mrsa_clinician.htm) - acesso em 28/12/2006
- CEPEDA, J.A.; WHITEHOUSE,T.; COOPER,B. et al. Does isolation prevent the spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*? *Lancet*, v. 365, p. 295-304, 2005.
- CHAMBERS, H.F. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? *Emer. Infect. Dis.*, v.7, p. 178-182, 2001.

CHAMBERS, H.F.; HACKBARTH, C.J. Effect of NaCl and nafcillin on penicillin-binding protein 2a and heterogeneous expression of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v 31, p.1982-1988, 1987.

CHRISTENSEN, G. D.; SIMPSON, W. A.; BISNO, A. L.. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infect. Immun.* v. 37, p. 318-326, 1982.

COHEN, M.L. Epidemiology of drug resistance: implications for a post-antimicrobial era. *Science.*, v. 257, p. 1.050-1.055, 1992.

COOKSON, B.; PHILLIPS, I. Methicillin-resistant staphylococci. *J. Appl. Bacteriol.*, v.19, p. 55-70, 1990.

DELLIT T.; DUCHIN, J.; HOFMANN, J. *Interim guidelines for evaluation and management of community associated methicillin resistant Staphylococcus aureus skin and soft tissue infections in outpatient settings*. Infectious Diseases Society of Washington, Tacoma-Pierce County Health Department, Public Health-Seattle and King County. Washington State: Department of Health, 2004. disponível em [http://www.doh.wa.gov/Topics/Antibiotics/providers\\_MRSA\\_guidelines.htm](http://www.doh.wa.gov/Topics/Antibiotics/providers_MRSA_guidelines.htm). último acesso em 28/12/20006

DOMINGUEZ, M. A.; LINARES, J.; MARTIN, R. Molecular mechanisms of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Microbiologia*, v. 13, p. 301-308, 1997.

ERDENIZMENLI, M. ; YAPAR, N. ; SENGER, S. S. et al. *Staphylococcus aureus* in an outpatient population in Turkey. *Jpn. J. Infect. Dis.*, v. 57, p. 21-24, 2004.

FERRARO, M. J.; GLENNEN, A. ; HINDLER J.F. et al. Method for Detection of Inducible Clindamycin Resistance in Staphylococci: a CLSI Collaborative Study. *J. Clin. Microbiol.*, v. 43, p. 2613-2615, 2005.

FLOCK, J.I.; HIENZ, S.A.; HEIMDAHL, A. et al. Reconsideration of the role of fibronectin binding in endocarditis caused by *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* v. 64, p. 1876-1878, 1996.

GERBERDING, J.B. ; MICK, C. ; LIU, H.H. et al. Comparison of conventional susceptibility test with direct detection of penicillin-binding protein 2a in borderline oxacillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *Braz. J. Infect. Dis.* ,v.1, p. 1804, 1991.

GRINBAUM, R. ; SALLES M.J.C.; SERRA, R.A.M. et al. Cpst Minimization analysis: use of linelolid vs vancomycin for MRSA skin and soft tissues infections. *Rev. Panam. Infectol.*, v. 7, p. 16-27, 2005.

GWEN B.; DAVIS, P.; BARRY C.F. Community associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (CA MRSA). Guidelines for clinical management and control of transmission. Wisconsin Division of Public Health; Wisconsin,,: 2005.



HACKBARTH, C.J.; CHAMBERS.H.F. *bla*/e *b/aR1* regulate  $\beta$ -lactomanase and PBP2a production in methicillin resistant Staphylococcus. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 37, p. 1144-1149, 1993.

HACKBARTH, C.J.; CHAMBERS.H.F. Methicillin-resistant staphylococci: detection methods and treatment of infections. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 33, p. 995-999, 1989.

HALL, D.I. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus and infection control for restorative dental treatment in nursing homes. *Spec. Care Dentist*, v. 23, p. 100-107, 2003.

HAMILTON-MILLER, J. M. Detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus using the BBL crystal MRSA kit. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 16, p. 481, 1997

HARTMAN, B.J.; TOMASZ, A. Expression of methicillin resistance in heterogeneous strains of Staphylococcus aureus. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 33, p. 995-999, 1986.

HIRAMATSU, K. ; HANAOKI, H. ; INO, T. et al. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 40, p. 135-136, 1997a

HIRAMATSU, K.; HANAOKI, H.; INO, T. et al. Dissemination in Japanese hospitals of strains of Staphylococcus aureus heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet*, v. 350, p. 1670-1673, 1997b.

IENDO, E.; RISTOW, K.; SCHRECKENBERGER, P.C. Incidence of constitutive and Inducible Clindamycin Resistance in *Staphylococcus aureus* and Coagulase-Negative Staphylococci in a Community and a Tertiary Care Hospital. *J. Clin. Microbiol.*, v. 42, p. 2777-2779, 2004.

INGLIS, B.; EL ADHAMI, P.R.; STEWART, P. Methicillin sensitive and resistant homologous of Staphylococcus aureus occur together among clinical isolates. *J. Infect. Dis.*, v. 167, p. 323-328, 1993.

JEVONS, M.P. "Celbenin" - resistant staphylococci. *Br. Med. J.*, v. 1, p. 124-125, 1961.

KLOOS, W. E; SCHLEIFER, K. H. Genus IV – Staphylococcus. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. SNEATH, P. H. A; MAIR, N. S.; SHARPE, M. E. et al. Baltimore. p. 1.013-1.035, 1994.

KONEMAN, E. W. ; ALLEN, S. D. ; JANDA, W. M. et al. *Diagnóstico microbiológico*. 5. ed. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica, 2001, 1782p.

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

LAYTON, M.C.; HIERHOLZER, W.J.; PATTERSON, J.E. The evolving epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at a university hospital. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.*, v.,16, p. 12-17, 1995.

LOPES, H. V., CA MRSA: a new problem for the infectologist. *Rev. Panam. Infectol.*, v. 3, p. 34-36, 2005.

LOWY, D.F. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Invest.*, v.4, 111, p. 1265-1273, 2003.

MACFADDIN, J. F. et al. *Biochemical tests for identification of medical bacteria*. 3<sup>rd</sup>ed. Philadelphia: Lawrence McGrew, Lippincot Williams & Wilkins, 2000. 901 p.

MAIDHOF, H. ; REINICKE, B.; BLUMEL, P. et al. *FemA*, with encodes a factor essential for expression of methicillin resistance, affects glycine content of peptidoglycan in methicillin-resistance and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains. *J. Bacteriol.*, v. 173, p. 3507-3513, 1991.

MANRIQUE, E.I.; GALVÃO L.L.; RODRIGUES, E. A.C. in:. Racionalização e controle de antimicrobianos In: *Infecções hospitalares: prevenção e controle*. São Paulo: Sarvier, p.117-130, 1997.

MARANGONI, D. V. *Staphylococcus aureus* In: RODRIGUES, E. A. C.; MENDONÇA, J. S.; AMARANTE, J. M. B., *Infecções hospitalares: prevenção e controle*. São Paulo: Sarvier, p. 573-591,1997.

MARTINS, C.A.P.; KOGA-ITO, C.Y., JORGE, A.O.C. Presença de *Staphylococcus* spp e *Candida* spp na cavidade bucal humana. *Braz.J.Microbiol.*, v. 33, p. 236-240, 2002.

MATTHEWS, P.R.; REED, K.C.; STEWART, P.R. The cloning of chromosomal DNA associated with methicillin and other resistances in *Staphylococcus aureus*. *J. Gen. Microbiol.*, v. 133, p. 1919-1929, 1987.

MATTHEWS, P.R.; STEWART, P.R. Resistance heterogeneity in methicillin resistance *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.*, n. 22, p. 161-162, 1984.

MIAN, H.; PIMENTA, F.C.; TIRAPELLI, C. et al. *Staphylococcus aureus*: detecção de penicilinase das cepas isoladas da saliva de indivíduos saudáveis. anais FORP-USP, FCFRP-USP, IPTSP-UFGO, v.1, p. 3, 2002.

MIMS, C.; PAYFAIR, J.; ROITT, I. et al. *Microbiologia médica*, 2.ed.São Paulo Manole, 1999. 584 p.

MURRAY, P R; BARON, E J; JORGENSEN, J H. et al. *Manual of Clinical Microbiology*. 8<sup>th</sup>ed. Washington: ASM Press, 2003.v.1, 1211 p.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). *Performance Standards for antimicrobial disk susceptibility tests*, Baltimore, 2004.

- NICOLA, F.; BANTAR, C.; CANIGIA, L F. et al. Comparison of several methods to determinate methicillin-resistance in *Staphylococcus aureus* with focus on borderline strains. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 36, p. 91-93, 2000.
- NIMMO, G.R.; SCHOONEVELDT, J.; O'KANE, G. et al. Community acquisition of gentamicin-sensitive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Southeast Queensland, Australia. *J. Clin. Microbiol.* v. 38, p. 3926-3931, 2000.
- OLIVEIRA, D. C., LENCASTRE, H. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* , v.46, p. 2155–2161, 2002.
- PERL, T.M.; CULLEN, J.J.; WENZEL, R.P. et al. Intranasal mupirocin to prevent postoperative *Staphylococcus aureus* infections. *Engl. J. Med.*, v. 346, p. 1871-1877, 2002.
- PFALLER, M. A. Chromosomal restriction fragment analysis by pulsed-field gel electrophoresis. IN: ISEMBERG, H.D, Editor. *Clinical microbiology procedures handbook*. Washington: ASM; 1993.
- PREVOST, G.; JAULHAC, B.; PIEMONT, Y. DNA fingerprinting by pulsed-field gel electrophoresis is more effective than ribotyping in distinguishing among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *J. Clin. Microbiol.*,v 30, p. 967-973, 1992.
- RESENDE, C.A.; FIGUEIREDO, A.M.S. Discrimination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from borderline-resistant and susceptible isolates by different methods. *J. Med. Microbiol.*, v. 46, p. 145-149, 1997.
- RIBEIRO, A.; DIAS C.; CARVALHO, M.C.L. et al. First Report of Infection with Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in South America *J. Clin. Microbiol.*, p. 1985-1988, 2005.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. ; MANIATIS, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2<sup>nd</sup> ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 1254p.
- SANTOS, M.O.B. Longitudinal study on healthy carrier of *Staphylococcus aureus* in students of a technical nursing course. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 32, p. 295-400, 1999.
- SMITH, A.J. D.; ROBERTSON, M. K.;TANG, M. S. JACKSON, N. et al., *Staphylococcus aureus* in the oral cavity: a three-year retrospective analysis of clinical laboratory data. *Br. Dent. J.*, v. 195, p. 701- 703, 2003.
- STEWART, C.D.; RANEY, P.M.; MORRELL, A.K. et al. Testing for induction of clindamycin resistance in erythromycin-resistant isolates of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.*, v.3, p. 1716-1721, 2005.
- STRUELENS, M.J.; DEPLANO, A.; GODARD, C. et al. Epidemiologic typing and delineation of genetic relatedness of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by macrorestriction analysis of genomic DNA by using pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.*,v.30, p. 2599-2605, 1992.

STUKUS, P. E. *Investigating microbiology: ( a laboratory manual for general microbiology)*. Orlando: Saunders College Publishing, 1997, 414p.

SULLER, M.T.; STARK, J.M.; LLOYD, D. A flow cytometric study of antibiotic-induced damage and evaluation as a rapid antibiotic susceptibility test for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 40, p. 77-83, 1997.

SWAMINATHAN, B.; MATAR, G.M. Molecular Typing Methods. In: PERSING, D.H. et al. *Diagnostic molecular microbiology principles and applications*. Washington, DC: ASM Press, 1993, p.26-50.

TAKAHASHI, A.; YOMODA, S.; KANDA, T. et al. Slime formation as a marker of serious infection with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Microbiol.*, n. 28, p. 87-98, 1997.

TENOVER, F. C. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.*, v.18, p.426-439, 1997.

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

TENOVER, F.C.; LANCASTER, M.V.; HILL, B.C. et al. Characterization of *Staphylococci* with reduced susceptibilities to vancomycin and other glycopeptides. *J. Clin. Microbiol.*, v. 36, p. 1.020-1.027, 1997.

TOMASZ, A.; DRUGEON, H. B. ; LENCASTRE, H. M. et al. New mechanism for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: clinical isolates that lack the PBP 2a gene and contain normal penicillin-binding proteins with modified penicillin-binding capacity. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 33, p. 1869-1874, 1989.

UEMURA, E.; KAKINOHANA, S.; HIGA, N. et al. Comparative characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from throats and noses of healthy volunteers. Okinawa: University of the Ryukyus. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 49, p. 1465-1467, 2004.

WAXMAN, D. J.; STROMINGER, J.L. Penicillin-binding protein and the mechanism of action of  $\beta$ -lactam antibiotics. *Ann. Rev. Biochem.*, v. 52, p. 825-869, 1983.

WERTHEIM, H.F.; VERVEER, J.; BOOLENS, H.A. et al. Antimicrobial Effect of mupirocin treatment on nasal, pharyngeal, and perineal carriage of *Staphylococcus aureus* in healthy adults. *Agents Chemother.*, v, 49, p. 1465-1467, 2005.

WISE, R.I.; OSSMAN, E.A.; LITTLEFIELD, D.R. Personal reflections on nosocomial staphylococcal infections and the development of hospital surveillance. *Rev. Infect. Dis.*, v. 11, p. 1105-1119, 1989.

WU, K.C.; CHIU, H.H.; WANG, J.H. et al. Characteristics of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in infants and children without known risk factors. *J. Microbiol. Immunol. Infect.*, v. 1, p. 53-56, 2002.

YUN, H.; LEE, S. W.; YOON, G.M. et al. Prevalence and mechanisms of low and high level mupirocin resistance in staphylococci isolated from a Korean hospital. *J. Antimicrob. Chemoter.* , v. 51, p. 619-623, 2003.

ZENSHI, H.; QUESADA, M. B.; HESHIKI, R.E. et al.. Nasal bacterial flora: a study among medical residents of Londrina University- Parana State –Brazil *Cienc. Biol. Saude*, v.23, p. 3-10, 2002.

ZETOLA, N.; FRANCIS, J.S.; NUERMBERGER, E.L.; BISHAI, W.R. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging threat. *Lancet Infect. Dis.* v.5, p. 275-286, 2005.

## 9.0 – ANEXOS

## 9.1 - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (Anexo1)

**unesp**  UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Araçatuba

**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP-**

OF. 0100/2004  
CEP  
ACBD/bri

Araçatuba, aos 21 de setembro de 2004.


  
FLS. 56  
PROC. 2004-01112  
RUB. Bri


**Referência Processo FOA 2004-01112**

O Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa desta Unidade, tendo em vista o parecer favorável da relatora que analisou o projeto "Estudo comparativo de cepas de *Staphylococcus aureus* metilicina resistente isolada de fossa nasal e língua", expede o seguinte parecer:

**Aprovado:**

Informamos a Vossa Senhoria que de acordo com as normas contidas na resolução CNS 215, deverá ser enviado relatórios parciais até 15/09/2005, 15/09/2006, 15/09/2007 e relatório final até 15/09/2008.

  
Prof. Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbeni  
Coordenador do CEP

**Ciente.De acordo.**  
22/09/2004  
  
Dr. Vilma Clemi Colli

Ilma. Senhora  
Dr. VILMA CLEMI COLLI  
Araçatuba-SP-

Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária - DIRETORIA - COMITE DE ETICA EM PESQUISA  
Rua José Bonifácio, 1193 CEP 16015-050 Araçatuba - SP  
Tel (16) 820-3203 E-mail: diretor@foa.unesp.br

## 9.2 -Termo de Consentimento Esclarecido (Anexo 2)

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP  
(Resolução nº 01 de 13/06/98 – CNS)

TERMO DE CONSENTIMENTO ESCLARECIDO

I – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. Nome do Paciente:			
Documento de Identidade nº	Sexo:	Data de Nascimento:	
Endereço:		Cidade:	U.F.
Telefone:		CEP:	

## II – DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. <b>Título do protocolo de pesquisa:</b> " ESTUDO DE CEPAS DE <i>Staphylococcus aureus</i> ISOLADAS DE AMOSTRAS NASAIS E LINGUAIS DE PORTADORES VOLUNTÁRIOS ADULTOS SAUDÁVEIS"		
2. <b>Pesquisador responsável:</b> Wilma Clemi Colli		
<b>Cargo/função:</b> Farmacêutica– bioquímica	<b>Inscr.Cons.Regiona l:</b>  CRF08-7084	<b>Unidade ou Departamento do Solicitante:</b> Curso de Pós graduação de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara.
3. Avaliação do risco da pesquisa: (probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como conseqüência imediata ou tardia do estudo).		
<input checked="" type="checkbox"/> <b>SEM RISCO</b> <input type="checkbox"/> <b>RISCO MÍNIMO</b> <input type="checkbox"/> <b>RISCO MÉDIO</b> <input type="checkbox"/> <b>RISCO ALTO</b>		
4. <b>Justificativa e os objetivos da pesquisa (explicitar):</b> Algumas pessoas saudáveis são portadoras de uma bactéria chamada <i>Staphylococcus aureus</i> e isto de forma transitória ou persistente. Em situações adversas ela pode provocar várias doenças em diversas partes do organismo (pele, pulmões, meninges, bexiga e outros). Os indivíduos portadores podem transmitir a outros indivíduos, professores e alunos. O objetivo do trabalho é, através de coleta de material da fossa nasal e de língua com haste flexível estéril, verificar a presença desta bactéria nestes locais e identificar os portadores. Nos portadores identificados uma outra coleta poderá ser solicitada para diferenciar os portadores persistentes.		

5. **Procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a**

<p><b>identificação dos procedimentos que são experimentais: (explicitar)</b>          Procedimento:          1) Passar o cotonete bacteriológico estéril (swab), na parte posterior da língua e imediatamente, introduzi-lo em tubo com meio de cultura (Infusão de Cérebro e Coração = BHI);          2) Passar outro cotonete estéril na mucosa nasal e introduzi-lo, também imediatamente, em outro tubo com o mesmo meio de cultura.          Os tubos devem estar adequadamente e corretamente identificados, pois serão utilizados para transporte e incubação inicial.</p>
<p><b>6. Desconfortos e riscos esperados: (explicitar)</b>          Sem riscos.</p>
<p><b>7. Benefícios que poderão ser obtidos: (explicitar)</b>          Na identificação dos portadores assintomáticos de amostras raras e muito resistentes aos antimicrobianos haverá informação e orientação de erradicação, se necessário.</p>
<p><b>8. Procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo: (explicitar)</b>          Possível orientação de erradicação nos casos pertinentes.</p>
<p><b>9. Duração da pesquisa:</b>          Quatro anos.</p>

### III - EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL

<p>1. Recebi esclarecimentos sobre a garantia de resposta a qualquer pergunta, a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa e o tratamento do indivíduo.</p>
<p>2. Recebi esclarecimentos sobre a liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento e deixar de participar no estudo, sem que isto traga prejuízo à continuação de meu tratamento.</p>
<p>3. Recebi esclarecimento sobre compromisso de que minha identificação se manterá confidencial tanto quanto a informação relacionada com a minha privacidade.</p>
<p>4. Recebi esclarecimento sobre a disposição e o compromisso de receber informações obtidas durante o estudo, quando solicitada, ainda que possa afetar minha vontade em continuar participando da pesquisa.</p>
<p>5. Recebi esclarecimento sobre a disponibilidade de assistência no caso de complicações e danos decorrentes da pesquisa.</p>
<p>Observações complementares.</p>



#### IV – CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após ter sido convenientemente esclarecido (a) pelo pesquisador, conforme registro nos itens 1 a 6 do inciso III, consinto em participar, na qualidade de paciente, do Projeto de Pesquisa referido no inciso II.

\_\_\_\_\_  
Local,     /     /     .  
Assinatura

\_\_\_\_\_  
Testemunha  
Nome .....:  
Endereço.:  
Telefone .:  
R.G. ....:

\_\_\_\_\_  
Testemunha  
  
Nome .....:  
  
Endereço.:  
  
Telefone .:  
  
R.G. ....:

### 9. 3 – Soluções e Reagentes segundo PFALLER,1993 (Anexo 3)

#### Tampão EC

Tris 6mM	1,5mL de Tris 1M pH8,0
	1,5mL de Tris 1M pH7,0
EDTA 0,1M	5,0mL de EDTA 0,5M pH8,0
	5,0mL de EDTA 0,5M pH7,0
NaCl 1M	29,22g
Brij58 0,5% (acetil éter de polioxietileno 20)	2,5g
Desoxicolato de sódio 0,2%	1,0g
Sarkosyl 0,5% (N-Lauroilsarcosina, sal sódico)	2,5g

Ajustar o pH para 7,5, completar o volume para 500,0mL com água destilada deionizada e esterilizar por filtração.

#### Tampão ES

EDTA 0,4M, pH9,3	40,0mL de EDTA 625mM pH9,3
Sarkosyl 1%	10,0mL de sarkosyl a 5%

Preparar no momento do uso em quantidade suficiente.

#### Tampão CHEF-TE

Tris 0,1M pH7,5	2,5mL de Tris 1M pH8,0
	2,5mL de Tris 1M pH7,0
EDTA 0,1M pH7,5	5,0mL de EDTA 0,5M pH8,0
	5,0mL de EDTA 0,5M Ph7,0

Completar o volume para 50,0mL com água destilada deionizada e esterilizar a 121 °C por 15 minutos.

**Tampão DNS**

Tris 0,1M pH8,0

5,0mL de Tris 1M pH8,0

Cloreto de magnésio 5Mm

0,250mL de cloreto de magnésio 1M

Completar com água destilada deionizada estéril para 50mL. Preparar no momento do uso.

**Agarose de baixo ponto de fusão a 2%**

Agarose de baixo ponto de fusão 2,0g

Água destilada deionizada 100,0mL

Dissolver a agarose em água destilada deionizada em banho de água fervente e aliquotar em frascos contendo 10mL. Esterilizar a 121 °C por 15 minutos e armazenar a 5 °C.

**Proteinase K**

Dissolver 100mg de proteinase K (GibcoBRL, Life Technologies, USA) em 10mM de Tris HCl pH7,5, 20mM de cloreto de cálcio e 50% de glicerol.

Armazenar a temperatura de -20 °C.

**Lisostafina****Solução estoque de lisostafina**

Dissolver 1mg de lisostafina em 1mL de tampão de acetato de sódio 20mM pH4,5. Armazenar a temperatura de -20 °C.

**Solução de uso de lisostafina**

Diluir a solução estoque 1:10 em tampão de acetato de sódio 20mM pH4,5.

**Tampão Tris-Borato-EDTA (TBE)****TBE 10x**

Tris base 121,1g

Ácido bórico 61,8g

Na<sub>2</sub>EDTA 3,7g

Completar o volume com água destilada deionizada para 1000mL.

Esterilizar a 121 °C por 15 minutos e armazenar a temperatura ambiente.

TBE 0,5x

TBE 10x 50,0mL

Água destilada deionizada 950,0mL

Preparar no momento do uso.

## CAPÍTULO 2

Community *Staphylococcus aureus* healthy carriage in nose and tongue

Vilma Clemi Colli, Antonio Carlos Pizzolitto, Maria Stella Gonçalves Raddi

UNESP – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas,  
Departamento de Análises Clínicas, Araraquara, SP, Brazil

**Abstract**

*Staphylococcus aureus* healthy carrier has been characterized as the individual who transport infectious agents without symptoms that can be recognized only by laboratories methods. The aim of this study was to investigate the extent of *S. aureus* adult health carrier, particularly MRSA, the antibiotic susceptible pattern of the isolates, including inducible clindamycin resistance, by performing nose and tongue swabs. *S. aureus* was detected from nose or/and tongue in 17% out of 100 individuals examined. The most common site of isolation was the nose (13% of the individuals). If tongue had not been chosen for screening site, 4% of *S. aureus* carrier would have not been identified. Phenotypic methods showed different clonal types from the two sites in an individual, and PFGE analysis established the same clonal type strain in 3 individuals at both sampling sites. Out of 18 *S. aureus*, 16 were considered as MSSA, one BORSA, and one MRSA by phenotypic methods. PCR failures to detect the chromosomal *mecA* gene on the phenotypic MRSA strain. Inducible clindamycin resistant was observed in 16.7 %. In this study MRSA colonization in health individual was not find, nevertheless

---

Correspondence: Maria Stella Gonçalves Raddi, Rua Expedicionários do Brasil, 1621, CEP 14801-902 Araraquara SP Brazil e-mail: [raddims@fcfar.unesp.br](mailto:raddims@fcfar.unesp.br)

it is imperative to observe the spread of multiple-drug resistance in *S. aureus* as well as detect inducible resistance to clindamycin.

**Keywords:** *Staphylococcus aureus*, methicillin, clindamycin, BORSA

## Introduction

*Staphylococcus aureus* has been recognized as one of the most important pathogen in human disease. The spread of multidrug-resistant strains, particularly methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), have made these infections more difficult to treat. MRSA has been recognized as a nosocomial pathogen; however published data confirm that community-acquired MRSA infections are increasing in incidence in both urban and rural settings (Huijsdens et al., 2006).

The anterior nares have being considered the primary *S. aureus* colonization site although high carrier rates have been described to others different anatomical sites (Meurman et al., 2005). Even though MRSA infection has become increasingly reported, population-based *S. aureus* and MRSA colonization estimates are lacking (Coimbra et al., 2000).

Some characteristics appear to differentiate community-associated MRSA (CA MRSA) from the hospital associated MRSA (HA MRSA). CA MRSA is defined as community acquired if the MRSA-positive specimen was obtained outside hospital settings or within 2 days of hospital admission, and if it was from a person who had

not been hospitalized within 2 years before the date of MRSA isolation. Despite MRSA, the methicillin sensible *S. aureus* (MSSA) is more common in community staphylococcal infections (Salmenlinna et al., 2002).

Phenotypic methods are helping to screening the CA MRSA. They: (1) primarily cause skin and soft tissue infections or occasionally necrotizing pneumonia (because many produce the Panton-Valentine leukocidin), (2) are resistant only to beta-lactams and frequently erythromycin, and (3) have the minimal inhibitory concentration (MIC) for oxacillin between 2 and 32 µg/ml (Ribeiro et al., 2005). Strains of MRSA that originate in the community also have molecular features that are quite distinct from those of HA-MRSA; these include unique pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) clonal types, the presence of type IV staphylococcal cassette chromosome *mec*, and the presence of the Panton-Valentine leukocidin genes (Boyce, 2003).

CA MRSA and HA MRSA usually have different resistance characteristics, however most CA MRSA isolates are susceptible to clindamycin (Lamplante et al., 2007). Although *S. aureus* shows clindamycin susceptible results in conventional susceptibility test, it can be converted to a constitutively phenotype during clindamycin treatment (Lim et al., 2006). Detection of inducible resistance to clindamycin is recommended by D-zone test (O'Sullivan et al., 2006).

*Staphylococcus aureus* healthy carrier has been characterized as the individual who transport infectious agents without symptoms that can be recognized only by laboratories methods. The aim of this study was to investigate the extent of *S. aureus* adult health carrier, particularly MRSA, the antibiotic susceptible pattern of the isolates, including inducible clindamycin resistance, by performing nasal and tongue swabs.



## Material and Methods

A total of 100 adult volunteers who were aware of any illness, hospitalization history or antibiotic use at the time of sampling from the UNESP/Clínica Integrada da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, São Paulo, Brazil, about 530 Km from São Paulo city were examined. Samples were taken from the nasal vestibulum and from the posterior tongue using cotton swab. All swabbed samples were directly inoculated onto brain heart infusion (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) and incubated at 35-37°C for 24 h. A portion (10 ul) of the broth was then plated on a mannitol salt agar (Oxoid, Basingstoke, UK) and on a trypticase soy agar (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) plus 5% sheep blood plate and incubated at 35-37°C overnight. Suspected colonies were identified as *S. aureus* on the basis on colony characteristics, Gram stain, and production of catalase, coagulase and DNase and mannitol fermentation (Mac Faddin et al., 2000). The urease production was investigated using Christensen urea medium (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA). One single isolate of *S. aureus* was isolated from sample. The possible presence of more than one clonal type in each sample was not taken into account. Unless otherwise noted, the following tests techniques were in accordance with the guidelines of the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2004). Antibacterial susceptibility tests were performed by the disk diffusion method on Mueller Hinton agar (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) supplemented with NaCl 4% with the following discs (Cecon, Brazil): amoxicillin/clavulanic acid (20/10 µg), ampicillin (10 µg), amikacin (30µg), cefoxitin (30 µg), ciprofloxacin (5 µg), chloramphenicol (30 µg), clindamycin (2 µg), erythromycin (25 µg), gentamicin (10 µg), oxacillin (1 µg), penicillin G (10U), sulfazotrim (25 µg), (sulfamethoxazole/trimethoprim,1.25/23.75 µg), teicoplanin (30 µg), tetracycline (30

µg), mupirocin (5 µg), and vancomycin (20µg). *S. aureus* ATCC 25923 was used as control. In addition, resistance to methicillin was detected on oxacillin resistance screening agar (Mueller-Hinton agar containing 4% NaCl and 6 µg/mL oxacillin) (NCCLS, 2004) and by the minimal inhibitory concentration for oxacillin, as a substitutive for methicillin, by broth dilution method, using Mueller Hinton broth (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) supplemented with 2% NaCl containing twofold dilutions of oxacillin (Sigma) at final concentration to 100 to 0.1µg/mL. Strains with oxacillin MIC values of 2 – 4 µg/mL without growth in screening agar were interpreted as borderline oxacillin-resistant *S. aureus* (BORSA). *S. aureus* with oxacillin MICs greater than 2 µg/mL that it grew in screening agar were submitted to Universidade Federal do Rio de Janeiro for *mecA* gene polymerase chain reaction (Oliveira & Lencastre, 2002). Isolates from the same individual but collected on different sites were analyzed by PFGE for clonal association (Pfaller, 1993). The double disk diffusion test (D-test) was performed on all isolates whose antibacterial susceptibility patterns were clindamycin susceptible and erythromycin resistant. The test was used to estimate the proportion of inducible clindamycin resistance. This research has previously been submitted to the Research Ethics Committee of Faculdade de Odontologia de Araçatuba (São Paulo), and received approval under Protocol 01112/04.

## RESULTS

*S. aureus* was isolated from nose or/and tongue in 17% out of 100 individuals examined. The most common site of isolation was the nose (13% of the individuals). If tongue had not been chosen for screening site, 4% of *S. aureus* carriers would have not been identified. Phenotypic methods showed different clonal types from the two sites in an individual, and PFGE analysis established the same clonal type strain

in 3 individuals at both sampling sites. A total of 18 strains were considered. The phenotypic pattern of these strains is shown in Table 1. None of strains were resistant to amoxicillin/clavulanic acid, ciprofloxacin, chloramphenicol, gentamicin, tetracycline, vancomycin, ceftiofur and clindamycin. Low rates of resistance were expressed to oxacillin, but a high resistance rate was observed to penicillin and ampicillin. Resistance to 3 or more antibiotics was noted in 12 isolates. Out of 18 *S. aureus*, 16 were considered as MSSA, one BORSA, and one MRSA by phenotypic methods. PCR failures to detect the chromosomal *mecA* gene on the phenotypic MRSA strain (screening agar and MIC for oxacillin 8.0 µg/mL). Inducible clindamycin resistant was observed in 3 (16.7 %) isolates as showing in Table 1.

## DISCUSSION

The real incidence rate of *S. aureus* depends on the populations studied and the sampling site (Meurman et al., 2005). The sensitivity of nasal culture for MRSA has been questioned, since *S. aureus* have been more frequent isolated from the throat than anterior nares (Uemura et al., 2004). It seems that MRSA favors the throat than the nose (Nilsson & Ripa, 2006). Although in this study the nose was the site leading the most positive results, sampling the tongue increased the incidence rate of *S. aureus*.

In general, the hospital population harbors a higher MRSA carriage rate as compared to community carriers (Choi et al., 2006). However, the MRSA carriage rate in the present study cannot be generalized because the population was restricted to adults and only one sample was taken, our data suggest that MRSA is unusual in community health persons without previously history of hospitalization and antibiotic intake.

Surveillance on the antimicrobial susceptibility patterns of *S. aureus* is of most importance in understanding new and emerging resistance trends. A rising number of CA MSSA shows high-level resistance. Additionally, resistance rates are typically higher in developing countries as compared to developed countries. In this study, except one of all isolates were resistant to penicillin G and ampicillin, followed by strains with resistance also to erythromycin.

Accurate identification of oxacillin-resistant *S. aureus* in clinical specimens is of tremendous significance. Mueller-Hinton agar containing 4% NaCl and 6 µg/mL oxacillin (MRSA Screen Agar) has been recommended as a screen procedure for oxacillin resistance in *S. aureus* (NCCLS, 2004). Several studies have reported discrepancies showing that some strains do not harbour the *mecA* gene, but show phenotypic resistance to oxacillin (Nadarajah et al., 2006); these findings have already been reported and may be associated with the hyperproduction of β-lactamase in these isolates.

Some authors proposed the cefoxitin diffusion disk method as being helpful in predicting oxacillin resistance in *S. aureus* strains (Palazzo & Darini, 2006). According to the results, the isolate for which the oxacillin MIC was 8 µg/mL showed sensitivity to cefoxitin and can be classified as borderline oxacillin-resistant *S. aureus* (BORSA). BORSA exhibit oxacillin MIC values of 1 - 4 µg/mL, but lack *mecA* gene (Nicola et al., 2000). Future studies are needed to demonstrate when conventional methods such as microdilution or disk diffusion need to be replaced in the clinical microbiology laboratory by molecular methods such as PCR to detect resistance genes (Kampf et al., 2003).

Although we share the concern that incorrect reports of false resistance must be avoided, our findings suggest that those isolates with oxacillin borderline MICs of 2-8 µg/mL should be reviewed by reviewing susceptibility to other lactams to which

oxacillin-resistant *S. aureus* is also resistant when no others techniques are available. Inducible resistance to clindamycin in *S. aureus* show susceptible results in conventional susceptibility test, but can be converted to a constitutively resistant phenotype during clindamycin treatment (Lim et al., 2006). In our study, the rate of inducible clindamycin resistance shows a high prevalence (16.7%) in MSSA. Among erythromycin-resistant isolates, 25% (3 from 12) showed inducible clindamycin resistance.

There is a wide geographic variation in the rates of inducible resistance in clindamycin susceptible *S. aureus* with significantly higher rates in MRSA (Lamplante et al., 2007). Otsuka et al. (2007) reported 0.5% of clindamycin resistance rate among clinical MSSA isolates in Japan, while erythromycin resistance was observed among 34.6% of MSSA isolates. A relationship between use of antibiotics and acquisition of resistance is generally accepted (Cizman, 2003), and the present data suggest that a strong antibiotic pressure is exerting to MSSA.

MSSA is still dominant in community health persons. It is hypothesized that the evolution of CA MRSA is a recent event due to the acquisition of mec DNA by previously methicillin-susceptible strains that circulated in the community (Fey et al., 2003). This study gives a knowledge about the circulating *S. aureus* in a restrict community in Brazil.

### **Acknowledgement**

We thank Dr. Agnes M. S. Figueiredo from Laboratório de Biologia Molecular de Bactérias, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, UFRJ, for the molecular analysis.

## **References**

Boyce J.M. Update on resistant *Staphylococcus aureus* infections. Clin Upd Infect Dis, 6, 1-4, 2003.

Choi CS, Yin CS, Bakar AA, Sakewi Z, Naing NN, Jamal F, Othman N. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* among healthy adults. J Microbiol Immunol Infect, 39:458-464, 2006.

Cizman M. The use and resistance to antibiotics in the community. Int J Antimicrob Agents, 21: 297-307, 2003.

Coimbra MVS, Teixeira LA, Ramos RLB, Predari SC, Castello L, Famiglietti A, Vay C, Klans L, Figueiredo AMS. Spread of the Brazilian epidemic clone of a multiresistant MRSA in two cities in Argentina. J Med Microbiol, 49:187-192, 2000.

Fey PD, Said-Salim B, Rupp ME, Hinrichs SH, Boxrud DJ, Davis CC, Kreiswirth BN, Schlievert PM. Comparative molecular analysis of community- or hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother., 47:196-203. 2003

Huijsdens XW, van Dijke BJ, Spalburg E, van Santen-Verheувel MG, Heck ME, Pluister GN, Voss A, Wannet WJ, de Neeling AJ. Community-acquired

MRSA and pig-farming. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 10: 5 – 26, 2006.

Kampf G, Adena S, Ruden H, Weist K. Inducibility and potential role of MecA-gene-positive oxacillin-susceptible *Staphylococcus aureus* from colonized healthcare workers as a source for nosocomial infections. *J Hosp Infect*, 54:124-129, 2003.

Lamplante KL, Rybak MJ, Amjad M, Kaatz GW. Antimicrobial susceptibility and staphylococcal chromosomal cassette mec type in community- and hospital-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Pharmacotherapy*, 27:3-10, 2007.

Lim HS, Lee H, Roh KH, Yum JH, Yong D, Lee K, Chong Y. Prevalence of inducible clindamycin resistance in staphylococcal isolates at a Korean tertiary care hospital. *Yonsei Med J*, 47:480-484, 2006.

Mac Faddin JF. et al. *Biochemical tests for identification of medical bacteria*. 3<sup>rd</sup>ed. Philadelphia: Lawrence McGraw, Lippincot Williams & Wilkins, 2000. 901 p. Macfadim, 2000.

Meurman O, Routamaa M, Peltonen R. Screening for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: which anatomical sites to culture? *J Hosp Infect*, 61:351-353, 2005.

Nadarajah J, Lee MJS, Louie L, Jacob L, Simor AE, Louie M, McGavin MJ. Identification of different clonal complexes and diverse amino acid substitutions in

penicillin-binding protein 2 (PBP2) associated with borderline oxacillin resistance in Canadian *Staphylococcus aureus* isolates. *J Med Microbiol*, 55: 1675-1683, 2006.

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). *Performance Standards for antimicrobial disk susceptibility tests*, Baltimore, 2004.

Nicola F, Bantar C, Canigia LF, 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*. 36:91-93, 2000

Nilsson P, Ripa T. *Staphylococcus aureus* throat colonization is more frequent than colonization in the anterior nares. *J Clin Microbiol.*, 44: 3334-3339, 2006.

Oliveira DC, Lencastre H., Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* , v.46, p. 2155–2161, 2002.

O'Sullivan MV, Cai Y, Kong F, Zeng X, Gilbert GL. Influence of disk separation distance on accuracy of the disk approximation test for detection of inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus* spp. *J Clin Microbiol*, 44 : 4072-4076, 2006.

Otsuka T, Zaraket H, Takano T, Saito K, Dohmae S, Higuchi W, Yamamoto T. Macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance phenotypes and genotypes among



*Staphylococcus aureus* clinical isolates in Japan. Clin. Microbiol. and Infect. 13; 325–327, 2007.

Palazzo IC, Darini AL. Evaluation of methods for detecting resistance in coagulase-negative oxacillin staphylococci including cefoxitin disc diffusion. FEMS Microbiol Lett, 257:299-305, 2006

Pfaller, M A Chromosomal restriction fragment analysis by pulsed-field gel electrophoresis. IN: ISEMBERG HD, Editor. Clinical microbiology procedures handbook. Washington: ASM; 1993

Ribeiro A, Dias C, Silva-Carvalho MC, Berquo L, Ferreira FA, Santos RN, Ferreira-Carvalho BT, Figueiredo AM. First report of infection with community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in South America. J. Clin. Microbiol., 43:1985-1988, 2005.

Salmenlinna S, Lyytikäinen O, Vuopio-Varilä J., Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Finland. Emerg. Infect. Dis, 8: 602 – 607, 2002.

Uemura E.; Kakinohana S.; Higa N., Toma C, Nakasone N. Comparative characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from throats and noses of healthy volunteers. Jpn. J. Infect. Dis., 57: 21-24, 2004.

**Table 1.** Characterization of *S. aureus* strains isolated from nose (N) and tongue (T)

Strains	URE <sup>(1)</sup>	SA <sup>(2)</sup>	Antibiotics					MIC <sup>(8)</sup>
			PEN <sup>(3)</sup>	AMP <sup>(4)</sup>	ERI <sup>(5)</sup>	CLI <sup>(6)</sup>	OXA <sup>(7)</sup>	
24N	-	No	S	S	S	S	S	≤ 0.1
37N	-	No	R	R	S	S	S	≤ 0.1
LCN	-	No	R	R	S	S	S	≤ 0.1
CNN	-	No	R	R	S	S	S	≤ 0.1
36T	-	No	R	R	S	S	S	≤ 0.1
38T	-	No	R	R	S	S	S	≤ 0.1
1N	+	No	R	R	R	S	S	0.2
7N	+	No	R	R	R	S	S	0.2
21N	-	No	R	R	R	S	S	0.2
40T	-	No	R	R	R	S	S	0.2
5N	+	Yes	R	R	R	S	R	8.0
LGT	+	No	R	R	R	S*	S	0.2
32N	-	No	R	R	R	S*	S	≤ 0.1
4N/T	-	No	R	R	R	S	S	≤ 0.1
4AT	-	No	R	R	R	S	S	0,2
4AN	-	No	R	R	R	S	I	2,0
8N/T	+	No	R	R	R	S*	S	0.2
19N/T	+	No	R	R	R	S	S	≤ 0.1

<sup>(1)</sup> urease production; <sup>(2)</sup> screening agar; <sup>(3)</sup> penicillin; <sup>(4)</sup> ampicillin; <sup>(5)</sup> erythromycin; <sup>(6)</sup> clindamycin; <sup>(7)</sup> oxacillin; <sup>(8)</sup> minimal inhibitory concentration for oxacillin (µg/mL); \* inducible clindamycin resistance