

André Martins

**Resistência à Oxacilina em *Staphylococcus aureus* provenientes de
pacientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de
Botucatu**

Dissertação apresentada ao programa
de Pós-Graduação em Doenças
Tropicais da Faculdade de Medicina
de Botucatu, Universidade Estadual
Paulista, para obtenção do Título de
Mestre em Doenças Tropicais.

Orientadora: Dra. Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha

**Botucatu – São Paulo
2008**

Aos meus pais, Ivanir e José Osvaldo, por sempre acreditarem em mim, e pelos seus exemplos que me ajudaram a tornar o homem que sou hoje.

Dedicatória

Agradecimentos

A Deus, por me dar forças nos momentos mais difíceis durante a execução deste trabalho.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Maria de Lourdes R.S. da Cunha, pela dedicação, grande paciência, incentivo e confiança depositada em mim.

À minha irmã Ana Paula, por sempre acreditar e torcer por mim, e me auxiliar sempre que possível.

À aluna de iniciação científica e colaboradora Valéria, pela grande ajuda dada durante a execução deste trabalho.

Aos colegas de laboratório Adilson, Camila, Eliane, Eliane Pessoa, Jackson, Marcus, Marília, Nathalie e Regina e aos funcionários Izaltino, Pedro e “Lula” pelo apoio durante o desenvolvimento deste trabalho e pela boa convivência.

Ao amigo Ulisses, pela ajuda e torcida durante todos estes anos e pela hospedagem gentilmente cedida durante o ano de 2007.

Aos amigos Sergio, Ana Paula, Gleide, Martha, André, Sérgio (Tupã) e ao meu primo Leonardo pelo apoio e os bons momentos vividos juntos.

À diretora do Instituto Adolfo Lutz - Laboratório Regional de Santo André, Lucia Vanucci Savignano, a Chefe de Seção de Biologia Médica Regina R.F. e Silva e a Encarregada de Setor Técnico Patrícia L.V. Coleta, pela ajuda, paciência e compreensão.

Aos colegas de trabalho Flavia, Giselle e Ana Claudia, pelo incentivo, ajuda e apoio.

À todos os colegas do Instituto Adolfo Lutz que torceram para o sucesso deste trabalho.

À todos os colegas, professores e funcionários do departamento de Microbiologia e Imunologia da UNESP e a todos os colegas de pós-graduação, que de alguma forma colaboraram ou torceram para o bom andamento deste trabalho.

À bibliotecária Meire, pela correção das referencias bibliográficas desta dissertação.

À bibliotecária Rosemeire, pela execução da ficha catalográfica.

Aos funcionários da Pós-graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu e da Pós-graduação em Doenças Tropicais pela atenção nos momentos de dúvidas.

À todos que de algum forma, contribuíram com a minha formação, o que possibilitou chegar até este momento.

E a todas as pessoas que, de uma forma ou de outra, auxiliaram na execução deste trabalho.

SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	vi
Lista de Tabelas.....	viii
Resumo.....	ix
Abstract.....	x
1. Introdução.....	01
2. Objetivos.....	09
3. Materiais e Métodos.....	10
3.1. Amostras.....	10
3.2. Identificação de <i>S. aureus</i>	10
3.3. Determinação de amostras de <i>S. aureus</i> resistentes a metilina-oxacilina (MRSA).....	11
3.3.1. Técnica de difusão da droga em ágar com disco de oxacilina e cefoxitina.....	11
3.3.2. Teste de triagem em Ágar Mueller-Hinton com 6 µg/ml de oxacilina e 4% de NaCl.....	11
3.4. Detecção do gene <i>mecA</i> de resistência à metilina em <i>S. aureus</i>	12
3.4.1. Extração do Ácido Nucléico.....	12
3.4.2. Amplificação do ácido nucléico (PCR).....	12
3.4.3. Visualização dos produtos amplificados.....	13
3.5. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) às drogas pelo método de E-test.....	14
3.6. Determinação da produção de β-lactamase.....	15
3.7. Hiperprodução de β- lactamase.....	15
3.8. Análise Estatística.....	15

4. Resultados.....	17
4.1. Identificação de <i>S. aureus</i>	17
4.2. Determinação de amostras de <i>S. aureus</i> resistentes a meticilina-oxacilina (MRSA).....	17
4.2.1. Técnica de difusão da droga em ágar com disco de oxacilina e cefoxitina.....	17
4.2.2. Teste de triagem em Ágar Mueller-Hinton com 6µg/mL de oxacilina e 4% de NaCl.....	20
4.3. Detecção do gene <i>mecA</i> de resistência à meticilina em <i>S. aureus</i>	21
4.4. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) às drogas pelo método de E-test.....	25
4.5. Determinação da produção de β - lactamase.....	29
4.6. Hiperprodução de β -lactamase.....	30
4.7. Distribuição de amostras MRSA entre as enfermarias do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.....	31
4.8. Evolução da resistência a oxacilina no HC da FMB, UNESP no período de 2002 a 2006.....	32
4.9. Análise Estatística.....	34
5. Discussão.....	35
6. Conclusões.....	43
7. Referências Bibliográficas.....	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Determinação da resistência à oxacilina em amostras de <i>S. aureus</i> pelo método de difusão da droga em ágar com disco de oxacilina e cefoxitina.....	19
Figura 2. Amostra de <i>S. aureus</i> sensível à oxacilina detectada pelo método de difusão da droga com discos de oxacilina e cefoxitina.....	19
Figura 3. <i>S. aureus</i> ATCC 29213 utilizada como controle negativo (sensível a oxacilina).....	20
Figura 4. <i>S. aureus</i> ATCC 33591 utilizada como controle positivo (resistente a oxacilina).....	20
Figura 5. Resistência à oxacilina pelo teste de triagem (Mueller-Hinton com 6 µg/ml de oxacilina e 4% de NaCl).....	21
Figura 6. A: Amostra de <i>S. aureus</i> utilizada em nosso estudo resistente à oxacilina pelo teste de triagem. B: amostra de <i>S. aureus</i> utilizada em nosso estudo sensível à oxacilina pelo método de triagem.....	21
Figura 7. Presença do gene <i>mecA</i> em amostras de <i>S. aureus</i> provenientes do HC-FMB - UNESP.....	23
Figura 8. Eletroforese em gel de agarose para pesquisa do gene <i>mecA</i> (533 bp) em amostras de <i>S. aureus</i> pela técnica de PCR.....	24
Figura 9. Eletroforese em gel de agarose para pesquisa do gene <i>mecA</i> (533 bp) em amostras de <i>S. aureus</i> pela técnica de PCR.....	24
Figura 10. Resistência a antimicrobianos em amostras MRSA e MSSA.....	28
Figura 11. Amostra de <i>S. aureus</i> resistente à eritromicina, netilmicina, oxacilina, Trimetoprim-Sulfametoxazol e produtora de β-lactamase.....	29

Figura 12. Amostra de <i>S. aureus</i> sensível a todas as drogas avaliadas e produtora de β -lactamase.....	29
Figura 13. Produção de β -lactamase em amostras de <i>S. aureus</i> provenientes do HC-FMB UNESP.....	30
Figura 14. Amostra resistente ao disco de oxacilina e cefoxitina, produtora de β -lactamase e sensível ao disco de amoxicilina-ácido clavulânico.....	31
Figura 15. Evolução de resistência à oxacilina em <i>S. aureus</i> provenientes do HC da FMB no período de 2002 a 2006.....	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Oligonucleotídeos para a detecção do gene <i>mecA</i>	13
Tabela 2. Resistência à oxacilina avaliada através dos discos de difusão de oxacilina e cefoxitina.....	18
Tabela 3. Determinação da sensibilidade à oxacilina em amostras de <i>S. aureus</i> por métodos fenotípicos e genotípico.....	22
Tabela 4. Amostras positivas em testes fenotípicos para a detecção de resistência à oxacilina e negativas para a pesquisa de gene <i>mecA</i>	23
Tabela 5. Resistência a drogas em amostras MRSA e MSSA detectadas pelo E-test...	26
Tabela 6. Concentração Inibitória Mínima das diferentes drogas estudadas.....	27
Tabela 7. Concentração Inibitória Mínima em amostras MRSA e MSSA.....	27
Tabela 8. Número de resistência as drogas em amostras MRSA e MSSA.....	28
Tabela 9. Resistência à oxacilina em amostras de <i>S. aureus</i> isoladas de pacientes provenientes de diferentes enfermarias do HC da FMB.....	32
Tabela 10. Evolução de Resistência a Oxacilina em amostras de <i>S. aureus</i> isoladas de pacientes do HC da FMB no período de 2002 a 2006.....	33
Tabela 11. Comparação da presença do gene <i>mecA</i> com os métodos de difusão em ágar com disco de oxacilina, disco de cefoxitina, método de triagem (Ágar Mueller Hinton + 6µg/mL de oxacilina + 4% NaCl) e E-test.....	34

RESUMO

A oxacilina é a principal droga de escolha no tratamento das infecções causadas por *S. aureus*. Contudo, a resistência a esta droga tem se tornado um grande problema nas últimas décadas. O objetivo deste estudo foi verificar as taxas de resistência à oxacilina em amostras de *S. aureus* provenientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP e a comparação de métodos fenotípicos com o método padrão ouro (detecção do gene *mecA*) na detecção de amostras MRSA. Um total de 102 amostras previamente isoladas no período de 2002 a 2006 e estocadas na Coleção de Culturas do Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências, UNESP, foram analisadas quanto a resistência à oxacilina por meio da técnica de difusão da droga em ágar com disco de oxacilina e cefoxitina, teste de triagem em Ágar Mueller-Hinton com 6 µg/mL de oxacilina e 4% de NaCl, E-test e detecção do gene *mecA*. Das amostras estudadas, 46 (45,1%) foram positivas para o gene *mecA*. A sensibilidade obtida para o disco de oxacilina foi de 86,9%, com 91,1% de especificidade. O disco de cefoxitina apresentou sensibilidade de 91,3% e especificidade de 91,1%. O método de triagem apresentou os mesmos valores de sensibilidade (91,3%) e especificidade (91,1%) verificados no método do disco de cefoxitina. A fita de E-test mostrou melhor taxa de sensibilidade, com 97,8% e a mesma especificidade encontrada nos outros métodos (91,1%). Das amostras estudadas, 93% foram produtoras de β-lactamase, sendo 05 destas negativas na detecção do gene *mecA*. Verificou-se um aumento gradativo no número de amostras resistentes à oxacilina no período de 2002 a 2004, entretanto, de 2004 a 2006 os resultados revelaram uma redução no número de amostras resistentes, de 55% de MRSA em 2004 para 45% em 2005 e 34,6% em 2006. Os dados revelaram que o E-test obteve melhores resultados, com alta sensibilidade comparada aos outros métodos. A diminuição da taxa de resistência nos últimos anos pode ser explicada pelo uso racional de antimicrobianos associado às boas práticas de controle de infecção hospitalar

ou à diminuição do uso da oxacilina como opção de tratamento.

ABSTRACT

Oxacillin is the main drug of choice for the treatment of *S. aureus* infections. However, *S. aureus* resistance to oxacillin has become a major problem in the past decades. To assess the rates of oxacillin resistance in *S. aureus* samples obtained at the Botucatu Medical School Hospital - Sao Paulo State University/UNESP, Brazil, and to compare phenotypic techniques for the detection of MRSA against the gold standard method (*mecA* gene detection) in these samples. A total of 102 samples, previously isolated between 2002 and 2006, and kept at the Culture Collection of the Department of Microbiology and Immunology, Botucatu Institute of Biosciences, São Paulo State University/UNESP, Brazil were included. Oxacillin resistance was assessed by oxacillin and cefoxitin disk diffusion and agar dilution tests, screening tests using Mueller-Hinton agar with 6 µg/mL of oxacillin and 4% of NaCl, E-test, and *mecA* gene detection. Of the samples analyzed, 46 (45.1%) were *mecA*-positive. Oxacillin disk sensitivity and specificity were 86.9% and 91.1%, respectively. Cefoxitin disk sensitivity and specificity were 91.3% and 91.1%, respectively. The screening test showed same level of sensitivity (91.3%) e specificity (91.1%) found with the cefoxitin disk. With E-test strips, sensitivity was higher (97.8%) and specificity was comparable to that found with the other methods (91.1%). Ninety-three percent of the samples produced β-lactamase, and 05 of them were *mecA*-negative. There was a gradual increase in the number of oxacillin-resistant *S. aureus* samples between 2002 and 2004. However, from 2004 to 2006, the number of resistant samples dropped from 55% of MRSA in 2004, to 45% in 2005 and 34.6% in 2006. The data obtained reveal that, among phenotypic methods, E-test yielded the best results, with higher sensitivity levels when compared to the other methods. The decreased resistance rate observed over the last years may be explained by the rational use of antimicrobial agents associated to good practices in the control of hospital infection, or may

be related with the diminished use of oxacillin as a treatment option.

1. INTRODUÇÃO

Dentre as inúmeras doenças causadas por bactérias, as infecções causadas pelo gênero *Staphylococcus* são de grande importância para a saúde humana e animal. *Staphylococcus aureus* é capaz de causar em humanos intoxicações alimentares, pneumonias, bacteremias, impetigo, foliculite e osteomielite. Em animais pode ser causa de mastites, artrites, e infecções do trato urinário. ¹ *S. aureus* é o agente mais comum de bacteremia nos E.U.A. ² e é descrito na Inglaterra e País de Gales como a segunda maior causa de bacteremia nosocomial, precedido apenas por *Escherichia coli*. ³

Além da importância como patógeno envolvido em infecções nosocomiais, a frequência de infecções comunitárias causadas por esse microrganismo tem aumentado nos últimos anos ⁴ o que denota ainda mais a importância deste patógeno. Juntamente com este fato, a resistência a antibióticos tem também aumentado com o passar dos anos. Segundo Livermore, ⁴ em revisão sobre a resistência do gênero *Staphylococcus* a antibióticos, em 1944, quando surgiu a penicilina, mais de 94% das amostras eram suscetíveis a esta droga. Na década de 50, este número caiu pela metade e atualmente cerca de 80% a 90% das amostras são resistentes.⁵ Dados similares são verificados no Brasil ⁶ e de acordo com os dados da Comissão Permanente de Controle de Infecção Hospitalar (CPCIH) do Hospital das Clínicas (HC) da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB), 90% das amostras de *S. aureus* também são resistentes à essa droga.

O emprego da metilina e outras penicilinas semi-sintéticas, tais como a oxacilina e a metilina resistentes à ação de penicilinases, iniciado em 1959, representou uma etapa significativa na terapia antiestafilocócica. O primeiro relato de resistência à metilina se deu em 1961, pouco tempo após o início do uso desta.⁷ No Reino Unido, o primeiro relato de resistência à esta droga se deu em 1962, espalhando-se para vários hospitais europeus e

posteriormente, de todo o mundo.⁸ Segundo os mesmos autores, o grande problema na resistência à meticilina está no fato que infecções causadas por *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) são difíceis de serem tratadas, sendo em alguns casos suscetíveis apenas à glicopeptídeos e drogas experimentais. Atualmente, a resistência de *Staphylococcus* à meticilina é uma problema de proporções globais, com estudos sobre o assunto realizados por toda a Europa, África, América e Ásia demonstrando a prevalência dos MRSA sobre os isolados suscetíveis à meticilina.⁹ O mesmo autor ainda cita que no continente europeu a taxa de MRSA varia de 1% nos países escandinavos à 80% na Itália, Grécia e França.

Cuevas et al ¹⁰ em um exaustivo estudo envolvendo 143 hospitais da Espanha, avaliaram a resistência de *Staphylococcus spp.* a diversos antimicrobianos, com taxas de resistência para a oxacilina de 31,7% em *S. aureus*, resistência à eritromicina de 31,7% e 16,9% à gentamicina. Com relação à penicilina, *S. aureus* demonstrou resistência em 89% das amostras.

Em um estudo realizado na Finlândia, a incidência de *S. epidermidis* resistente à meticilina aumentou de 28% em 1983 para 77% em 1994. Em outros países, também é relatado aumento significativo no isolamento de cepas MRSA de origem nosocomial. Nos EUA, por exemplo, de uma porcentagem de 2,4% em 1973 esta aumentou para 35% em 1996; na Alemanha, de uma taxa de 1,7% em 1990 apresentou em 1995 8,4% das amostras de *S. aureus* nosocomiais resistentes a meticilina.⁹

Diversas amostras de *Staphylococcus spp.* resistentes à meticilina foram descritas provenientes de cateteres. Em avaliação realizada por Bouza et al ¹¹ para avaliação das características da microbiota encontrada em cateteres provenientes de várias regiões da Europa; das amostras de *S. aureus* isoladas, um total de 40% apresentou resistência a oxacilina.

No Brasil, calcula-se que a frequência de resistência à oxacilina seja alta entre as

amostras de *S. aureus* principalmente em hospitais de grande porte e universitários. Estudos realizados no Hospital São Paulo da Escola Paulista de Medicina¹² e Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (MG) descreveram taxas da ordem de 50%.¹³ Estas cepas diferenciam-se das sensíveis à oxacilina (MSSA) não apenas por caracteres fisiológicos, mas também nos perfis de sensibilidade. As amostras MRSA são normalmente resistentes aos demais β -lactâmicos, macrolídeos, aminoglicosídeos, cloranfenicol, quinolonas e tetraciclina.^{14,15} Com base em observações *in vitro*, o CLSI¹⁶ preconiza que os *Staphylococcus* resistentes à oxacilina, devem ser reportados como resistentes a todos os β -lactâmicos, incluindo cefalosporinas e carbapenens.

O aumento de amostras resistentes à meticilina deixa poucas alternativas para o tratamento das infecções causadas por estes patógenos. Uma das drogas de escolha tem sido a vancomicina, porém já são relatados casos de suscetibilidade reduzida e resistência à esta. Em 2002, no Estado de Michigan nos E.U.A. foi encontrada a primeira amostra de *S. aureus* resistente à vancomicina (VRSA, CIM ≥ 16 $\mu\text{g/mL}$), isolada de cateter proveniente de um paciente portador de diabetes, falência renal e doença vascular. A concentração mínima inibitória para esta amostra foi de >128 $\mu\text{g/ml}$, muito acima dos níveis aceitos pelo NCCLS como suscetíveis. O isolado além de apresentar resistência à vancomicina, também apresentou resistência à oxacilina, porém se mostrou suscetível ao cloranfenicol, linezolida, minociclina, quinupristina/dalfopristina, tetraciclina e trimetoprim/sulfametoxazol.¹⁷

Em outro relato de caso, desta vez na Pensilvânia (E.U.A), foi isolado VRSA de paciente com ulcerações nos pés e osteomielite. A amostra apresentou MIC de 64 $\mu\text{g/mL}$. O isolado continha os genes *vanA* e *mecA*, que codificam, respectivamente, resistência à vancomicina e meticilina. O isolado apresentou suscetibilidade ao cloranfenicol, linezolida, minociclina, quinulpristina-dalfopristina, rifampicina e sulfametoxazol-trimetoprim.¹⁸

Dois anos depois, foi relatado a terceira cepa de VRSA isolada desta vez de

urocultura.¹⁹ O isolado possuía CIM de 64µg/mL, e novamente era resistente à oxacilina e suscetível à rifampicina, cloranfenicol, sulfametoxazol-trimetoprim, linezolida e minociclina.

No Brasil, Oliveira et al.²⁰ relataram o isolamento de 05 amostras com resistência intermediária a vancomicina, de um total de 140 amostras MRSA analisadas. Este estudo foi realizado em um hospital com um total de 178 leitos, localizado na cidade de São Paulo. As amostras que apresentaram resistência intermediária a vancomicina foram isoladas de pacientes internados na enfermaria de pacientes queimados e da enfermaria de ortopedia. A CIM obtida destes isolados foi de 8 µg/mL, caracterizada através dos testes de macrodiluição, E-teste e diluição da droga em ágar.

Outro relato, desta vez em amostras de *Staphylococcus* coagulase-negativa provenientes de pacientes saudáveis foi descrito por Palazzo et al.²¹ Um total de quatro amostras de *Staphylococcus* spp. (1 *S. epidermidis*, 1 *S. haemolyticus* e 2 *S. capitis*) resistentes a vancomicina foram isoladas de trabalhadores de uma escola particular e de um hospital localizado na região de Ribeirão Preto. A concentração inibitória mínima que estas amostras apresentaram quando testadas pela técnica de E-test variou entre 16 µg/mL e ≥256 µg/mL.

Dado o surgimento de amostras resistentes à vancomicina, relacionada ao fato de que estas também se apresentam resistentes à meticilina, o melhor conhecimento dos mecanismos que envolvem a resistência à meticilina se faz necessário. A resistência a esta droga é uma característica de caráter cromossomal, e codificada por um gene conhecido por *mecA*, e regulado por outros dois, que levam os nomes de *mecI* e *mecRI*.²² Esses genes estão presentes em um elemento genético móvel chamado cassete cromossômico estafilocócico *mec* (*SCCmec*). Além dos elementos genéticos *mec*, responsáveis pela resistência a meticilina estão presentes os complexos *ccr*, responsáveis pela incisão e excisão do cassete no genoma bacteriano,^{23,24} e se dividem em 05 diferentes tipos de cassetes denominados *SCCmec* I, II, III,

IV, e V.

Para inativar as bactérias, muitos antibióticos se ligam às proteínas ligadoras de penicilina (PBP) de forma a torná-las inativas. Essas proteínas estão envolvidas na construção da parede celular dos microrganismos e sem a parede corretamente montada, as bactérias não podem manter sua integridade e morrem. Enquanto normalmente as amostras de *S. aureus* empregam três proteínas ligadoras de penicilina, PBPs 1, 2 e 3 na síntese da parede celular, os estafilococos resistentes à meticilina ou oxacilina (MRSA) possuem um PBP suplementar, PBP 2' ou PBP 2a. Portanto, quando o gene *mecA* está presente, a célula é capaz de crescer na presença de oxacilina e de outros β -lactâmicos.^{4, 25}

Embora a resistência mediada pelo gene *mecA* esteja presente em todas as células da população com resistência intrínseca, esta pode ser somente expressa por uma pequena percentagem delas, levando ao que se chama de resistência heterogênea. A expressão de resistência nas linhagens com resistência intrínseca tem sido categorizadas em quatro classes de expressão fenotípica, classes 1 a 4, com a classe 01 sendo a mais heterogênea e a 04 mais homogênea.²⁶

A grande maioria das células (99,9 ou 99,99%) na cultura de linhagens com resistência heterogênea de classe 01 apresentam concentração inibitória mínima (CIM) de 1,5 a 3 $\mu\text{g/ml}$, mas essa cultura também contém um baixo número de bactérias (10^{-7} a 10^{-8}) que poderiam formar colônias mesmo na presença de 25 $\mu\text{g/ml}$ ou mais de oxacilina. Nas culturas de linhagens de classe 2, a maioria das células ($\geq 99,9\%$) apresentam CIM de 6 a 12 $\mu\text{g/ml}$, e nessas culturas a frequência de células altamente resistentes (capazes de crescer na presença de 25 $\mu\text{g/ml}$) é maior (10^{-5}) do que as linhagens de classe 1.²⁶ As culturas de linhagens de classe 3 são compostas de bactérias (99 a 99,9%) que apresentam altos níveis de resistência à oxacilina (CIM = 50 a 200 $\mu\text{g/ml}$), mas geralmente possuem uma subpopulação (10^{-3}) de células altamente resistentes, capazes de formar colônias mesmo na presença de 300 a 400 μg

de oxacilina/mL. As culturas de classe 4 são compostas de células com resistência homogênea, com todas as células apresentando altos níveis de resistência, com CIM de 400 a 1000 µg/ml.²⁷

Outras modalidades de resistência têm também sido descritas em linhagens que não apresentam o gene *mecA* e são denominadas *borderline*. A resistência *borderline* pode ser devido a dois mecanismos, o primeiro seria a inativação de oxacilina mediada pela hiperprodução de β-lactamase²⁸ e o segundo é a resistência modificada, chamada de MOD-SA, mediada pela alteração das PBPs intrínsecas com afinidade para a oxacilina alterada.²⁷ Essas modalidades de resistência apresentam baixo nível de resistência, CIM de 8 µg/ml.²⁵

Os testes de triagem para a detecção de amostras suscetíveis ou resistentes à oxacilina são de fundamental importância, uma vez que já foram relatados casos de resistência à vancomicina, restando poucos antibióticos para a profilaxia destas infecções. A resistência à oxacilina tem sido um grande problema na terapêutica dos estafilococos, principalmente devido ao fato da expressão heterogênea da resistência à oxacilina.²⁹

A resistência à oxacilina pode ser detectada através de inúmeros métodos fenotípicos e genotípicos, tais como difusão em discos com oxacilina e cefoxitina, diluição em caldo, E-test, aglutinação em látex e PCR; sendo os métodos genotípicos considerados padrão ouro para a detecção de resistência à oxacilina em estafilococos. Embora os métodos genotípicos possuam alta sensibilidade e especificidade, não são acessíveis a todos os laboratórios de microbiologia. Os métodos de referência preconizados pelo CLSI para a detecção de resistência à oxacilina em *S. aureus* incluem a determinação da CIM pelo método de diluição da droga em ágar ou em caldo, o método de difusão com disco, o teste de triagem com ágar Mueller-Hinton (MH) adicionado de 4% de NaCl e 6µg/ml de oxacilina e mais recentemente o teste de difusão com disco de cefoxitina.^{28,30,31}

Contudo, durante muito tempo diversos métodos fenotípicos que se utilizavam da

oxacilina para avaliar a resistência de cepas de *S. aureus* foram utilizados. Em estudo realizado por Tveten et al ²⁹ o teste de diluição em ágar obteve sensibilidade de 97,6% e especificidade de 95,4% e o E-test apresentou sensibilidade de 100% e especificidade de 95,4% demonstrando com estes dados que o E-test pode ser considerado um bom teste fenotípico para a determinação da resistência de *S. aureus*.

Segundo Swenson ²⁵ em um artigo de revisão sobre novas técnicas de detecção de resistência à meticilina, os métodos fenotípicos possuem grande sensibilidade, contudo esta não chega à taxa de 100%. Os mesmos autores ainda afirmam que os testes utilizando discos de difusão apresentam baixa sensibilidade, citando taxas que variam de 61 a 88,5%. Estudos que avaliaram o desempenho da difusão em disco para a detecção de MRSA mostraram que este método é menos confiável para linhagens heterogêneas. Os estudos que usaram linhagens confirmadas com heterogêneas, relataram uma sensibilidade de 61% de um total de 80 linhagens *mecA* positivas, sendo muitas heterogêneas. Um outro estudo relatou uma sensibilidade de 88,5% para linhagens de classe 1 (extremamente heterogêneas) e de 96,4% para linhagens de classe 2.³²

O desempenho do método de triagem em ágar MH suplementado com 4% de NaCl e 6 µg/ml de oxacilina também é dependente do grau de heterogenicidade das linhagens utilizadas, com valores menores de sensibilidade ($\leq 95\%$) em estudos com maior número de linhagens heteroresistentes, mas com valores de $> 97\%$ relatados por outros estudos.^{23,30,31}

Contudo, trabalhos recentes que avaliaram discos de cefoxitina na detecção da resistência à meticilina obtiveram bons resultados, com taxas de sensibilidade em torno de 100% e especificidade de 99%.^{34,35,36,37} Cauwelier et al ³⁵ realizaram trabalho no qual foram avaliados 155 amostras clínicas de MRSA com relação à resistência pela meticilina através de diversos métodos, tais como discos de oxacilina, aglutinação em látex e teste de triagem, obtendo no teste com discos de cefoxitina sensibilidade de 100% e especificidade de 99%,

enquanto que nos testes com discos de oxacilina estes valores caíram para 91,7% de sensibilidade.

Com o aumento do número de amostras de *S. aureus* resistentes à meticilina, deixando como única alternativa o uso de vancomicina, e inclusive o surgimento de amostras com níveis de suscetibilidade reduzidos a esta, o estudo dos níveis de resistência a meticilina em amostras de *S. aureus* provenientes do nosso meio se faz necessário para guiar a terapia e prevenir que o paciente seja desnecessariamente tratado com vancomicina. Esse estudo tem como objetivo principal a determinação da sensibilidade à oxacilina em amostras de *S. aureus* isoladas de pacientes do Hospital das Clínicas (HC) da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) por diferentes métodos indicados para otimizar o isolamento de MRSA.

2. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

O Objetivo geral deste trabalho foi determinar a sensibilidade à oxacilina em amostras de *S. aureus* isoladas de pacientes do Hospital das Clínicas (HC) da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) por diferentes métodos indicados para otimizar o isolamento de MRSA e a determinação da concentração inibitória mínima à Eritromicina, Netilmicina, Trimetoprim-Sulfametoxazol, Oxacilina e Vancomicina pelo método de E-test.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolamento e identificação de amostras de *Staphylococcus aureus* de pacientes do HC da FMB;
- Determinação de resistência à oxacilina em amostras de *S. aureus* pelo método de difusão da droga em ágar com disco de oxacilina e cefoxitina;
- Determinação de resistência à oxacilina em amostras de *S. aureus* pelo método de triagem;
- Detecção do gene *mecA* nas amostras de *S. aureus* estudadas;
- Determinação da produção de β -lactamase em amostras de *S. aureus*;
- Determinação da hiperprodução de β -lactamase em amostras de *S. aureus*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Amostras

Foram utilizadas 102 amostras de *Staphylococcus aureus* previamente isoladas e estocadas em coleção de cultura; provenientes de hemoculturas de pacientes internados em diversas enfermarias do HC da FMB durante os anos de 2002 a 2006. O isolamento das linhagens foi realizado conforme as normas descritas por Koneman et al.³⁸

3.2. Identificação de *S. aureus*

Os isolados, obtidos a partir de espécimes clínicos e previamente estocados em coleção de cultura foram semeados em ágar sangue e corados pelo método de Gram objetivando-se sua pureza e a observação de sua morfologia e coloração específica. Após a confirmação dessas características, as linhagens foram submetidas às provas de catalase e coagulase. As provas de fermentação de açúcares maltose, trealose, manitol e resistência à polimixina B foram realizadas a fim de diferenciar *S. aureus* de outros *Staphylococcus* coagulase-positiva, como *S. intermedius*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans* e *S. hyicus*. Posteriormente à confirmação da espécie as amostras foram conservadas em caldo nutriente com glicerol a -70°C.

As amostras com problemas na identificação fenotípica foram submetidas à técnica de PCR para amplificação do gene *Sa 442*, específico da espécie *S. aureus*, seguindo o protocolo descrito por Martineau et al.³⁹, no qual é utilizado os primers *Sa442-1* (5'-AAT CTT TGT CGG TAC ACG ATA TTC TTC ACG-3') e *Sa442-2* (5'-CGT AAT GAG ATT TCA GTA GAT AAT ACA ACA-3').

3.3. Determinação de amostras de *S. aureus* resistentes a metilina-oxacilina (MRSA)

3.3.1. Técnica de difusão da droga em ágar com disco de oxacilina e cefoxitina

O teste de sensibilidade à oxacilina foi realizado pela técnica da difusão da droga em ágar a partir de discos impregnados conforme critérios recomendados pelo Clinical Laboratory Standards Institute-CLSI.¹⁶ Para o preparo dos inóculos foram utilizadas culturas em caldo BHI, previamente incubadas por 24 horas e posteriormente ajustadas com a turbidez da escala 0,5 de MacFarland. Os discos utilizados foram: Oxacilina (1 µg) e Cefoxitina (30 µg).

Uma vez ajustada a densidade do inóculo, a semeadura foi feita através de swab estéril na superfície de ágar Mueller-Hinton, e a seguir aplicados os discos impregnados com as drogas. As placas foram incubadas a temperatura de 35°C por 24 horas sendo a atividade do antimicrobiano avaliada pelo diâmetro do halo de inibição e interpretação com base nas normas estabelecidas pelo CLSI.^{16, 44} A linhagem padrão de *S. aureus* ATCC 29213 (sensível à oxacilina, gene *mecA* negativo) e ATCC 33591 (resistente à oxacilina, gene *mecA* positivo) foram utilizadas como controle em todos os experimentos.

3.3.2. Teste de triagem em Ágar Mueller-Hinton com 6 µg/ml de oxacilina e 4% de NaCl

Para verificação de resistência de *S. aureus* à oxacilina foi utilizado o meio de triagem preparado com ágar Mueller-Hinton adicionado de 6 µg/ml de oxacilina e 4% de NaCl.¹⁶ Para o preparo dos inóculos foram utilizadas culturas em caldo BHI previamente incubadas por 24 horas e posteriormente ajustadas com a turbidez da escala 0,5 de MacFarland. Após o preparo do inóculo as linhagens foram semeadas na forma de *spots* sobre a superfície do ágar com o auxílio de swab estéril. As placas foram incubadas por 24h a uma temperatura de 35°C e a detecção de *S. aureus* resistentes a metilina (MRSA) verificada através do crescimento de

pelo mesmo uma colônia na superfície do ágar.

3.4. Detecção do gene *mecA* de resistência à meticilina em *S. aureus*

3.4.1. Extração do Ácido Nucléico

O ácido nucléico total foi extraído a partir de linhagens de *S. aureus* cultivadas em ágar sangue e inoculadas individualmente em caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI) e incubadas a 37°C por 24 h. A extração foi realizada com o Kit GFX (GE Healthcare) que consiste na digestão inicial das células de estafilococos com lisozima (10 mg/mL) e proteinase K (20 mg/mL). A seguir 500 µL da solução de extração foi adicionada à mistura e esta foi centrifugada a 5.000 x g por 1 min. Em seguida o sobrenadante foi transferido para a coluna GFX e centrifugado a 5.000 x g por 1 min. O líquido coletado foi descartado e 500 µL de solução de extração foi adicionado novamente à coluna. Após a centrifugação e descarte do líquido coletado, 500 µL da solução de lavagem foi adicionada à coluna e esta submetida à centrifugação a 14.000 x rpm por 3 min. A seguir, a coluna foi transferida para um tubo de 1,5 mL e 200 µL de água Milli Q aquecida a 70°C foi utilizada para a eluição. As amostras foram centrifugadas a 5000 x g por 1 minuto, e a coluna de GFX desprezada. O DNA extraído foi guardado sob refrigeração a 4°C.

3.4.2. Amplificação do ácido nucléico (PCR)

As reações de PCR foram realizadas em tubos de microcentrífuga de 0,5 mL em volumes totais de 25 µL contendo 10 pmol de cada *primer* (Tabela 1), 2,0 U de Taq DNA polimerase, 100 µM de desoxiribonucleotídeos trifosfatados, 10 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 0,75 mM de MgCl₂ e 3µL de ácido nucléico. A incubação foi realizada em termociclador apropriado, empregando os parâmetros descritos por Murakami et al ⁴⁰ que consistiram de: 40 ciclos de desnaturação a 94°C por trinta segundos, anelamento dos *primers* a 55,5°C por trinta

segundos e extensão a 72°C por um minuto. Após completar os 40 ciclos, os tubos foram incubados a 72°C por cinco minutos antes de resfriar à 4°C. Em todas as reações realizadas foram utilizadas linhagens de referência internacional com controle positivo (*S. aureus* ATCC 33591) e negativo (*S. aureus* ATCC 29213).

3.4.3. Visualização dos produtos amplificados

A eficiência das amplificações foi monitorada pela eletroforese da reação em gel de agarose 2% preparado em tampão 1,0 X TBE e corado com Brometo de Etídeo. O tamanho dos produtos amplificados foi comparado com o padrão de 100 bp e posteriormente fotografados sob transiluminação UV.

Tabela 1: Oligonucleotídeos para a detecção do gene *mecA*.

Função	Nome	Sequência de nucleotídeos 5' a 3'	Produto amplificado
Primer	<i>mecA1</i>	AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG	533 bp
Primer	<i>mecA2</i>	AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG	533 bp

Fonte: Murakami et al ⁴⁰

3.5. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) às drogas pelo método de E-test

A sensibilidade *in vitro* das amostras de *Staphylococcus aureus* foi testada para as seguintes drogas: oxacilina, netilmicina, eritromicina, trimetoprim-sulfametaxazol e vancomicina. Para tanto, foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) dessas drogas, através do E-test. Este procedimento é um método quantitativo, que utiliza tira de plástico inerte, transparente, medindo 60 mm de comprimento por 5,5 mm de largura, na qual é incorporado um gradiente de concentração estabilizado do antimicrobiano a ser pesquisado. A concentração das diversas drogas no E-test varia de 0,016 a 256 µg /mL para a oxacilina, eritromicina, netilmicina e vancomicina; e 0,002 a 32 µg /mL para o trimetoprim-sulfametoxazol com proporção de 1/19, respectivamente. Os parâmetros técnicos envolvidos na realização do E-test são: meio de cultura de Mueller-Hinton, inóculo com concentração final semelhante à turvação correspondente a escala 0,5 de MacFarland; incubação das placas em aerobiose a 35°C; leitura pela verificação na escala da parte anterior da fita do valor correspondente à intersecção da zona de elipse de inibição do crescimento bacteriano. As drogas foram consideradas sensíveis e resistentes de acordo com os *breakpoints* (µg/mL) indicado pelo CLSI (2005) (netilmicina ≤ 12 sensível, ≥ 32 resistente; vancomicina ≤ 4 sensível, ≥ 32 resistente; oxacilina ≤ 2 sensível, ≥ 4 resistente; eritromicina $\leq 0,5$ sensível, ≥ 8 resistente; trimetoprim-Sulfametoxazol $\leq 2/38$ sensível, $\geq 8/152$ resistente).

Na descrição dos resultados as amostras que apresentaram níveis intermediários foram consideradas resistentes. Os resultados do estudo das CIMs das diversas drogas foram expressos por meio de: CIM 50% (Concentração de droga necessária para inibição de 50% da população bacteriana testada); CIM 90% (Concentração necessária para inibição de 90% da população bacteriana); faixa de variação das CIMs e proporção de amostras sensíveis a cada droga, de acordo com definição do CLSI.¹⁶

3.6. Determinação da produção de β -lactamase

A produção de β -lactamase em amostras de *S. aureus* foi detectada através do uso de discos impregnados com Nitrocefina (Cefalosporina cromogênica-cefinase BBL). O disco foi umedecido com uma a duas gotas de água destilada estéril e depositado sobre as colônias de *S. aureus* previamente incubadas a 35°C/24h na placa de ágar Mueller-Hinton com fita de E-test de oxacilina. A reação positiva foi evidenciada pelo desenvolvimento de uma coloração vermelha e a negativa pela não alteração de cor. Para as linhagens β -lactamases negativas, a reação foi reexaminada após uma hora, conforme recomendações do fabricante. Para a correta análise dos resultados, os discos em testes foram sempre comparados com o disco não usado. Foram utilizadas linhagens de referência internacional com controle positivo (*S. aureus* ATCC 33591 e *S. aureus* ATCC 29213) e controle negativo (*S. xylosus* ATCC 29979).

3.7. Hiperprodução de β -lactamase

Para verificar a hiperprodução de β -lactamase, as amostras de *S. aureus* foram testadas com um disco de amoxicilina (20 μ g) e ácido clavulânico (10 μ g). O *breakpoint* para sensibilidade foi a formação de um halo de inibição de ≥ 20 mm após 24h de incubação à 35°C.⁴¹

3.8. Análise Estatística

Para comparar os métodos de difusão da droga com disco de oxacilina e cefoxitina, o método de triagem (Mueller-Hinton acrescido de 6 μ g/mL de oxacilina mais 4% de NaCl) e E-test com a técnica de PCR, considerada padrão ouro para a detecção de resistência intrínseca à oxacilina (detecção do gene *mecA*), foram aplicados testes de avaliação de sensibilidade e especificidade,^{42,43} conforme descrição abaixo:

- Sensibilidade (S): proporção de amostras de *S. aureus* positivas pela técnica de PCR (detecção do gene *mecA*) e que apresentaram resistência a oxacilina pelos

métodos fenotípicos testados, difusão da droga com disco de oxacilina e cefoxitina, triagem (Mueller-Hinton acrescido de 6 µg/mL de oxacilina mais 4% de NaCl) e E-test.

- Especificidade (E): proporção de amostras de *S. aureus* negativas pela técnica de PCR (não detecção do gene *mecA*) e que apresentaram sensibilidade a oxacilina pelos métodos fenotípicos, incluindo a difusão da droga com disco de oxacilina e cefoxitina, triagem (Mueller-Hinton acrescido de 6 µg/mL de oxacilina mais 4% de NaCl) e E-test.

4. RESULTADOS

4.1. Identificação de *S. aureus*

Um total de 102 amostras foram identificadas como *S. aureus*, baseado em características morfológicas, bioquímicas e genotípicas. Das 102 amostras incluídas neste estudo, 47 não apresentaram resistência a polimixina B, um dos critérios para a diferenciação da espécie *S. aureus* de outros estafilococos coagulase positivos³⁸. Estas amostras foram testadas pela técnica de PCR para detecção do gene *Sa442* e todas apresentaram resultado positivo.

4.2. Determinação de amostras de *S. aureus* resistentes a meticilina-oxacilina (MRSA)

4.2.1. Técnica de difusão da droga em ágar com disco de oxacilina e cefoxitina

Conforme os critérios do CLSI¹⁹ as amostras que apresentaram o diâmetro do halo de inibição menor ou igual a 10 mm para o disco de oxacilina (1 µg) foram consideradas resistentes, as amostras com diâmetro de 11-12mm, classificadas como intermediárias pelo CLSI foram consideradas resistentes, e as que apresentaram halo maior ou igual a 13 mm foram consideradas sensíveis. Para o disco de cefoxitina (30 µg) as amostras com o diâmetro do halo menor ou igual a 21 mm foram consideradas resistentes, e sensíveis as que apresentaram o diâmetro do halo de inibição maior ou igual a 22 mm.⁴⁴

De um total de 102 amostras de *S. aureus* provenientes de hemoculturas de pacientes internados em várias enfermarias do Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, 45 amostras (44,1%) foram resistentes ao disco de oxacilina, e 57 (55,9%) foram sensíveis a oxacilina através desta metodologia (Tabela 2 e Figura 1). Com o disco de cefoxitina, um total de 47 (46,1%) foram resistentes e 55 amostras (53,9%) sensíveis (Tabela

2 e Figura 1). A Figura 2 apresenta uma amostra de *S. aureus* utilizada neste estudo que apresentou sensibilidade à oxacilina detectada pelo método de difusão da droga com discos de oxacilina e cefoxitina. A Figura 3 apresenta a linhagem de *S. aureus* ATCC 29213 que foi utilizada como controle negativo (sensível a oxacilina: *mecA* -) e a Figura 4 mostra a cepa de *S. aureus* ATCC 33591 utilizada como controle positivo (resistente a oxacilina: *mecA* +).

Tabela 2. Resistência à oxacilina avaliada através dos discos de difusão de oxacilina e cefoxitina.

	Oxacilina (1µg)		Cefoxitina (30 µg)	
	N	%	N	%
MRSA ^a	45	44,1	47	46,1%
MSSA ^b	57	55,9	55	53,9%
Total	102	100	102	100

^a: MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina

^b: MSSA: *Staphylococcus aureus* sensível à oxacilina

N: Número de amostras

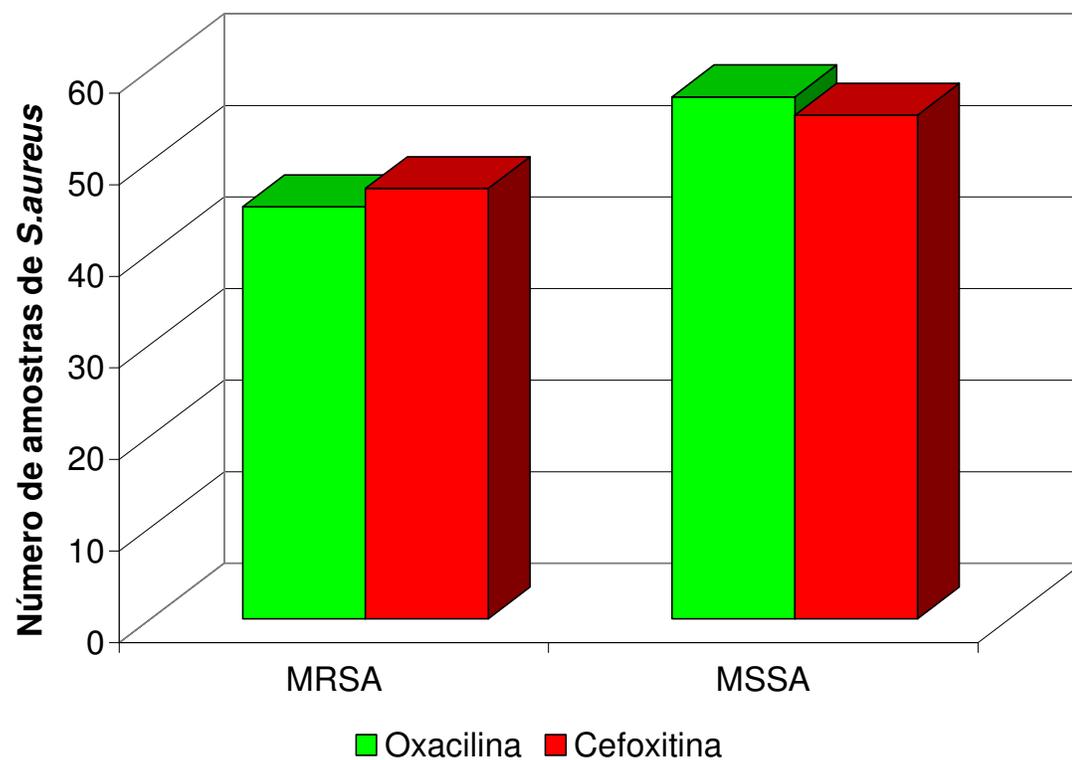


Figura 1. Determinação da resistência à oxacilina em amostras de *S. aureus* pelo método de difusão da droga em ágar com disco de oxacilina e cefoxitina.



Figura 2. Amostra de *S. aureus* sensível à oxacilina detectada pelo método de difusão da droga com discos de oxacilina e cefoxitina.



Figura 3. *S. aureus* ATCC 29213 utilizada como controle negativo (sensível a oxacilina)



Figura 4. *S. aureus* ATCC 33591 utilizada como controle positivo (resistente a oxacilina)

4.2.2. Teste de triagem em Ágar Mueller-Hinton com 6 µg/mL de oxacilina e 4% de NaCl

De um total de 102 amostras analisadas, 47 (46,1%) foram resistentes a oxacilina através do teste de triagem, e 55 (53,9%) foram sensíveis (Figura 5). Como controle negativo, foi utilizado a cepa ATCC 29213 e como controle positivo a cepa ATCC 33591. A Figura 6 apresenta duas amostras de *S. aureus* utilizadas no presente estudo. A amostra indicada com a letra A apresentou resistência à oxacilina pelo método de triagem, e a amostra indicada com a letra B foi sensível.

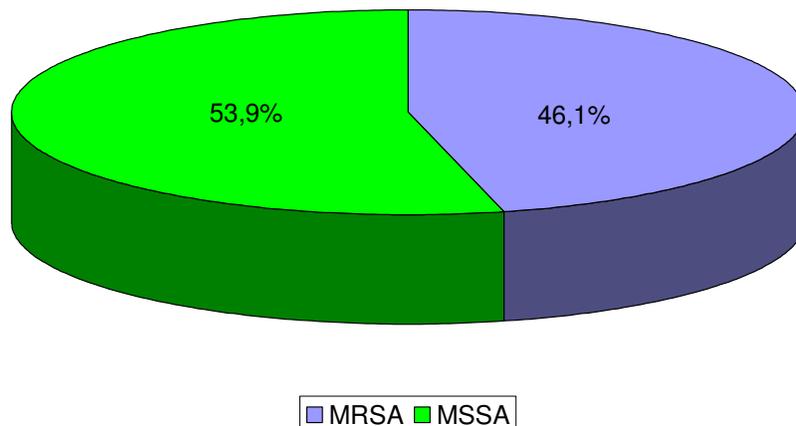


Figura 5. Resistência à oxacilina pelo teste de triagem (Mueller-Hinton com 6 µg/ml de oxacilina e 4% de NaCl)



Figura 6. A: Amostra de *S. aureus* utilizada em nosso estudo resistente à oxacilina pelo teste de triagem. B: amostra de *S. aureus* utilizada em nosso estudo sensível à oxacilina pelo método de triagem.

4.3. Detecção do gene *mecA* de resistência à meticilina em *S. aureus*

De um total de 102 amostras analisadas, 46 amostras (45,1%) foram positivas para o gene *mecA* (Figura 7 e Tabela 3). Deste total, 42 (91,3%) amostras se mostraram positivas quando testadas pelo método de difusão com disco de cefoxitina, 40 (86,9%) amostras se mostraram resistentes com o disco de oxacilina e 42 (91,3%) pelo método de triagem (Tabela 3).

Os resultados mostraram que 05 amostras que foram resistentes à oxacilina em todos os testes fenotípicos utilizados foram negativas para a presença do gene *mecA* (Tabela 4). A técnica de PCR para a detecção do gene *mecA* foi repetida concomitantemente com os testes fenotípicos e confirmaram-se estes resultados para essas amostras.

As figuras 8 e 9 mostram fotos de eletroforese em gel de agarose para pesquisa do gene *mecA* (533 bp) em amostras de *S. aureus* pela técnica de PCR.

Tabela 3. Determinação da sensibilidade à oxacilina em amostras de *S. aureus* por métodos fenotípicos e genotípico.

PCR ^a	Métodos fenotípicos															
	Disco Difusão								Triagem ^b				E-test			
	Oxacilina				Cefoxitina				Triagem ^b				E-test			
	S		R		S		R		S		R		S		R	
N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	
<i>mecA</i> +	6	5,9	40	39,2	4	3,9	42	41,2	4	3,9	42	41,2	1	1,0	45	44,1
(N=46)																
<i>mecA</i> -	51	50	5	4,9	51	50	5	4,9	51	50	5	4,9	51	50	5	4,9
(N=56)																
Total	57	55,9	45	44,1	55	53,9	47	46,1	55	53,9	47	46,1	52	51,0	50	49,0
(N=102)																

a: Reação em Cadeia da Polimerase

b: Ágar Mueller- Hinton com 6 µg/mL de oxacilina + 4% de NaCl

Oxacilina S (1µg): ≥13 mm - sensível

Oxacilina R (1µg): ≤12 mm - resistente

Cefoxitina S (30µg): ≤21 mm - resistente

Cefoxitina R (30µg): ≥22 mm - sensível

S: amostra sensível à oxacilina

R: amostra resistente à oxacilina

Tabela 4. Amostras positivas em testes fenotípicos para a detecção de resistência à oxacilina e negativas para a pesquisa de gene *mecA*.

Amostra	<i>mecA</i>	Triagem ^a	Disco oxacilina ^b	Disco cefoxitina ^c	E-test ^d (µg/mL)	AMC ^e	β-lactamase
H-2057/02	-	+	0mm (R)	10mm (R)	>256	22 (S)	positivo
H-1970/05	-	+*	12mm (R)	17mm (R)	>256**	22 (S)	positivo
H-30292/05	-	+	0mm (R)	0mm (R)	>256	29 (S)	positivo
H-1257/06	-	+	0mm (R)	0mm (R)	>256	27 (S)	positivo
H-4914-21/06	-	+	0mm (R)	0mm (R)	>256	27 (S)	positivo

a: Agar Mueller- Hinton com 6µg/mL de oxacilina + 4% de NaCl

b: ≤12 (resistente); ≥13 (sensível)

c: ≤21 (resistente); ≥22 (sensível)

d: "Breakpoint" ≥ 4µg/mL (resistente), ≤ 2µg/mL (sensível)

e: Amoxicilina + Acido clavulânico: ≤ 20mm (resistente), ≥21 mm (sensível)

*: Pouco Crescimento

** : Crescimento dentro da elipse de inibição

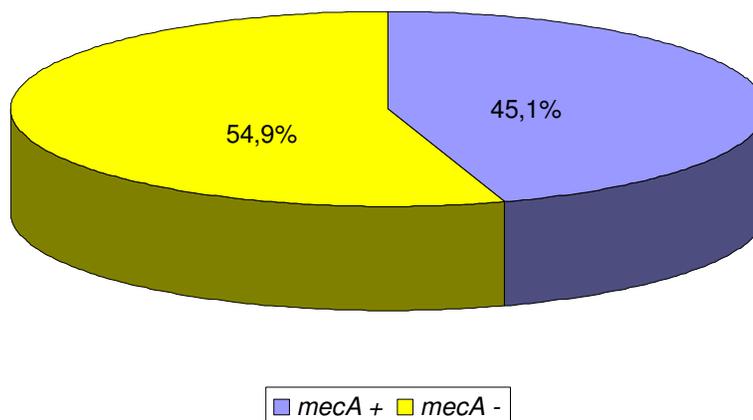


Figura 7. Presença do gene *mecA* em amostras de *S. aureus* provenientes do HC-FMB,UNESP.

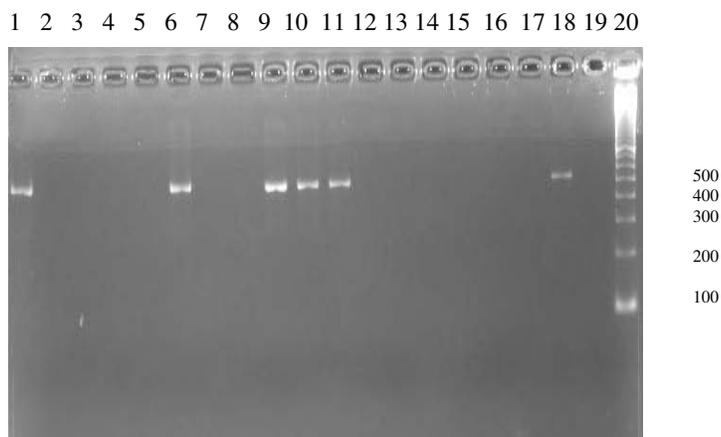


Figura 8. Eletroforese em gel de agarose para pesquisa do gene *mecA* (533 bp) em amostras de *S. aureus* pela técnica de PCR. 1, 6, 9, 10, 11: amostras positivas. 2, 3, 4, 5, 7, 8, 12, 13, 14, 15, 16: amostras negativas. 17: Controle negativo *S. aureus* ATCC 29213. 18: Controle positivo *S. aureus* ATCC 33591. 19: H₂O. 20: marcador de peso molecular (100bp).

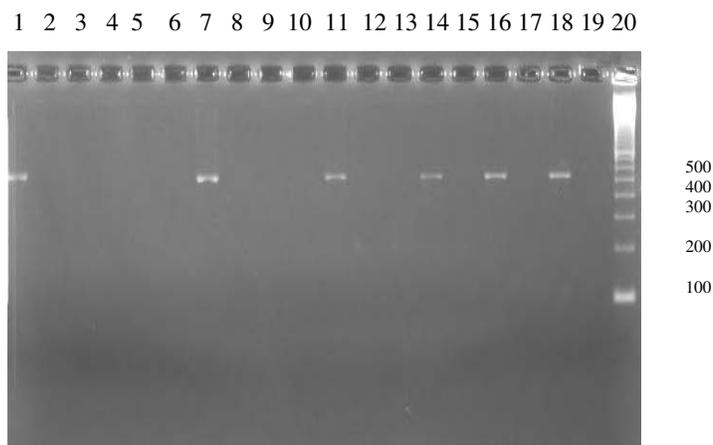


Figura 9. Eletroforese em gel de agarose para pesquisa do gene *mecA* (533 bp) em amostras de *S. aureus* pela técnica de PCR. 1, 7, 11, 14, 16: amostras positivas. 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 12, 13, 15: amostras negativas. 17: Controle negativo *S. aureus* ATCC 29213. 18: Controle positivo *S. aureus* ATCC 33591. 19: H₂O. 20: marcador de peso molecular (100bp).

4.4. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) às drogas pelo método de E-test

De um total de 102 amostras de *S. aureus* analisadas, 50 (49,0%) foram resistentes a oxacilina pela técnica de E-test. Estas amostras também foram testadas com relação à eritromicina, com 56 (54,9%) amostras resistentes a esta droga, netilmicina, com 42 (41,2%) amostras resistentes, trimetoprim-sulfametoxazol com 46 amostras resistentes (45,1%) e vancomicina com todas as amostras sensíveis (Tabela 5 e Figura 10). Um total de 06 amostras MRSA foram detectadas pela técnica de E-test através da presença de colônias dentro da elipse de inibição, sugerindo a heteroresistência dessas amostras. Com relação à distribuição da resistência a estas drogas em amostras MRSA e MSSA, os resultados mostraram diferença estatisticamente significativa entre estes dois grupos, com maior percentual de resistência a eritromicina, netilmicina, e trimetoprim-sulfametoxazol nas amostras MRSA. A eritromicina apresentou maior taxa de resistência em amostras MRSA, com 41(89,1%) amostras resistentes, seguido pelo trimetoprim-sulfametoxazol, com 40(86,9%) amostras resistentes e 36(78,3%) amostras resistentes à netilmicina (Tabela 5 e Figura 10). A Figura 11 mostra uma amostra de *S. aureus* resistente a eritromicina, netilmicina, oxacilina, trimetoprim-sulfametoxazol e produtora de β -lactamase. A Figura 12 mostra uma amostra de *S. aureus* sensível a todas as drogas avaliadas e produtora de β -lactamase.

Tabela 5. Resistência a drogas em amostras MRSA e MSSA detectadas pelo E-test.

Drogas	MRSA N=46		MSSA N=56		Total N=102		valor p
	N	%	N	%	N	%	
Eritromicina	41	89,1	15	26,8	56	54,9	<0,001
Netilmicina	36	78,3	6	10,7	42	41,2	<0,002
Oxacilina	45	97,8	5	8,9	50	49	<0,003
Trimetoprim- Sulfametoxazol	40	86,9	6	10,7	46	45,1	<0,004
Vancomicina	0	0	0	0	0	0	

MRSA: *S. aureus* resistente à oxacilina pela técnica de PCR (*mecA* +)

MSSA: *S. aureus* sensível à oxacilina pela técnica de PCR (*mecA* -)

Os valores de concentração inibitória mínima encontrados para estas drogas foram para a eritromicina de 3 µg/mL para CIM 50% e >256 µg/mL para CIM 90%; netilmicina com valores de 1,0 µg/mL para CIM 50% e 128 µg/mL para CIM 90%, oxacilina com 0,75 µg/mL para CIM 50% e >256 µg/mL para CIM 90%, trimetoprim-sulfametoxazol (1/19) com 0,094 µg/mL para CIM 50% e >32 µg/mL para CIM 90% e vancomicina apresentando 1,5 µg/mL para CIM 50% e 2 µg/mL para CIM 90% (Tabela 6). O cálculo da CIM 50% e CIM 90% em amostras MRSA e MSSA mostrou diferença para esses dois grupos, com as CIM 50% e CIM 90% da netilmicina e trimetoprim-sulfametoxazol sempre maiores nas amostras MRSA (Tabela 7).

Tabela 6. Concentração Inibitória Mínima das diferentes drogas estudadas

Drogas	Nº de amostras por Faixa de CIM ($\mu\text{g/mL}$)					
	0,023 a 0,094	0,125 a 0,75	0,94 a 32	>32 a >256	CIM 50%	CIM 90%
Eritromicina	34	16	5	47	3	>256
Netilmicina	0	44	18	40	1,0	128
Oxacilina	4	47	1	50	0,75	>256
Trimetoprim- Sulfametoxazol (1/19)	52	3	3	44	0,094	>32
Vancomicina	0	6	96	0	1,5	2

CIM: Concentração Inibitória Mínima

Tabela 7. Concentração Inibitória Mínima em amostras MRSA e MSSA.

Droga	CIM 50% ($\mu\text{g/mL}$)		CIM 90% ($\mu\text{g/mL}$)	
	MRSA N=46	MSSA N=56	MRSA N=46	MSSA N=56
Eritromicina	>256	0,094	>256	>256
Netilmicina	64	0,75	128	16
Oxacilina	>256	0,38	>256	0,75
Trimetoprim- Sulfametoxazol (1/19)	>32	0,064	>32	0,47
Vancomicina	1,5	1,5	2,0	2,0

MRSA: *S. aureus* resistente à oxacilina pela técnica de PCR (*mecA* +)MSSA: *S. aureus* sensível à oxacilina pela técnica de PCR (*mecA* -)

A Tabela 8 apresenta o número de resistências às drogas em amostras MRSA e MSSA, demonstrando a multiresistência em MRSA, com 38 (82,6%) amostras apresentando resistência as três das quatro drogas testadas, com diferença estatisticamente significante quando comparado com as MSSA ($p < 0,001$). Por outro lado entre as amostras MSSA 44(78,5%) foram sensíveis a todas as drogas.

Tabela 8: Número de resistências às drogas em amostras MRSA e MSSA.

Nº de Resistência	MRSA		MSSA		valor p
	N	%			
0R	5	10,9	44	78,6	<0,001
1R	1	2,2	5	8,9	0,346
2R	2	4,3	1	1,8	0,880
3R	38	82,6	6	10,7	<0,001
Total	46	100,0	56	100,0	

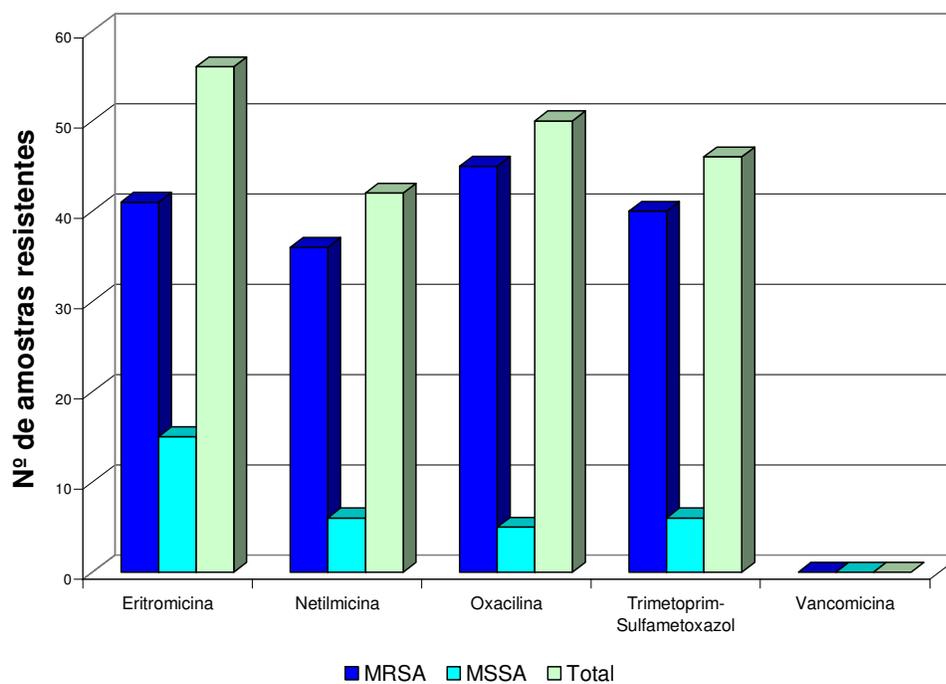
MRSA: *S. aureus* resistente à oxacilina pela técnica de PCR (*mecA* +)MSSA: *S. aureus* sensível à oxacilina pela técnica de PCR (*mecA* -)

Figura 10. Resistência a antimicrobianos em amostras MRSA e MSSA.



Figura 11. Amostra de *S. aureus* resistente a eritromicina, netilmicina, oxacilina, Trimetoprim-Sulfametoxazol e produtora de β -lactamase.



Figura 12. Amostra de *S. aureus* sensível a todas as drogas avaliadas e produtora de β -lactamase.

4.5. Determinação da produção de β -lactamase

Do total de 102 amostras de *S. aureus* incluídas neste estudo, 95 (93%) se apresentaram produtoras de β -lactamase (Figura 13). Um total de 05 amostras foram negativas para o gene *mecA*, contudo foram produtoras de β -lactamase (Tabela 4).

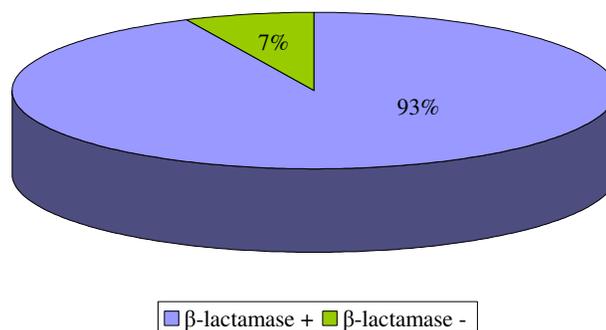


Figura 13. Produção de β -lactamase em amostras de *S. aureus* provenientes do HC-FMB UNESP.

4.6. Hiperprodução de β -lactamase

Das 102 amostras utilizadas no presente estudo, 05 foram negativas para o gene *mecA* e apresentaram resistência à oxacilina quando detectadas por todos os métodos fenotípicos utilizados. Contudo, essas amostras foram positivas para produção de β -lactamase e sensíveis ao disco de amoxicilina-ácido clavulânico, confirmando portanto a resistência à oxacilina mediada pela hiperprodução de β -lactamase (Tabela 4 e Figura 14).

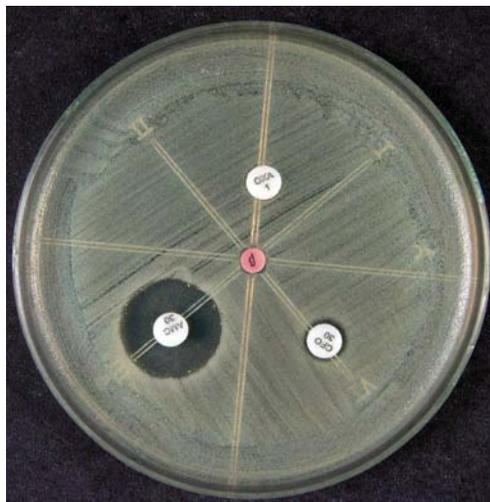


Figura 14. Amostra resistente ao disco de oxacilina e cefoxitina, produtora de β -lactamase e sensível ao disco de amoxicilina-ácido clavulânico

4.7. Distribuição de amostras MRSA entre as enfermarias do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP

De um total de 46 amostras de *S. aureus* resistentes a oxacilina pela técnica de PCR, verificou-se que a distribuição das amostras resistentes a oxacilina foram encontradas principalmente na Unidade de Tratamento Intensivo (UTI) com 7 (15,2%), seguido pela Cirurgia com 06 amostras (13%) e com 05 (10,9%) amostras resistentes em cada uma das Enfermarias de Cardiologia, Clínica Médica Geral e Pronto Socorro. Nas outras Enfermarias o percentual de MRSA variou de 2,2% a 6,5% (Tabela 9), porém não houve diferença estatística significativa.

Tabela 9. Resistência à oxacilina em amostras de *S. aureus* isoladas de pacientes provenientes de diferentes enfermarias do HC da FMB.

Enfermaria	MRSA		MSSA		Valor p
	N	%	N	%	
Cardiologia	5	10,9	2	3,6	0,338
Cirurgia	6	13	8	14,3	0,898
Clinica Médica Geral I, II e III	5	10,9	6	10,7	0,767
Centro de Tratamento Intermediário	3	6,5	2	3,6	0,847
Dermatologia	1	2,2	2	3,6	0,853
Diálise	3	6,5	6	10,7	0,74
Pediatria	1	2,2	0	0	0,93
Moléstias Infecciosas e Parasitárias	1	2,2	4	7,1	0,52
Nefrologia	2	4,3	2	3,6	0,75
Neurologia	2	4,3	1	1,8	0,88
Ortopedia	3	6,5	2	3,6	0,847
Pneumologia	1	2,2	0	0	0,93
Pronto Socorro	5	10,9	15	26,7	0,156
Urologia	1	2,2	1	1,8	0,562
Unidade de Tratamento Intensivo	7	15,2	3	5,3	0,241
Desconhecido	0	0	2	3,6	0,58
Total	46	100	56	100	

4.8. Evolução da resistência a oxacilina no HC da FMB, UNESP no período de 2002 a 2006.

De um total de 102 amostras de *S. aureus* isoladas no período de 2002 a 2006, verificou-se um aumento gradativo no número de amostras resistentes a oxacilina no período de 2002 a 2004 (Tabela 10 e Figura 15). Entretanto, de 2004 a 2006 os resultados revelaram uma redução no número de amostras resistentes, de 55% de MRSA em 2004 para 45% em 2005 e 34,6% em 2006, porém estes dados não mostraram diferença estatística ($p = 0,92$) (Tabela 10 e Figura 15).

Tabela 10. Evolução de Resistência a Oxacilina em amostras de *S. aureus* isoladas de pacientes do HC da FMB no período de 2002 a 2006.

Ano	MRSA		MSSA		p
	N=	%	N=	%	
2002	8	42,1	11	57,9	0,992
2003	9	52,9	8	47,1	0,736
2004	11	55	9	45	0,571
2005	9	45	11	55	0,812
2006	9	34,7	17	65,3	0,458
Total	46	45,1	56	54,9	

MRSA: *S. aureus* resistente à oxacilina pela técnica de PCR (*mecA* +)

MSSA: *S. aureus* sensível à oxacilina pela técnica de PCR (*mecA* -)

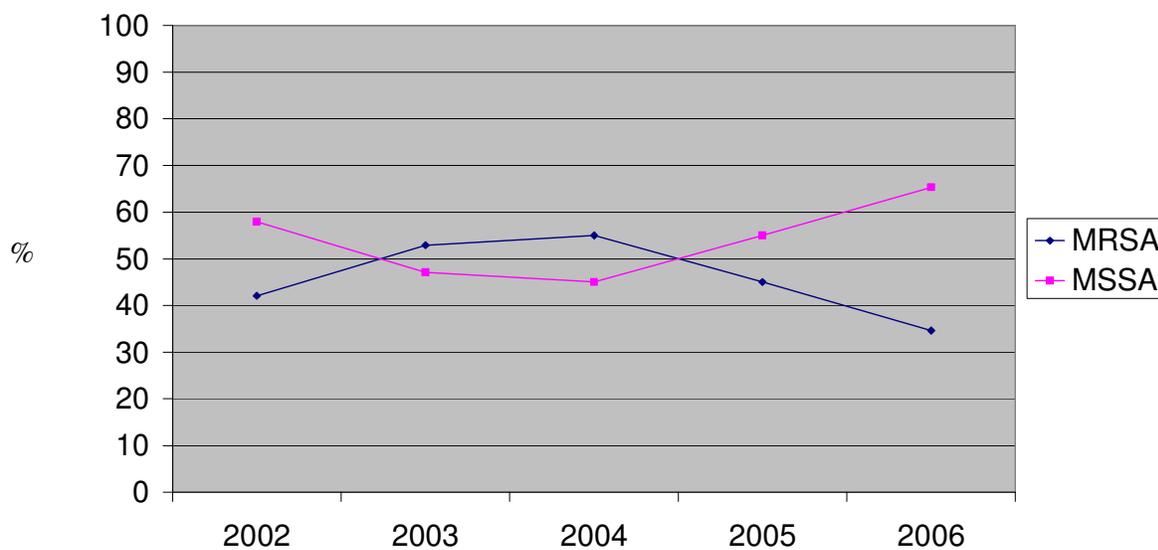


Figura 15. Evolução de resistência à oxacilina em *S. aureus* provenientes do HC da FMB no período de 2002 a 2006.

4.9. Análise Estatística

Foi calculado a sensibilidade e a especificidade dos resultados obtidos pelos métodos fenotípicos de detecção de resistência à oxacilina, utilizando a detecção do gene *mecA* como padrão ouro (Tabela 11). A sensibilidade obtida para o disco de oxacilina foi de 86,9%, com 91,1% de especificidade. O disco de cefoxitina apresentou mesma especificidade, porém com maior sensibilidade (91,3%). O método de triagem também apresentou sensibilidade de 91,3%, contudo o E-test foi o teste que apresentou melhor taxa de sensibilidade (97,8%) superior a dos discos de difusão e ao método de triagem. Com relação aos valores de especificidade, não houve diferença entre os métodos (Tabela 11).

Tabela 11. Comparação da presença do gene *mecA* com os métodos de difusão em ágar com disco de oxacilina, disco de cefoxitina, método de triagem (Ágar Mueller Hinton + 6 µg/mL de oxacilina + 4% NaCl) e E-test.

Metodos fenotípicos	<i>mecA</i>		Sensibilidade %	Especificidade %
	Positivo N=46	Negativo N=56		
Disco Cefoxitina (30 µg)	42	51	91,3	91,1
Disco Oxacilina (1µg)	40	51	86,9	91,1
E-test	45	51	97,8	91,1
Triagem ^a	42	51	91,3	91,1

^a: Ágar Mueller Hinton com 6µg/mL de oxacilina e 4% de NaCl

5. DISCUSSÃO

A prevalência de *Staphylococcus aureus* resistentes a oxacilina (MRSA) nos hospitais tem aumentado na maioria dos países. Em nosso meio, a resistência à oxacilina foi detectada em 46 amostras (45,1%). Esses resultados são semelhantes aos descritos por Wey et al.¹² e Leal et al.,¹³ com taxa de resistência à oxacilina em hospitais universitários em torno de 50%. A resistência intrínseca à oxacilina em *S. aureus* é mediada pela produção de uma proteína ligadora de penicilina (PBP) suplementar (PBP 2' ou PBP 2a), que apresenta baixa afinidade às penicilinas semi-sintéticas, sendo o determinante genético desta proteína de natureza cromossômica, gene *mecA*. Este gene é idêntico em todas as linhagens de *Staphylococcus* e, portanto é um marcador molecular útil de resistência à oxacilina.⁴⁵

A resistência à oxacilina tem sido um grande problema na terapêutica dos estafilococos, principalmente devido ao fato da expressão heterogênea de resistência à oxacilina.²⁹ A identificação de *S. aureus* muitas vezes também pode interferir nos resultados, dificultando ainda mais a detecção de resistência à oxacilina, uma vez que o perfil de resistência a antibióticos para *S. aureus* e as outras espécies coagulase-positivas se apresentam diferentes.

Os métodos de referência preconizados pelo CLSI para a detecção de resistência à oxacilina em *S. aureus* incluem além da detecção do gene *mecA*, a determinação da CIM pelo método de diluição da droga em ágar ou em caldo, o método de difusão com disco, o teste de triagem com ágar Mueller Hinton (MH) adicionado de 6 µg/mL de oxacilina e 4% de NaCl e mais recentemente o teste de difusão com disco de cefoxitina.^{16,30,31} Nossos dados demonstraram uma baixa sensibilidade de detecção de MRSA com disco de oxacilina, com sensibilidade de 86,9%. Segundo Swenson,²⁵ os testes utilizando discos de difusão apresentam baixa sensibilidade, citando taxas que variam de 61 a 88,5%. Estudos que avaliaram o desempenho da difusão em disco para a detecção de MRSA mostraram que este

método é menos confiável para linhagens heterogêneas.³²

A especificidade deste teste demonstrada em nosso estudo foi de 91,1% para o disco de oxacilina. Boutiba-Ben Boubaker et al⁴⁶ relataram taxa de especificidade para o disco de oxacilina de 99,1%, alta quando comparada aos nossos dados. Zhu et al⁴⁷ também descreveram maior taxa de especificidade para o disco de oxacilina, com taxa de 98,3%.

A cefoxitina é considerada um ótimo indutor da expressão do gene *mecA*.⁴⁸ Trabalhos recentes que avaliaram discos de cefoxitina na detecção da resistência a meticilina obtiveram bons resultados, com taxas de sensibilidade em torno de 100% e especificidade de 99%.^{32,33,35} Em nosso estudo, a taxa de sensibilidade do disco de cefoxitina (91,3%) foi maior quando comparada com o disco de oxacilina (86,9%), o que está de acordo com diversos autores que descrevem na literatura melhores resultados para o disco de cefoxitina quando comparado ao disco de oxacilina.

Zhu et al⁴⁷ relataram sensibilidade do disco de cefoxitina em torno de 96,6% e especificidade de 94,9%, taxas superiores às encontradas em nosso estudo, contudo abaixo das taxas de sensibilidade e especificidade relatadas na maioria dos trabalhos, que relatam taxas em torno de 100% de sensibilidade. Uma hipótese para esta diferença na taxa de sensibilidade e especificidade pode estar relacionado com a heterogenicidade das amostras. Embora poucos relatos documentem o grau de heterogenicidade das amostras testadas, é suposto que as linhagens resistentes não detectadas pelos métodos de difusão seriam linhagens mais heterogêneas.

Com relação ao método de triagem, as taxas de sensibilidade e especificidade foram de 91,3% e 91,1%, respectivamente, com resultados similares quando comparado com o método de difusão com disco de cefoxitina. O desempenho do método de triagem em Ágar MH suplementado com 6 µg/mL de oxacilina e 4% de NaCl também é dependente do grau de heterogenicidade das linhagens utilizadas, com valores menores de sensibilidade (< 95%) em

estudos com maior número de linhagens heteroresistentes, mas com valores de > 97% relatados por outros estudos.^{25,32} Perez et al⁴⁷ descrevem em estudo realizado com amostras de hospitais da região sul do país, alta sensibilidade do método de triagem, com taxa de 98,5% e especificidade de 100% quando este é comparado com a detecção do gene *mecA*. Swenson²⁵ em trabalho comparativo entre diversas metodologias para detecção de amostras MRSA, relataram sensibilidade de 90% e especificidade de 92% para o teste de triagem, resultados similares aos encontrados em nosso estudo. Quando condições apropriadas são utilizadas para a detecção laboratorial de MRSA, incluindo a suplementação do Ágar Mueller-Hinton com NaCl e temperatura e tempo adequados, conforme preconizado pelo CLSI, a detecção é obtida sem muitas dificuldades. Entretanto, para as linhagens mais heterogêneas, a detecção pode ser mais difícil, mesmo com os métodos de referência.²⁵

Recentemente, as técnicas moleculares se incorporaram às técnicas de detecção da resistência à oxacilina, com ótimos resultados. Esta se baseia na detecção do gene *mecA*, sendo este o responsável pelo principal mecanismo de resistência a oxacilina, embora não seja o único. Com relação à presença do gene *mecA* nas amostras isoladas em nosso estudo, este foi detectado em 46 (45,1%). Outros autores obtiveram resultados similares em estudo envolvendo hospitais da região sul do país, Perez et al⁴⁷ obtiveram 41,3% de amostras de *S. aureus* positivas para o gene *mecA*.

A técnica de E-test, uma alternativa ao ensaio de microdiluição para determinação da Concentração Inibitória Mínima, apresentou em nosso estudo sensibilidade para a detecção de resistência à oxacilina de 97,8%, superior aos outros testes fenotípicos avaliados, e mesma taxa de especificidade (91,1 %). Ressaltamos o fato de que 06 amostras resistentes à oxacilina pela técnica de E-test apresentaram heteroresistência, com a presença de pequenas colônias na elipse de inibição, o que deve ser levado em consideração pelo técnico na hora da leitura do teste, pois a desconsideração destas colônias pode levar a análise a um resultado falso

negativo.

Em estudo realizado por Novak et al,⁵⁰ um total de 127 amostras MRSA e 100 amostras MSSA, identificadas anteriormente por outros métodos fenotípicos foram analisados pela técnica de E-test, demonstrando 100% de sensibilidade e especificidade. O mesmo descreve alta prevalência de amostras com CIM ≥ 256 $\mu\text{g/mL}$, um total de 78,7%. Outro estudo com amostras MRSA indicou taxa de especificidade de 95,5%, semelhante à encontrada em nosso estudo.⁵¹ O mesmo autor descreve também que 67% das amostras analisadas possuíam CIM ≤ 32 $\mu\text{g/mL}$. Contudo, em nosso estudo 46,1% das amostras apresentaram CIM entre 0,125 a 0,75 $\mu\text{g/mL}$ e 49% entre ≥ 32 a ≥ 256 , apresentando um maior percentual de amostras com CIM acima do *breakpoint* estabelecido pelo CLSI. Chi et al ⁵² descreve em estudo realizado em Hospital Universitário em Taiwan através da técnica de E-test 77% de amostras MRSA com CIM ≥ 256 $\mu\text{g/mL}$, taxa superior a encontrada em nosso estudo. O mesmo autor ainda descreve resistência a eritromicina e ao trimetoprim-sulfametoxazol em 97% e 74,2% das amostras estudadas respectivamente.

Em nosso trabalho, as taxas de resistência em MRSA encontradas para essas drogas foram semelhantes às descritas por Chi et al ⁵² com índices de 89,1% para a eritromicina e 86,9% para o trimetoprim-sulfametoxazol. A CIM 50% e CIM 90% do trimetoprim-sulfametoxazol e netilmicina foram maiores nas amostras MRSA, enquanto a eritromicina apresentou diferença de CIM entre amostras MRSA e MSSA na CIM 50%. O fato de que uma maior CIM a estas drogas é encontrado em amostras MRSA pode estar relacionado com a prevalência do tipo de cassete *SCCmec* presente em cada um dos hospitais, uma vez que os cassetes provenientes de amostras nosocomiais normalmente carregam resistência a eritromicina e trimetoprim-sulfametoxazol.^{53, 54}

Embora não exista nenhuma associação entre a resistência à netilmicina e os cassetes cromossômicos que induzem resistência a oxacilina em *Staphylococcus*, a taxa de resistência

à essa droga também foi alta. Anupurba et al ⁵⁵ descrevem taxas de resistência a netilmicina em amostras MRSA de 47,5%, valor abaixo que a taxa encontrada em nosso estudo (78,3%).

Nossos resultados mostraram a relação já descrita na literatura entre amostras MRSA e multirresistência, com a maioria das amostras MRSA apresentando três resistências (82,6%) comparado com nenhuma resistência em 78,6% dos MSSA. A maioria das amostras apresentou CIM na faixa de >32 a >256 µg/mL para todas as drogas estudadas com exceção do trimetoprim, que apresentou a maioria das amostras estudadas na faixa de CIM entre 0,023 a 0,094.

A importância de se determinar os níveis de resistência a estas drogas se baseia no fato de que muitas vezes estas podem ser utilizadas em conjunto com β-lactâmicos no tratamento de infecções por *S. aureus*, sendo uma alternativa ao uso da vancomicina.⁵⁶ Com relação a esta, nenhuma das amostras estudadas se apresentaram resistentes, com CIM <4 µg/mL (1,5 µg/mL para CIM 50% e 02 µg/mL para CIM 90%), demonstrando que a vancomicina ainda é um boa alternativa para o tratamento de amostras MRSA em nosso meio. Contudo, além dos três relatos de *S. aureus* resistentes a vancomicina nos Estados Unidos.^{17,18,19} Robert et al ⁵⁷ em trabalho realizado em um Hospital Universitário Francês, relatam o surgimento de amostra intermediária a vancomicina, o que reforça o fato de que para evitar-se o surgimento de amostras resistentes a vancomicina é necessário o uso correto da antibioticoterapia disponível, reservando drogas como a vancomicina como última alternativa, normalmente aplicada em amostras multiresistentes. No mesmo estudo, o autor também descreve o fato de que a CIM 50% encontrada em suas amostras foi de 2 µg/mL, mesma taxa encontrada em nosso estudo para a CIM 90%, fato que ressalta uma maior taxa de resistência entre as amostras de seu trabalho quando comparadas às utilizadas em nosso estudo.

No Brasil, Oliveira et al ²⁰ descrevem o isolamento de 05 amostras MRSA que

apresentaram resistência intermediária a vancomicina (8 µg/mL), o que reafirma a necessidade do uso racional de antibioticoterapia. Das 05 amostras, 04 foram isoladas após o uso prolongado de vancomicina, sendo uma das amostras suscetível ao trimetoprim-sulfametoxazol e à rifampicina e uma com sensibilidade apenas ao trimetoprim-sulfametoxazol. O surgimento destas amostras resistentes à vancomicina pode estar relacionado à presença de amostras MRSA presentes como colonizantes nos pacientes e que podem ser selecionadas quando submetidas a concentrações subterapêuticas de vancomicina. O mesmo autor também descreve que ao contrário da técnica de E-test, o disco de vancomicina (30 µg) foi incapaz de detectar amostras com resistência intermediária. Palazzo et al ²¹ relatam o isolamento de 04 amostras de *Staphylococcus* coagulase-negativa com altas CIM para a vancomicina (16 µg/mL, 32 µg/mL e >256 µg/mL) em portadores saudáveis, sendo 03 *mecA* positivas.

Embora a literatura tenha descrito 100% de sensibilidade para métodos fenotípicos com a utilização de disco de cefoxitina, nossos resultados mostraram baixa sensibilidade nos testes fenotípicos, principalmente com o teste de disco de difusão. Desta forma, ressaltamos a importância dos testes moleculares na confirmação de resistência à oxacilina em *S. aureus* isolados de infecções graves, de forma a garantir o tratamento correto e evitar a disseminação de amostras MRSA no ambiente hospitalar. Os resultados de resistência à oxacilina em nosso meio revelaram uma maior prevalência de MRSA na Unidade de Tratamento Intensivo. Um dado interessante relatado por Palos ⁵⁸ foi o de maior prevalência de profissionais da saúde portadores de amostras MRSA provenientes de Unidades de Tratamento Intensivo, o que vem de encontro aos dados obtidos em nosso estudo. A maior prevalência de amostras MRSA no presente estudo na Unidade de Tratamento Intensivo pode estar relacionada aos procedimentos invasivos realizados nesta unidade e as condições em que o paciente chega a esta enfermaria.

Em nosso hospital também se observou uma queda na taxa de MRSA nos últimos dois anos estudados (2005 e 2006) em relação a um aumento gradativo observado nos primeiros três anos estudados (2002 a 2004), observando-se queda acentuada no ano de 2006, o que pode estar relacionada à queda do uso da oxacilina como opção de tratamento ou o uso racional de antimicrobianos associados às boas práticas de controle de infecção hospitalar.

Contudo, embora a detecção do gene *mecA* seja de grande importância para a caracterização da resistência à oxacilina, outras modalidades de resistência à meticilina têm também sido descritas em linhagens que não apresentam o gene *mecA* e são denominadas *borderline*. A resistência *borderline* pode ser devido a dois mecanismos, o primeiro seria a inativação de oxacilina mediada pela hiperprodução de β -lactamase²⁸ e o segundo é a resistência modificada, chamada de MOD-SA, mediada pela alteração das PBPs intrínsecas com afinidade para a oxacilina alterada.²⁷ Em nosso estudo, 97% de nossas amostras foram produtoras de β -lactamase. McDougal & Thornsberry²⁸ em estudo no qual caracterizam a relação entre produção de β -lactamase e resistência *borderline* encontraram de um total de 66 amostras de *S. aureus* estudadas, 57 produtoras de β -lactamase. Montanari et al⁵⁹ em estudo com 89 amostras de *S. aureus* descreve 74 amostras (83,1%) produtoras de β -lactamase, taxa um pouco abaixo da encontrada em nosso estudo.

Nossos resultados também revelaram 05 amostras resistentes a oxacilina pelos quatro métodos fenotípicos testados e negativas para a detecção do gene *mecA* por PCR. Entretanto, essas amostras foram produtoras de β -lactamase e se mostraram sensíveis ao disco de difusão com amoxicilina-acido clavulânico, o que confirma serem hiperprodutoras de β -lactamase. A hiperprodução de β -lactamase é uma das formas de resistência à oxacilina descritas para *S. aureus*. Contudo, em nosso estudo com exceção de uma amostra que só foi detectada como resistente devido ao crescimento de colônias dentro da elipse de inibição de 1,5 μ g/mL, todas as outras apresentaram a CIM ≥ 256 , o que difere de dados descritos na literatura, que

associam este tipo de resistência a amostras com CIM próximas ao *breakpoint* de sensibilidade, chamadas de *borderline*.^{28,59}

A detecção adequada de resistência à oxacilina mediada pelo gene *mecA* é importante para o laboratório clínico. Embora os métodos preconizados detectem a maioria das linhagens oxacilina resistentes, há duas situações que requerem etapas adicionais para confirmar a sensibilidade ou resistência. A primeira é a ocorrência de linhagens extremamente heterogêneas e que são determinadas como sensíveis pelos métodos de referência. A segunda é a ocorrência de resistência *borderline* que deve ser diferenciada da resistência mediada pelo gene *mecA*, desde que a significância clínica da resistência determinada pelo gene *mecA* é muito maior. Estudos experimentais com animais e alguns dados clínicos mostraram que o uso de antibióticos β -lactâmicos foram efetivos nas infecções causadas por linhagens sem o gene *mecA* e com baixos níveis de resistência (*borderline*).^{60,61} Entretanto, infecções causadas por isolados com o gene *mecA* requerem tratamento com vancomicina.⁶²

Os resultados obtidos neste estudo confirmam a importância na detecção de resistência à oxacilina como marcador importante na escolha da terapêutica antimicrobiana, com multiresistência em amostras MRSA e a maior sensibilidade aos outros antimicrobianos em amostras MSSA. A utilização de melhores técnicas na detecção de resistência à oxacilina, tais como o disco de cefoxitina, método de triagem, E-test e para os laboratórios que tem acesso a técnicas de maior custo a detecção do gene *mecA* e a PPB 2a, podem contribuir para evitar o uso abusivo e desnecessário de vancomicina em MSSA, e reservar essa droga para as infecções graves causadas pelos MRSA.

6. CONCLUSÕES

- Um total de 46 amostras de *S. aureus* (45,1%) foram consideradas resistentes a oxacilina em nosso estudo, fato que enfatiza o emprego racional de antibioticoterapia em nosso meio.
- A técnica de E-test foi superior aos outros testes fenotípicos (disco de oxacilina, disco de cefoxitina e teste de triagem) para a detecção da resistência a oxacilina em *S. aureus*.
- A maioria das amostras MRSA apresentou CIM entre ≥ 32 e ≥ 256 , desta forma apresentando altos níveis de resistência à oxacilina, mas também foi verificada a ocorrência de heteroresistência, que dificulta a detecção laboratorial de MRSA.
- A vancomicina se apresentou como uma boa alternativa para o tratamento de amostras MRSA multirresistentes em nosso meio, com nenhuma das amostras apresentando *breakpoint* acima do nível recomendado pelo CLSI.
- No Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (HC-FMB) observou-se uma queda na taxa de MRSA nos últimos dois anos estudados (2005 e 2006) em relação a um aumento gradativo observado nos primeiros três anos estudados (2002 a 2004), com queda acentuada no ano de 2006, o que pode ser explicada pelo uso racional de antimicrobianos associado às boas práticas de controle de infecção hospitalar ou a diminuição do uso da oxacilina como opção de tratamento.

7. Hiramatsu K, Chui L, Kuroda M, Ito T. The emergence and evolution of methicilin resistant *Staphylococcus aureus*. Trends Microbiol. 2001; 9: 486-93.
 8. Stefani S, Varaldo PE. Epidemiology of methicilin resistant staphylococci in Europe. Clin Microbiol Infect. 2003; 9: 1179-86.
 9. Witte W. Antibiotic resistance in gram-positive bacteria: epidemiological aspects. Antimicrob Agents Chemother. 1999; 48: 4240-5.
 10. Cuevas O, Cercenado E, Vindel A, Guinea J, Sanchez-Conde M, Sanchez-Somolinos et al. Evolution of the antimicrobial resistance of *Staphylococcus* spp. in Spain: five nationwide prevalence studies, 1986 to 2002. J Antimicrob Chemother. 1999; 44: Suppl A,1-9.
 11. Bouza E, San Juan R, Munoz P, Pascau J, Voss A, Desco M; Cooperative Group of the European Study Group On Nosocomial Infections (ESGNI). A European perspective on intravascular catheter-related infections: report on the microbiology workload, aetiology and antimicrobial susceptibility (ESGNI-005 Study). Clin Microbiol Infect. 2004; 10: 838-42.
 12. Wey SB, Cardo DM, Halker E, Carratu FP, Saes AC. Distribution and analysis of 8,268 nosocomial infections at the Hospital Sao Paulo: 1985 to 1989. Rev Hosp S Paulo Esc Paul Med. 1990; 1: 169-74
 13. Leal GS. Análise das estafilococcias causadas por *Staphylococcus aureus* resistentes ou suscetível à oxacilina isoladas do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia. [dissertação]. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia , 1998.
 14. Turnidge J, Grayson ML. Optimum treatment of staphylococcal infections. Drugs. 1993; 45: 353-66.
-

15. Chambers HF. Methicilin resistance is staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin Microbiol Rev.* 1997; 10: 781-91.
16. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI approved standard M100-S15. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA: 2005.
17. CDC. *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin – United States, 2002. *MMWR* 2002; 51: 565-67.
18. CDC. Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* – Pennsylvania. *MMWR.* 2002; 51: 902
19. CDC. Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* – New York, 2004. *MMWR* 2004; 53: 322-3
20. Oliveira GA, Dell'Aquila AM, Masiero RL, Levy CE, Gomes MS, Cui L, Hiramatsu K, Mamizuka EM. Isolation in Brazil of nosocomial *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2001; 7: 443-8.
21. Palazzo IC, Araujo ML, Darini AL. First report of vancomycin-resistant staphylococci isolated from healthy carriers in Brazil. *J Clin Microbiol.* 2005; 43:179-85.
22. Chambers HF. Methicilin resistance is staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin Microbiol Rev.* 1997; 10: 781-91.
23. Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44: 1549-55.
24. Zhang K, McClure JA, Elsayed S, Louie T, Conly JM. Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome mec types I to V in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 5026-33.

25. Swenson JM. News tests for detection of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Newsletter. 2002; 24:159-62.
26. Tomasz A, Nachman S, Leaf H. Stable classes of Phenotypic expression in methicilin resistant clinical isolates of Staphylococci. Antimicrob Agents Chemother. 1991; 35: 124-9.
27. Tomasz A, Drugeon HB, Lencastre HM, Jabes D, Mcdougal L, Bille J. New mechanism for methicilin resistance in *Staphylococcus aureus*: clinical isolates that lack the PBP2a gene and contain normal penicillin-binding proteins with modified penicillin-binding capacity. Antimicrob Agents Chemother. 1989; 33: 1869-74.
28. McDougal LK, Thornsberry C. The role of beta-lactamase in staphylococcal resistance to penicillinase-resistant penicillins and cephalosporins. J Clin Microbiol. 1986; 23: 832-9.
29. Tveten Y, Jenkins A, Digranes A, Melby KK, Allum AG, Kristiansen BE. Comparison of PCR detection of *mecA* with agar dilution and E-test for clinical isolates of coagulase negative staphylococci. Clin Microbiol Infect. 2004; 10: 459-70.
30. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. NCCLS approved standard M100-S9. 1999; Wayne PA USA.
31. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing- Fourteenth informational Supplement M100-S14. 2004; Wayne PA USA.
32. Felten A, Grandry B, Lagrange PH, Casin I. Evaluation of three techniques for detection of low-level methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a disk diffusion method with cefoxitin and moxalactam, the vitek 2 system, and the MRSA-screen latex agglutination test. J Clin Microbiol. 2002; 40: 2766-71.

33. Sakoulas G, Gold HS, Venkataraman L, DeGirolami PC, Eliopoulos GM, Qian Q. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: comparison of susceptibility testing methods and analysis of mecA-positive susceptible strains. J Clin Microbiol. 2001; 39: 3946-51.
34. Skov R, Smyth R, Clausen M, Larsen AR, Frimodt-Møller N, Olsson-Liljequist et al. Evaluation of a cefoxitin 30 µg disc on iso-sensitest agar for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Antimicrob Chemother. 2003; 52: 204-7.
35. Cauwelier B, Gordts B, Descheemaeker P, Van Landuyt H. Evaluation of a disk diffusion method with cefoxitin (30 µg) for detection of methicillin - resistant *Staphylococcus aureus*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2004; 23: 389-92.
36. Skov R, Smyth R, Larsen AR, Frimodt-Møller N, Kahlmeter G. Evaluation of cefoxitin 5 and 10 microg discs for the detection of methicillin resistance in staphylococci. J Antimicrob Chemother. 2005;55: 157-61.
37. Fernandes CJ, Fernandes LA, Collingnon P. Cefoxitin resistance as a surrogate marker for the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Antimicrob Chemother. 2005; 55: 506-10.
38. Koneman EW, Allen, SD, Janda, WM, Schreckenberger, PC, Winn Jr, WC 1997. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 5th ed., Lippincott, Philadelphia, + 1395pp.
39. Martineau F, Picard FJ, Roy PH, Ouellette M, Bergeron MG. Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol. 1998; 36: 618-23.
40. Murakami K, Minamide K, Wada K, Nakamura E, Teraoka, H, Watanabe S. Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 1991; 29: 2240-4.

41. Ghoshal U, Prasad KN, Singh M, Tiwari DP, Ayyagari A. A comparative evaluation of phenotypic and molecular methods for the detection of oxacillin resistance in coagulase-negative staphylococci. *J Infect Chemother.* 2004; 10: 86-9.
42. Sox HC, Probability theory in the use of diagnostic tests, *An Introduction to Critical Study of Literature*, *Ann Inter Med.* 104; 60-66.
43. Fletcher RH, Fletcher SW, Wagner EH, Diagnóstico. In: Fletcher, R.H., Fletcher, SW, Wagner, EH, eds., *Epidemiologia Clínica*, Porto Alegre: Artes Médicas, 3, 1991, p.68-107.
44. CLSI. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard - 8th ed. CLSI document M2-A9. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA: 2006.
45. Archer G., Niemeyer D.M. Origin and evolution of DNA associated with resistance to methicillin in staphylococci. *Trends in Microbiol.* 1994; 2: 343-7,
46. Boutiba Ben Boubaker I, Ben Abbes R, Ben Abdallah H, Mamlouk K, Mahjoubi F, Kammoun , A. Hammami et al. Evaluation of a cefoxitin disk diffusion test for the routine detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect.* 2004; 10: 762-5.
47. Zhu LX, Zhang ZW, Wang C, Yang H.W, Zhang Q, Cheng J. Evaluation of the CLSI cefoxitin 30-microg disk-diffusion method for detecting methicillin resistance in staphylococci. *Clin Microbiol Infect.* 2006; 12:1039-42
48. McKinney TK, Sharma VK, Craig WA, Archer GL. Transcription of the gene mediating methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* (*mecA*) is corepressed but not coinduced by cognate *mecA* and beta-lactamase regulators. *J Bacteriol.* 2001; 183: 6862-8.

49. Perez LRR, Antunes LLS, Barth AL, D'Azevedo PA . Variations of agar screen tests for detection of methicillin resistance in staphylococci: focus on cefoxitin. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*2007; 26: 267 - 270
50. Novak SM, Hindler J, Bruckner DA. Reliability of two novel methods, Alamar and E test, for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 1993; 31: 3056-7.
51. Frebourg NB, Nouet D, Lemée L, Martin E, Lemeland JF. Comparison of ATB staph, rapid ATB staph, Vitek, and E-test methods for detection of oxacillin heteroresistance in staphylococci possessing *mecA*. *J Clin Microbiol.* 1998; 36: 52-7.
52. Chi CY, Ho MW, Ho CM, Lin PC, Wang JH, Fung CP. Molecular epidemiology of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia in a teaching hospital. *J Microbiol Immunol Infect.* 2007; 40: 310-6.
53. Ito T, Katayama Y, Asada K, Mori N, Tsutsumimoto K, Tiensasitorn C, et al. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45: 1323-36.
54. Martins A, Cunha M de L. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci: epidemiological and molecular aspects. *Microbiol Immunol.* 2007; 51: 787-95.
55. Anupurba S, Sen MR, Nath G, Sharma BM, Gulati AK, Mohapatra TM. Prevalence of methicillin resistant staphylococcus aureus in a tertiary referral hospital in eastern Uttar Pradesh. *Indian J Med Microbiol.* 2003; 21: 49-51.
56. Rochon-Edouard S, Pestel-Caron M, Lemeland JF, Caron F. In vitro synergistic effects of double and triple combinations of beta-lactams, vancomycin, and netilmicin

- against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44: 3055-60.
57. Robert J, Bismuth R, Jarlier V. Decreased susceptibility to glycopeptides in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a 20 year study in a large French teaching hospital, 1983-2002. *J Antimicrob Chemother.* 2006; 57: 506-10.
58. Palos M A P. *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus aureus* meticilina resistentes (MRSA) em profissionais da saúde e as interfaces com as infecções nosocomiais.[Tese] - Ribeirão Preto: Programa interunidades de doutoramento em Enfermagem 2006.
59. Montanari MP, Tonin E, Biavasco F, Varaldo PE. Further characterization of borderline methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and analysis of penicillin-binding proteins. *Antimicrob Agents Chemother.* 1990; 34: 911-3.
60. Massanari RM, Pfaller MA, Wakefield DS, Hammons GT, McNutt LA, Woolson Implications of acquired oxacillin resistance in the management and control of *Staphylococcus aureus* infections. *J Infect Dis.* 1988; 158: 702-9.
61. Thauvin-Eliopoulos C, Rice LB, Eliopoulos GM, Moellering RC Jr. Efficacy of oxacillin and ampicillin-sulbactam combination in experimental endocarditis caused by beta-lactamase-hyperproducing *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1990; 34: 728-32.
62. Kolbert CP, Connolly JE, Lee MJ, Persing DH. Detection of the *Staphylococcal mecA* gene by chemiluminescent DNA hybridization. *J Clin Microbiol.* 1995; 33: 2179-82