

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

Departamento de Microbiologia e Imunologia

Instituto de Biociências de Botucatu

IARA BATISTA POMPÉA FERREIRA

**Estudo dos fatores de virulência e resistência à oxacilina em
Staphylococcus spp. isolados de aspirado traqueal de pacientes em
ventilação mecânica internados em UTI**

Botucatu – São Paulo

2013

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
Instituto de Biociências de Botucatu
Departamento de Microbiologia e Imunologia

Estudo dos fatores de virulência e resistência à oxacilina em
***Staphylococcus* spp. isolados de aspirado traqueal de pacientes em**
ventilação mecânica internados em UTI

Monografia de conclusão do curso de Ciências Biomédicas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, referente ao projeto de Iniciação Científica no Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências de Botucatu.

Aluna:

Iara Batista Pompéia Ferreira

Participante:

Ms. Mariana Fávero Bonesso

Orientador:

Profa. Adj. Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha

Botucatu – São Paulo

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Ferreira, Iara Batista Pompêa.

Estudo dos fatores de virulência e resistência à oxacilina em *Staphylococcus* spp. isolados de aspirado traqueal de pacientes em ventilação mecânica internados em UTI / Iara Batista Pompêa Ferreira. - Botucatu, 2013

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biomédicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha

Coorientador: Mariana Fávero Bonesso

Capes: 21202010

1. Respiração artificial. 2. Antibióticos - Efeito fisiológico. 3. *Staphylococcus aureus*. 4. Drogas - Resistência em microorganismos.

Palavras-chave: Enterotoxina; MRSA; Pneumonia; UTI; Ventilação mecânica.

RESUMO:

Pacientes que se encontram internados em UTI sob ventilação mecânica estão frequentemente expostos a diversos patógenos que apresentam multi-resistência antibiótica. Entre esses microrganismos, encontra-se o MRSA (*Staphylococcus aureus* Resistente a Meticilina) considerado um desafio terapêutico devido a sua resistência aos antibióticos β -lactâmicos. Portanto, esse estudo se propôs identificar espécies de *Staphylococcus* spp. isoladas de pacientes internados em UTI e submetidos a ventilação mecânica, a detecção do gene *mecA* e dos genes das enterotoxinas A (*sea*), B (*seb*), C (*sec-1*) e D (*sed*) nas amostras de *S. aureus* isoladas, assim como a determinação fenotípica da resistência à oxacilina utilizando o método de difusão com discos de oxacilina e cefoxitina. As coletas foram realizadas por um período de 19 meses, obtendo amostras de 232 pacientes. Um percentual de 39% (70) de cocos Gram-positivos foram obtidos; dos quais 82,8% (58) foram identificados como *Staphylococcus* spp., desses 75,8% (44) correspondiam à espécie *S. aureus* e 47,7% foram identificadas como MRSA. Foi encontrada resistência às duas drogas em 31,8% das amostras de *S. aureus*, 16 amostras (36,3%) possuíam o gene *sea* e 11 amostras (25%) possuíam o gene *sec-1*. Entre as espécies de Estafilococos coagulase-negativa isoladas, a espécie mais encontrada foi *S. epidermidis*, correspondendo à 43% (6 amostras). Os resultados revelaram que um dos principais agentes etiológicos das VAP entre os cocos Gram-positivos é a espécie *S. aureus*, com atenção especial para MRSA. A presença de genes de enterotoxinas em *S. aureus* não mostrou papel determinante na VAP, mas a presença desses superantígenos pode contribuir para a piora do quadro clínico, desde que estão associados com resposta inflamatória intensa.

Palavras Chave: Pneumonia, MRSA, enterotoxina, UTI, oxacilina, ventilação mecânica, VAP.

ABSTRACT:

Patients that are mechanically ventilated in ICUs are constantly exposed to different pathogens, which present multiantibiotic resistance. Among these microorganisms, is MRSA (Meticillin-Resistant *Staphylococcus aureus*) considered to be a therapeutic challenge due to its resistance to β -lactam antibiotics. Therefore, this study proposed to identify species of *Staphylococcus* spp. isolated from mechanically ventilated patients in ICU, the gene *mecA* detection and the genes of the enterotoxins A (*sea*), B (*seb*), C (*sec-1*) and D (*sed*) in samples of *S. aureus*, as well as the phenotypic resistance determination to oxacillin using the disc-diffusion method with discs of oxacillin and cefoxitin. The samples collection occurred during in a period of 19 months, obtaining samples from 232 patients. A percentage of 39% (70) of Gram-positive cocci were found; which 82,8% (58) were identified as *Staphylococcus* spp., among these, 75,8% (44) corresponded to *S. aureus* species and 47,7% were identified as MRSA. It was found resistance to both drugs in 31,8% of the *S. aureus* samples, 16 (36,3%) had the gene *sea* and 11 (25%) had the *sec-1* gene. Among the coagulase-negative staphylococci obtained, the species most found was *S. epidermidis*, corresponding to 43% (6). The results revealed that one of the most important etiologic agents of VAP amid the Gram-positive cocci is the species *S. aureus*, with special attention to MRSA. The presence of enterotoxins genes in *S. aureus* did not showed determinant role in VAP, but the presence of these superantigens can contribute worsening the patient's prognosis, since they are associated with intense inflammatory response.

Word Keys: Pneumonia, MRSA, enterotoxin, ICU, oxacillin, mechanical ventilation, VAP

Sumário

1	Introdução	7
2	Objetivo	11
3	Metodologia do estudo	11
3.1	Coleta e processamento da amostra	11
3.2	Identificação de <i>Staphylococcus</i> spp.	12
3.3	Extração do ácido nucléico	12
3.4	Deteccção dos genes das enterotoxinas e do gene <i>mecA</i>	12
3.5	Teste de sensibilidade a Oxacilina e a Cefoxitina	13
4	Resultados.....	14
4.1	Microrganismos Isolados	14
4.2	Testes de Sensibilidade	16
4.3	Fatores de Resistência e Virulência	17
5	Discussão	18
6	Conclusão	21
7	Referências	22

1 Introdução

A pneumonia é uma síndrome infecciosa que possui um agente etiológico e resposta inflamatória intensa; sendo esta nosocomial, admite-se que não existia anteriormente à internação hospitalar. Algumas situações podem aumentar os riscos de desenvolvimento de pneumonias, como é o caso de ventilação mecânica. Em casos de intubação endotraqueal é importante levar em consideração que as defesas naturais do paciente estão comprometidas, pois a filtração aérea (mecânica, aquecimento, umidificação), geralmente eficiente em indivíduos considerados hígidos, está inativada, criando uma comunicação direta entre o meio ambiente e o trato respiratório inferior. Além disso, o reflexo da tosse e a função da glote estão comprometidas, facilitando microaspirações do material traqueobrônquico (pneumonias). Portanto, durante esse período, é comum o surgimento da doença. As pneumonias associadas à ventilação mecânica são chamadas de VAP (ventilator-associated pneumonia) e são caracterizadas como um tipo de HAP (SBPT 2001). Dentre as estratégias usadas pelos médicos e fisioterapeutas para a prevenção da doença está a aspiração endotraqueal, eficaz na prevenção desse problema (Valles et al. 1995).

O desenvolvimento de pneumonias depende tanto do sistema imunológico do indivíduo quanto da patogenicidade do microrganismo causador do problema. Sua instalação pode ocorrer na comunidade, em ambientes hospitalares e em indivíduos residentes na comunidade que mantém contato com sistemas de saúde. As pneumonias adquiridas em hospitais, especialmente as associadas à ventilação mecânica (VAP), possuem grande importância, pois os indivíduos submetidos à respiradores artificiais estão, na maior parte das vezes, com seu sistema imunológico e fisiológico debilitados. A instalação de microrganismos nas vias aéreas inferiores é então favorecida, causando a pneumonia. Existem muitos microrganismos responsáveis pela VAP, dentre eles está a bactéria *Staphylococcus aureus*.

O tratamento dessas pneumonias é um desafio devido à resistência antibiótica que essa espécie apresenta. A penicilina introduzida em 1940 era utilizada como tratamento para as infecções por espécies de *Staphylococcus* spp., porém, após dois anos, sua introdução induziu o surgimento de cepas de origem hospitalar, que produziam penicilinase e portanto eram resistentes ao tratamento com penicilina (Mimica e Mendes 2007). Pouco tempo depois, o mesmo ocorreu com as cepas de origem comunitária tornando necessário o uso de

antimicrobianos alternativos para o tratamento de infecções causadas por *S. aureus* (Saïd-Salim et al. 2005).

No final dos anos 1950, na Europa, amostras de *S. aureus* de origem hospitalar e comunitárias apresentavam taxas de resistência à penicilina nos valores de 90% e 70%, respectivamente (Mimica e Mendes 2007). Tal constatação implicou na busca de alternativas ao tratamento e, em 1959, a adição do ácido 6-aminopenicilânico na molécula da penicilina proporcionou a modificação que conferiu proteção do anel beta lactâmico contra a ação da beta-lactamase. Essa penicilina semi-sintética (denominada de meticilina e oxacilina, esta última presente no Brasil) provou-se resistente à ação da beta-lactamase. Entretanto, ambas foram eficientes por pouco tempo e, em 1961, surgiram as primeiras cepas resistentes às penicilinas semi-sintéticas. Essas novas cepas emergentes foram denominadas de MRSA (Methicilin Resistant *S. aureus*) (Mimica e Mendes 2007, Lopes 2005). Essas cepas são resistentes aos antibióticos β -lactâmicos, dificultando o tratamento das infecções estafilocócicas. Antibióticos β -lactâmicos têm como mecanismo de ação a inibição da síntese da parede bacteriana. Um evento importante da síntese é chamado de transpeptidação, reação de cruzamento entre peptídeos e glicanos. As PBPs, ou proteínas de ligação à penicilina, são as enzimas responsáveis por essa ligação, alvos dos antibióticos β -lactâmicos, que as inativam quando ligados a elas (Reynolds et al. 1988).

A resistência a esses antimicrobianos apresentada pelas cepas MRSA é conferida pelo gene *mecA*. Esse gene codifica a proteína PBP 2a (também denominada PBP 2'), que possui baixa afinidade com esses antibióticos, e dessa forma não há ligação entre a proteína e a droga (Hartman and Tomasz 1984), configurando a ineficácia dos β -lactâmicos. O gene *mecA* e seus reguladores (*mecI* e *mecR1*) são codificados por aproximadamente 5 kb de DNA, presentes em 25-50kb de DNA adicional, um elemento genético móvel chamado Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*), não encontrado em estafilococos sensíveis à droga (Hiramatsu et al. 1996). A sequência dos genes regulatórios do *mecA* é similar as regiões análogas das β -lactamases estafilocócicas (Song et al. 1987).

Assim, torna-se clara a necessidade da detecção do gene *mecA* para casos de pneumonias por infecção por *Staphylococcus aureus*. Em indivíduos com esse quadro o tratamento inadequado o expõe a piores prognósticos e elevada morbimortalidade (Kollef et al. 1999, Iregui et al. 2002).

As cepas MRSA surgiram primeiramente nos âmbitos hospitalares e pouco tempo depois se alastraram para centros de saúde menores (Mimica e Mendes 2007). As infecções

por MRSA adquiridas em hospitais são denominadas HA-MRSA (healthcare-associated-MRSA) e estão associadas a pacientes que foram submetidos a procedimentos médicos, como cirurgia, diálise ou cateter (Lopes 2005, Mimica e Mendes 2007).

A relevância do estudo das pneumonias hospitalares torna-se evidente ao analisarmos dados numéricos da ocorrência da infecção e da doença. Considera-se que casos de pneumonia sejam a segunda causa de infecção mais comum nos Estados Unidos (DeRyke et al. 2005), e que cerca de 1% de todas as infecções hospitalares sejam causadas por *S. aureus*, representando aumento no tempo de permanência em hospitais de quase 3 milhões de dias gerando, assim, uma despesa em torno de 10 bilhões de dólares por ano. Além disso, pacientes com infecções por MRSA estão relacionadas à alta morbimortalidade em comparação àqueles com infecção por outros patógenos (Noskin et al. 2005).

As pneumonias causadas por MRSA podem ser provenientes de cepas que foram adquiridas na comunidade ou em hospitais. Em pacientes hospitalizados e com quadros de pneumonias a classificação é feita considerando-se o tempo em que se desenvolveram. Assim, pneumonias desenvolvidas por pacientes internados num período inferior a 48 horas são classificadas pneumonias adquiridas na comunidade, ou CAP (SBPT 2001). Aquelas desenvolvidas no intervalo de tempo compreendido entre 48 horas e 72 horas são chamadas de pneumonias adquiridas no hospital ou HAP (SBPT 2001). Os intervalos de tempo são necessários para indicar se o microrganismo estava previamente instalado no paciente, e, portanto, foi adquirido da comunidade, ou se foi adquirido no ambiente hospitalar.

Pneumonias causadas por *Staphylococcus aureus* estão sujeitas a altos índices de falha de tratamento (Malangoni et al 1994). Estudos revelam a importância da participação de *S. aureus* no desfecho das VAP, porém somente a resistência por si só não foi relacionada com a recorrência da infecção, super infecção, sepse severa ou mortalidade em pacientes com VAP por *S. aureus* (Zahar et al. 2005).

O quadro das pneumonias causadas por *S. aureus* também é influenciado pelos fatores de virulência da espécie. O superantígeno PVL (Panton Valentine leukocidin) é bastante associado a pneumonias, por causar necrose pulmonar (Zhang et al. 2005) e, portanto, também está associada com a severidade no quadro da doença (Saïd-Salim et al. 2005). Outros superantígenos característicos da espécie também causam resposta inflamatória intensa, como exemplo podemos citar a TSST-1 e enterotoxinas, especialmente as enterotoxinas A e B (Parker and Prince, 2012). A análise de amostras isoladas de escarro indicou a presença dos genes de TSST-1, enterotoxina C e enterotoxina A (Watanabe et al. 2000). A colonização por MRSA no trato respiratório superior pode ser a principal causa do

desenvolvimento de infecções nas vias respiratórias inferiores. A análise de 72 amostras isoladas de escarro, da cavidade nasal e da faringe de 24 pacientes hospitalizados colonizados com MRSA, demonstrou que 68 foram positivas para o gene da TSST-1 e enterotoxina C e, uma amostra positiva somente para enterotoxina A. A análise por PFGE demonstrou que as amostras de MRSA isoladas do escarro e da cavidade nasal eram praticamente idênticas em 88% dos pacientes. Os 12% restantes mostraram-se diferentes nessas amostras, mas possuíam MRSA com características muito similares na faringe e no escarro. Conclui-se que a colonização do trato respiratório superior por MRSA parece ser o primeiro processo patológico que leva ao desenvolvimento de infecção broncopulmonar por MRSA (Watanabe et al. 2000).

As enterotoxinas ainda não possuem papel bem estabelecido no prognóstico das VAP, porém sua pesquisa torna-se relevante quando observa-se poucos estudos direcionados à esse papel. Pouco se sabe sobre o comportamento de virulência, clonalidade e resistência a antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* implicados na pneumonia. Os fatores de virulência de amostras de MRSA podem contribuir para o pior prognóstico uma vez que, associados à resistência a antimicrobianos, podem contribuir com a gravidade do quadro do paciente.

2 Objetivo

O objetivo do presente trabalho foi identificar espécies de *Staphylococcus* spp. isoladas de pacientes internados em UTI e submetidos a ventilação mecânica, a detecção do gene *mecA* e dos genes das enterotoxinas A (*sea*), B (*seb*), C (*sec-1*) e D (*sed*) nas amostras de *S. aureus* isoladas, assim como a determinação fenotípica da resistência à oxacilina utilizando o método de difusão com discos de oxacilina e cefoxitina..

3 Metodologia do estudo

3.1 Coleta e processamento da amostra

O aspirado traqueal foi coletado pelos profissionais responsáveis ao atendimento do paciente: fisioterapeuta, médico ou enfermeiro. As coletas foram realizadas em pacientes que se encontravam em ventilação mecânica internados em Unidade de Terapia Intensiva do Hospital das Clínicas de Botucatu no período de janeiro de 2012 a julho de 2013.

Foram incluídos no estudo somente aqueles pacientes submetidos à ventilação mecânica nas primeiras 48 horas de intubação endotraqueal. Todos os pacientes incluídos no estudo foram acompanhados por até 8 semanas ou até o término da intubação.

Após coleta do aspirado traqueal, este foi imediatamente encaminhado ao laboratório de Bacteriologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu. O material foi previamente diluído na proporção 1:2 com N-acetil-Lcisteína (mucolítico) a 1%, homogeneizado e mantido por 15 minutos à temperatura ambiente. Em 9,9 ml de solução fisiológica estéril adicionou-se 0,1ml do homogeneizado, totalizando 10ml. Foi utilizada alça calibrada estéril de 0,01ml para a semeadura, usando-se Ágar Sangue de Carneiro, Ágar Baird Parker, meio seletivo para *Staphylococcus* spp. e Ágar MacConkey, com incubação a 37°C por 24h.

Após esse período, as unidades formadoras de colônias (UFC) foram determinadas multiplicando o número de colônias pela diluição correspondente (Oplustil et al. 2010). A identificação dos microrganismos que se desenvolveram nos meios de cultura foi realizada por meio de análise microscópica de sua morfologia e coloração específica pela coloração de Gram, e, posteriormente, identificação por testes bioquímicos específicos para cada grupo de bactérias conforme preconizados por Koneman et al.(2001).

3.2 Identificação de *Staphylococcus* spp.

O teste da catalase foi usado para as colônias características do gênero *Staphylococcus*, com cultivo prévio feito em caldo BHI (Koneman et al. 2001). Para a diferenciação de *Staphylococcus* e *Micrococcus* a prova de oxidação e fermentação da glicose era realizada, além da análise de resistência à bacitracina (0,04U), indicada pela ausência de halo de inibição ou formação de halo de até 9mm, e pela sensibilidade à furazolidona (100µg) caracterizada por halos de inibição de 15 a 35mm de diâmetro.

A diferenciação entre a espécie *S. aureus* e os estafilococos coagulase negativa foi feita utilizando-se o teste da coagulase.

As amostras identificadas foram armazenadas à temperatura de -70°C, após terem sido condicionadas ao caldo nutriente enriquecido com glicerol, para sua conservação.

3.3 Extração do ácido nucléico

As amostras de *S. aureus* foram cultivadas em Ágar Sangue de carneiro e as colônias foram inoculadas individualmente em caldo BHI (Brain-Heart Infusion) com incubação a 37°C por um período de 24h. A extração foi realizada com o Kit Illustra (GE Healthcare) a partir do caldo com crescimento bacteriano.

3.4 Detecção dos genes das enterotoxinas e do gene *mecA*

Foram identificados os genes das enterotoxinas A, B, C e D (*sea*, *seb*, *sec-1*, *sed*) por meio de reações de amplificação dos genes segundo Johnson et al (1991) e Cunha et al (2006). Um controle negativo, substituindo DNA por água era utilizado em cada uma das reações. As amplificações dos genes estudados foram realizadas em um termociclador MJ Research PTC-100 e as condições dos ciclos eram ajustadas conforme protocolo para cada o primer utilizado.

Para detecção do gene *mecA* das amostras de *S. aureus* e ECN foram utilizados os parâmetros e os primers descritos por Murakami et al. (1991). Nas reações realizadas foram utilizadas linhagens de referência internacional com controle positivo (*S. aureus* ATCC 33591) e negativo (*S. aureus* ATCC 25923).

A eficiência das amplificações foi monitorada pela eletroforese da reação em gel de agarose 2% preparado em tampão TBE 1,0 X e corado com Sybr Safe. O tamanho dos

produtos amplificados foi comparado com o padrão de 100 bp e posteriormente fotografado sob transiluminação UV.

3.5 Teste de sensibilidade a Oxacilina e a Cefoxitina

A sensibilidade a metilicina foi determinada pela utilização dos discos de cefoxitina (30µg) e de oxacilina (1µg) através do método de disco-difusão (Kirby-Bauer) conforme critérios recomendados pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012). Para o inóculo foram utilizadas culturas em caldo BHI (brain and heart infusion), previamente incubadas por 4 a 6 horas e ajustadas anteriormente com a turbidez da escala 0.5 de MacFarland. Após homogeneização desta suspensão foi realizada a semeadura em uma placa de ágar Mueller-Hinton sendo que os discos foram dispensados até 15 minutos após a semeadura. As placas foram incubadas em estufa por 18 a 24 horas, à temperatura de 35°C, sendo os diâmetros dos halos de inibição aferidos após este período.

4 Resultados

4.1 Microrganismos Isolados

As coletas foram realizadas num período de 19 meses, correspondendo à janeiro de 2012 até julho de 2013. Nesse intervalo foram coletadas amostras de 232 pacientes. Foi constatado que 54 (23,2%) pacientes apresentaram colonização negativa. Dentre os microrganismos encontrados, verificou-se presença de 85 (48%) bacilos Gram-negativos, 4 (2%) bacilos gram-positivos, 5 (3%) cocos Gram-negativos e 70 (39%) amostras de cocos gram-positivos, além de 14 (8%) leveduras. A Figura 1 mostra mais claramente a distribuição dos microrganismos encontrados.

Dentre os cocos gram-positivos encontrados, 59 (84,2%) foram identificados como *Staphylococcus* spp., sendo 44 (62,8%) pertencentes à espécie *Staphylococcus aureus*. A figura 2 ilustra essas proporções.

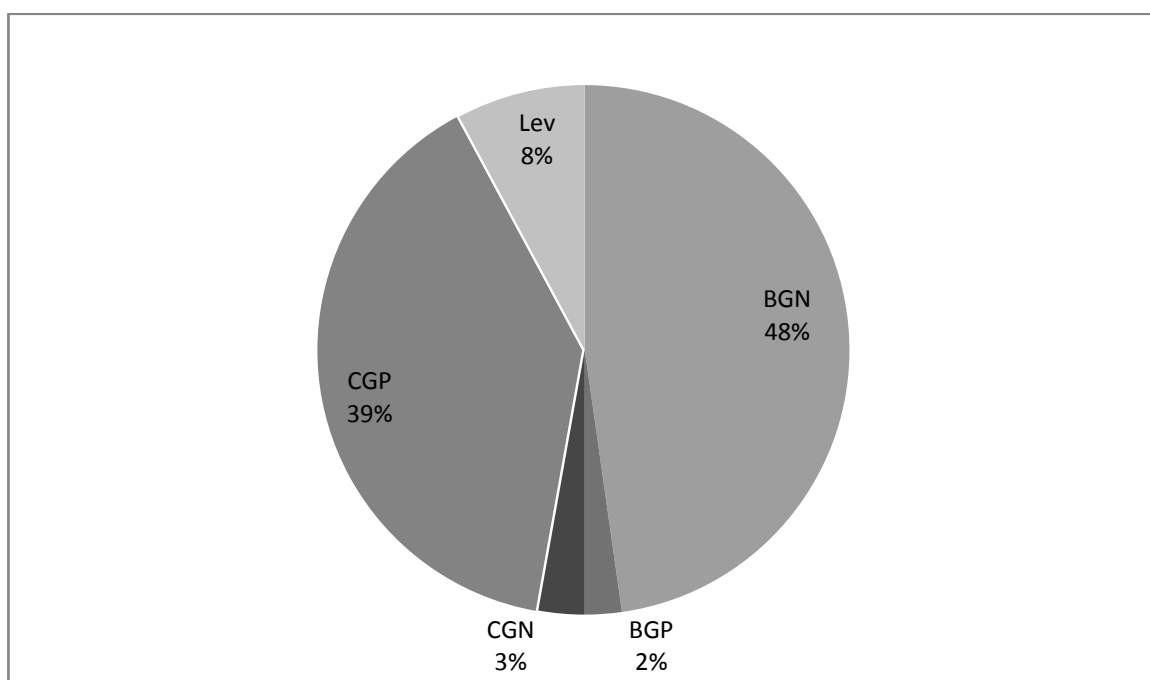


Figura 1: Microrganismos isolados de aspirado traqueal de pacientes submetidos à ventilação mecânica. Lev: levedura, CGP: cocos Gram-positivos; CGN: cocos Gram-negativos, BGP: bacilos Gram-positivos, BGN: bacilos Gram-negativos.

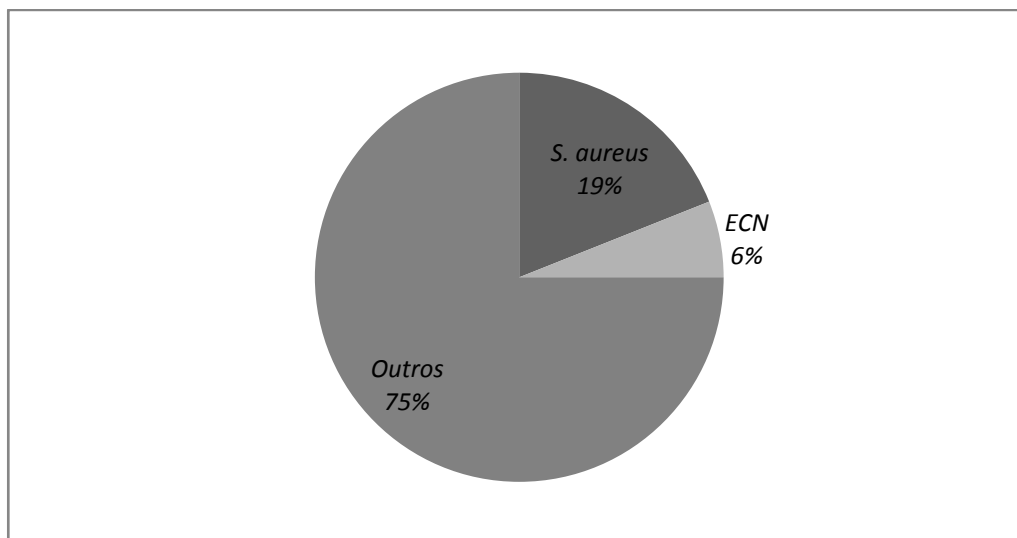


Figura 2: Distribuição de *S. aureus* e Estafilococos Coagulase-negativa (ECN) isolados de aspirado traqueal de pacientes submetidos à ventilação mecânica.

Quanto aos estafilococos coagulase negativa (ECN), foram encontradas 14 amostras, devidamente identificadas por meio de testes bioquímicos (Cunha et al. 2004). Foram identificados *S. epidermidis* (6/43%); *S. haemolyticus* (3/22%); *S. capitis* (2/14%); *S. xylosus* (2/14%); *S. hominis* (1/7%). As proporções podem ser avaliadas na Figura 3.

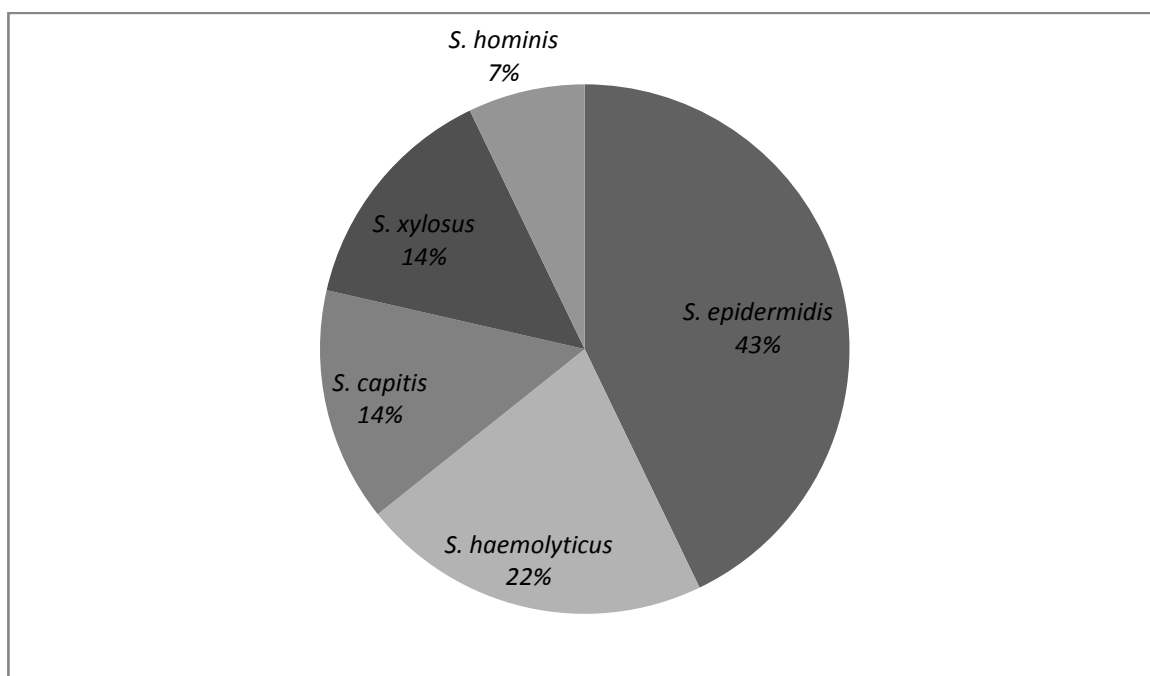


Figura 3: Espécies de Estafilococos coagulase-negativa isolados de pacientes submetidos à ventilação mecânica.

4.2 Testes de Sensibilidade

Quanto aos testes de sensibilidade, observou-se que 13 (29,5%) amostras eram resistentes ao antibiótico oxacilina e 14 (31,8%) resistentes à cefoxitina. Nota-se que duas amostras resistentes à oxacilina não apresentaram o gene *mecA*, e que 10 amostras em que esse gene foi identificado eram sensíveis à droga. Maiores detalhes podem ser vistos na Tabela 1.

Tabela 1. Determinação da resistência à oxacilina pelo método de disco-difusão e detecção do gene *mecA* em *S. aureus* isolados de pacientes submetidos a ventilação mecânica.

<i>S. aureus</i>	Oxacilina	Cefoxitina	<i>mecA</i>	<i>S. aureus</i>	Oxacilina	Cefoxitina	<i>mecA</i>
1	R	R	+	23	S	S	-
2	S	S	-	24	R	R	+
3	S	S	-	25	S	S	+
4	S	S	-	26	S	S	-
5	R	R	+	27	S	S	-
6	S	S	-	28	R	R	+
7	R	R	-	29	S	S	+
8	S	S	-	30	S	S	+
9	R	R	+	31	S	S	+
10	S	S	-	32	S	S	-
11	S	S	-	33	S	S	-
12	S	S	-	34	S	R	+
13	S	S	-	35	S	S	-
14	R	R	+	36	S	S	-
15	R	R	+	37	S	S	-
16	S	S	+	38	S	S	+
17	R	R	+	39	S	S	+
18	S	S	-	40	R	R	+
19	S	S	+	41	R	R	+
20	R	R	+	42	R	R	-
21	S	S	-	43	S	S	+
22	S	S	-	44	S	S	-

Interpretação dos halos de discos dos antibióticos cefoxitina e oxacilina de acordo com critérios do CLSI e correspondência com a presença do gene *mecA* (+/positivo; -/negativo)

4.3 Fatores de Resistência e Virulência

Os testes moleculares realizados para as amostras da espécie *S. aureus* mostraram que 21 (47,7%) amostras apresentavam o gene *mecA*, classificando essas cepas como MRSA. Quanto as enterotoxinas, constatou-se que 16 (36,3%) apresentavam o gene da enterotoxina A (*sea*) e 11 (25%) foram positivas para a enterotoxina C (*sec-1*). Entretanto, não foi identificado os genes *seb* ou *sed* em nenhuma das amostras, correspondentes as enterotoxinas B e D, respectivamente.

Conforme citado anteriormente, durante as coletas foram feitas contagens das colônias isoladas e posteriormente o número encontrado foi multiplicado pelo fator de diluição. Os valores obtidos foram comparados com o ponto de corte, equivalente a 10^6 , possibilitando a classificação em significativo e não significativo. Esse resultado pode ser relacionado com a presença dos fatores de virulência e de resistência, para avaliação de sua importância nessas infecções.

Assim, as contagens dos números de colônias obtidas nos cultivos dos aspirados traqueais positivos para *S. aureus* mostraram que 59% (26) puderam ser avaliadas como significativas. Das 15 amostras positivas para o gene *sea*, 56,2% (9) foram avaliadas como significativas, e o gene *sec-1* em 54,5% (6). Como observado na análise anterior, não foram identificados os genes *seb* ou *sed* em qualquer das amostras. Quanto ao fator de resistência, das amostras identificadas como MRSA (21), 57,1% (12) foram culturas significativas. Essas correspondências podem ser avaliadas na Tabela 2.

Tabela 2. Interpretação da contagem de colônias no aspirado traqueal e classificação em significativo e não significativo e sua relação com os fatores de virulência e resistência de *S. aureus*

Cultura Aspirado Traqueal	Enterotoxina					Resistência Oxacilina					
	Gene					Gene		Disco-difusão			
	<i>sea</i>		<i>sec-1</i>		Total	<i>mecA</i>		Oxacilina		Cefoxitina	
	n	%	n	%	n			n	%	n	%
Significativo (n=26)	9	56,2	6	54,5	15	12	57,1	7	53,8	7	50
Não Significativo (n=18)	7	43,7	5	45,4	12	9	42,8	6	46,1	7	50

5 Discussão

Embora a importância de MRSA em pneumonias e outras infecções nosocomiais seja notável, outros microrganismos também possuem importância significativa na causa dessas infecções e, portanto, são passíveis de discussão.

Observamos que a maioria dos microrganismos isolados (90/38,7%) eram Gram-negativos, em comparação com 19% (44) de *S. aureus*, mostrando que a maioria dos patógenos isolados são Gram-negativos. Outros estudos obtiveram resultados parecidos quanto à distribuição de microrganismos encontrados. Charles et al. (2013) realizaram um estudo sobre agentes etiológicos em pacientes com VAP, em que constataram que 83,4% dos patógenos encontrados eram de microrganismos Gram-negativos, frente a 8,3% de *Staphylococcus aureus*. Além disso, também encontraram 8,3% de leveduras, identificadas como *Candida albicans*, valor correspondente ao avaliado também neste estudo (14/8%).

Rotstein et al. (2008), publicaram um estudo destacando os principais problemas e considerações sobre VAP e HAP. Em suas avaliações quanto aos agentes etiológicos dessas pneumonias, encontram-se majoritariamente bacilos Gram-negativos, em um intervalo que varia de 35-80%, enquanto os cocos gram-positivos variam de 9-46% dos achados microbiológicos. Os valores encontrados por nós encontram-se dentro desses intervalos, como pode ser observado nos valores de bacilos Gram-negativos, correspondente a 48% (85) e nos valores de cocos Gram-positivos 39% (70).

Devido à predominância de alguns patógenos em HAP e VAP, foi desenvolvido o conceito de patógenos principais, incluindo enterobactérias e cocos gram-positivos, como *Streptococcus* e *Staphylococcus aureus* sensíveis a meticilina. Entretanto, a severidade do quadro de pneumonia pode aumentar frente ao uso prévio de antibióticos, selecionando microrganismos resistentes, tais como *S. aureus* resistentes à meticilina e *Pseudomonas aeruginosa*, colocando esses microrganismos em um patamar alto de importância na etiologia de tais infecções. Esse dado pode ser observado no estudo de Napolitano et al. (2003), no qual também foi observado que entre as bactérias gram-positivas o patógeno mais comumente encontrado é a espécie *S. aureus*, principalmente no que diz respeito à pneumonias nosocomiais.

Os patógenos mais frequentemente isolados em infecções adquiridas no ambiente hospitalar podem variar de hospital para hospital, mas como observado nos estudos anteriores, nota-se que o *Staphylococcus aureus* e a *Pseudomonas aeruginosa* encontram-se sempre presentes, variando entre maior ou menor percentual. Esse dado foi documentado

recentemente pelo CDC (Centers for Disease Control), constatando que na etiologia de HAP, os 2 principais patógenos são, de fato, *S. aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Em um estudo verificado em hospitais canadenses visando a epidemiologia das pneumonias causadas por MRSA e realizado por Tadros et al. (2013) foi possível observar que 42,2% das pneumonias nosocomiais causadas por MRSA foram adquiridas em unidades de terapia intensiva e que 14,3% dessas correspondiam a VAP. A maioria das cepas de *S. aureus* isolados nesse estudo (57,7%) estava presentes em quadros de infecção (Tabela 2). É importante ponderar que a taxa de pneumonias causadas por MRSA varia entre hospitais e entre países, o que pode ser constatado ao analisarmos dados de diferentes fontes (Moalla et al. 2008; Hidron Al et al. 2008).

A importância de MRSA nas pneumonias nosocomiais também foi avaliada em outros estudos. Uma pesquisa conduzida em 62 hospitais nos Estados Unidos, num período de 2005 a 2009, abrangeu 5975 pacientes em busca de pneumonias causadas por MRSA (Shorr et al, 2013). Esse estudo identificou 837 pacientes com MRSA, um percentual de 14% e apontou que entre indivíduos com HCAP (hospital care acquired pneumonia) é 1.7 vezes mais provável que a infecção seja por MRSA do que aqueles com CAP (community acquired pneumonia). Em nosso estudo, identificamos que dentre os indivíduos que possuíam *S. aureus*, 47,7% eram MRSA. Esses dados evidenciam a necessidade de um tratamento previamente designado para MRSA quando há o início de antibioticoterapia em pacientes nessas condições.

Podemos identificar diferenças entre os percentuais de MRSA encontrados nas UTI e sua relação com infecções. Essa análise também foi apontada por Meyer et al. (2010) em um estudo feito na Alemanha. O artigo pondera que os dados epidemiológicos de MRSA associado com pneumonias variam por região geográfica e até mesmo por tipo de UTI (como exemplo UTI neurológica e cardiológica) e que, portanto, generalizações acerca de epidemiologia devem ser feitos com cautela para evitar falsas interpretações e conclusões. Outro dado interessante do estudo nos revela variações de taxa de MRSA associado com VAP entre regiões: 37% na Alemanha, 54% nos Estados Unidos e 78% em países asiáticos e latino-americanos.

Embora tenhamos encontrado baixos percentuais de enterotoxinas presentes em contagens significativas (0% para *seb* e *sed*, 20% *sea* e 13,6% *sec-1*), existem estudos que estabelecem um papel para as enterotoxinas no agrave de problemas respiratórios, sempre associando-as com o desencadeamento de respostas inflamatórias intensas. Yu et al. (2012) conduziram um estudo com o objetivo de demonstrar que a presença da enterotoxina B

aumenta substancialmente a resposta inflamatória pulmonar. Eles concluíram que alta concentração de *S. aureus* produtores dessa enterotoxina pode ser crucial no desenvolvimento de problemas respiratórios. Um segundo estudo abrangeu superantígenos e seu papel no desenvolvimento de doença pulmonar letal (Strandberg et al. 2010), entre eles as enterotoxinas. O estudo foi conduzido em ratos, com conseqüente análise de seus pulmões, concluindo que *seb* e *sec-1* possuem papel mais relevante para o desenvolvimento de pneumonia.

Esses estudos apontam que as enterotoxinas podem possuir papel no agravamento das pneumonias agindo como superantígenos e desencadeando fortes respostas inflamatórias, porém, nenhum desses abrange a HAP, embora sejam utilizadas para o estudo cepas de *S. aureus*. O baixo percentual de enterotoxinas encontradas no presente estudo, o baixo número de pesquisas envolvendo as enterotoxinas e HA-MRSA e a análise dos artigos acima, nos leva a acreditar que as enterotoxinas podem piorar os casos de VAP, mas que não são agentes essenciais na patogênese dessa doença. Sugere-se que os fatores de resistência envolvendo cepas de *S. aureus* em casos de VAP sejam mais relevantes em comparação com os fatores de virulência, que tendem a envolver diversos superantígenos (PVL, TSST-1, HLA, enterotoxinas), mas que não são comuns a todas as pneumonias, e, portanto, isoladamente, não podem ser considerados como característicos de MRSA-VAP/HAP.

Quanto aos marcadores de resistência identificados por meio dos testes de disco-difusão, utilizando os discos contendo os antibióticos oxacilina e cefoxitina, observou-se que em 14 casos as cepas mostraram resistência às duas drogas, sendo que em apenas dois desses casos, não houve identificação de MRSA por métodos moleculares. Esse resultado sugere que a resistência pode ser originada por outro mecanismo que não a presença do gene *mecA*, embora seja incomum. Apenas um caso de MRSA apresentou sensibilidade à oxacilina, mas indicou resistência à cefoxitina, indicando que a utilização dessa droga em testes fenotípicos é importante. Diante desses resultados sugere-se que embora os testes fenotípicos sejam importantes na detecção de possíveis MRSA para avaliação da expressão gênica, não são mais acurados que os testes moleculares de determinação de resistência e de expressão de genes.

Como citado anteriormente o gênero *Staphylococcus* está altamente presente em casos de pneumonias nosocomiais, com predominância de *S. epidermidis* entre as coagulase-negativas (Napolitano et al. 2003). Embora geralmente relegadas ao papel de agentes contaminantes, a presença desses microrganismos podem vir a agravar a situação do paciente

com VAP, pois seus fatores de virulência somam-se aos fatores de virulência do principal agente causador da doença naquele indivíduo.

6 Conclusão

- O número de amostras identificadas como *Staphylococcus* spp. foi expressivo, e a espécie mais encontrada foi *S. aureus*, indicando que a espécie está bastante presente em pacientes que se encontram em ventilação mecânica, aumentando as chances de desenvolvimento de VAP, seguida de *S. epidermidis*.
- Entre as cepas identificadas como *S. aureus*, identificou-se que parcela significativa era MRSA, e que a maioria estava associada a possíveis infecções. Esses dados nos indicam que a resistência à meticilina é um fator complicador no tratamento de infecções nosocomiais, e de possíveis VAP.
- Entre os genes das enterotoxinas pesquisados, os genes *sea* e *sec-1* foram encontrados associados com culturas de aspirado significativas e contaminantes, indicando que esses fatores de virulência podem piorar o quadro de pneumonias nosocomiais, aumentando a resposta inflamatória, .
- A identificação de cepas MRSA por meio de testes de sensibilidade disco-difusão podem ser utilizados, desde que sejam incluídos os antibióticos oxacilina e cefoxitina. Isso pode ser comprovado analisando os resultados obtidos nesse estudo, onde parte significativa das amostras que possuíam o gene *mecA* eram resistentes às duas drogas, porém uma delas, identificada como MRSA era sensível à oxacilina e resistente à cefoxitina, revelando a importância das duas drogas nesse tipo de análise. Entretanto, embora sejam importantes para identificar cepas que estejam expressando a resistência, esse teste não é suficiente para identificar todas as cepas MRSA, já que nem todas as amostras positivas para o gene *mecA* se mostraram resistentes no método de disco-difusão com oxacilina e cefoxitina.

7 Referências

Centers for Disease Control and Prevention. Guidelines for prevention of nosocomial pneumonia. MMWR Recomm Rep 1997; 46:1–79.

Charles MVP, Easow JM, Joseph NM, Ravishankar M, Kumar S, Umadevi S. Aetiological agents of ventilator-associated pneumonia and its resistance pattern – a threat for treatment. AMJ 2013, 6, 9, 430-434. <http://dx.doi.org/10.4066/AMJ.2013.1710>.

CLSI. Clinical and Laboratory standards Institute. M100-S23 Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-third informational supplement of V. 33 n. 1, january 2013.

Cunha MLRS, Sinzato YK, Silveira LVA Comparison of Methods for the Identification of Coagulase-negative *Staphylococci* Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro December 2004, Vol. 99(8): 855-860,

Cunha MLRS, Peresi E, Calsolari RAO, Araújo Jr JP. Detection of Enterotoxins genes in coagulase-negative *Staphylococci* isolated from foods. Braz J Microbiol 2006. 37: 64-69.

DeRyke CA, Lodise Jr. TP, Rybak MJ, McKinnon PS. Epidemiology, Treatment, and Outcomes of Nosocomial Bacteremic *Staphylococcus aureus* Pneumonia. Chest. 2005; 128; 1414-1422.

Hartman BJ and Tomasz A. Low-affinity penicillin-binding protein associated with β -lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol 1984. 158:513–516.

Hidron AI, Edwards JR, Patel J, Horan TC, Sievert DM et al.. Antimicrobial resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. [NHSN Annual Update] Infect Control Hosp Epidemiol 29: 996-1011. (2008) doi:10.1086/591861.

Hiramatsu K, Konodo N, and Ito T. Genetic basis for molecular epidemiology of MRSA. J. Infect. Chemother 1996 2:117–129.

Johnson WM, Tyler SD, Ewan EP, Ashton FE, Pollard DR, Rozee KR. Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. Journal of Clinical Microbiology 1991 29: 426-430.

Kollef MH, Sherman G, Ward S, Fraser VJ. Inadequate Antimicrobial Treatment of Infections: A Risk Factor for Hospital Mortality Among Critically Ill Patients. Chest 1999; 115; 462-474.

Konemman EV, Allen SD, Sowell VR, Sommer HM. Introdução à microbiologia médica. In: Diagnóstico microbiológico: texto e Atlas colorido. 5º ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001.

Lopes HV. CA-MRSA: Um novo problema para o infectologista. Rev Panam Infectol 2005; 7: 34-36.

Malangoni MA, Crafton R, Mocek, FC. Pneumonia in the Surgical Intensive Care Unit: Factors Determining Successful Outcome. Am J Surg 1994; 167:250-55.

Meyer E, Schwab F, Gastemeier P. Nosocomial methicillin resistant *Staphylococcus aureus* pneumonia – Epidemiology and trends based on data of a network of 586 German ICUs (2005-2009) Eur J Med Res (2010) 15: 514-524

Mimica MJ, Mendes CMF. Diagnóstico laboratorial da resistência à oxacilina em *Staphylococcus aureus*. J Bras Patol Med Lab 2007; 43: 399-406.

Moalla M, Baratin D, Giarrrd H, Vanhems P. Incidence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nosocomial infections in intensive care units in Lyon University Hospitals, France, 2003-2006. Infect Control Hosp Epidemiol (2008) 29: 454-456.

Murakami K, Minamide K, Wada K, Nakamura E, Teraoka H, Watanabe S. Identification of methicillin-resistant strains of *Staphylococci* by polymerase chain reaction. Journal of Clinical Microbiology 1991 29: 2240-2244.

Napolitano, L. M. Hospital-acquired and ventilator-associated pneumonia: what's new in diagnosis and treatment The American Journal of Surgery 2003 186/5A

Noskin GA, Rubin RJ, Schentag JJ. The burden of *Staphylococcus aureus* infections on hospitals in the United States: an analysis of the 2000 and 2001 Nationwide In Patient Sample Database. Arch Intern Med 2005; 165:1756–1761.

Oplustil CP, Zoccoli CM, Tobouti NR, Sinto SI 2010. Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica. Editora Savier 3ª edição. Capítulo 16 p.231-42.

Reynolds, PE. The essential nature of *Staphylococcal* penicillin binding proteins, American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1988 p. 343–351

Rotstein C, Evans G, Born A. Clinical practice guidelines for hospital-acquired pneumonia and ventilator-associated pneumonia in adults. Can J Infect Dis Med Microbiol 2008; 19(1):19-53.

Saïd-Salim B, Mathema B, Braughton K, Davis S, Sinsimer D, Eisner W. Differential Distribution and Expression of Pantón-Valentine Leucocidin among Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains. J Clin Micr. 2005; 43:3373–3379.

SBPT – Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia 2001. Parte II – Pneumonia nosocomial. Consenso Brasileiro de Pneumonias em Indivíduos Adultos Imunocompetentes. J Pneumol 27 (Supl1) – abril de 2001. Disponível em: http://www.jornaldepneumologia.com.br/portugues/suplementos_caps.asp?id=53

Shorr et al.: A risk score for identifying methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in patients presenting to the hospital with pneumonia. BMC Infectious Diseases 2013 13:268.

Song, MD, Wachi M, Doi M, Ishino F, and Matsubishi M. Evolution of an inducible penicillin-target protein in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by gene fusion. FEBS Lett. 1987 221:167–171.

Strandberg KL, Rotschafer HJ, Vetter SM, Buonpane RA, Krank DM, Schlievert, PM *Staphylococcal* Superantigens Cause Lethal Pulmonary Disease in Rabbits The Journal of Infectious Diseases 2010; 202(11):1690–1697

Tadros M, Williams V, Coleman BL, McGeer AJ, Haider S. Epidemiology and Outcome of Pneumonia Caused by Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Canadian Hospitals. PLoS ONE (2013) 8(9): e75171. doi:10.1371/journal.pone.0075171

Valles J, Artigas A, Rello J, Bonsoms N, Fontanals D, Blanch L, Fernandez R, Baigorri F, Mestre J. Continuous aspiration of subglottic secretions in preventing ventilator-associated pneumonia. Ann Intern Med 1995; 122:179–186.

Watanabe H, Masaki H, Asoh N, Watanabe K, Oishi K, Kobayashi S, Sato A, Nagatake T. Molecular Analysis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* as a Causative Agent of Bronchopulmonary Infection: Relation to Colonization in the Upper Respiratory Tract. J Clin Micro. 2000; 38(10):3867–3869.

Yu J, Oh MH, Park J-U, Myers AC, Dong C, et al. Epicutaneous Exposure to *Staphylococcal* Superantigen Enterotoxin B Enhances Allergic Lung Inflammation via an *IL-17A* Dependent Mechanism. PLoS ONE (2012) 7(7): e39032. doi:10.1371/journal.pone.0039032

Zahar JR, Clec'h C, Tafflet M, Garrouste-Orgeas M, Jamali S, Mourvillier B, Lassence A, Descorps-Declere A, Adrie C, Beauregard MAC, Azoulay E, Schwebel C, Timsit JFO. Is Methicillin Resistance Associated with a Worse Prognosis in *Staphylococcus aureus* Ventilator-Associated Pneumonia Clin Infect Dis 2005; 41:1224–31.

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 Micro. 2005;43:5026–5033.