

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Staphylococcus aureus RESISTENTES À OXACILINA ISOLADOS DE
HOSPITAIS DO RIO DE JANEIRO: ASPECTOS FENOTÍPICOS E
MOLECULARES DA RESISTÊNCIA E CORRELAÇÃO COM
VIRULÊNCIA E GENÓTIPOS

Roberta Mello Ferreira Caboclo

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



UFRJ

Staphylococcus aureus RESISTENTES À OXACILINA ISOLADOS DE HOSPITAIS DO
RIO DE JANEIRO: ASPECTOS FENOTÍPICOS E MOLECULARES DA
RESISTÊNCIA E CORRELAÇÃO COM VIRULÊNCIA E GENÓTIPOS

Roberta Mello Ferreira Caboclo

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia).

Orientadora: Kátia Regina Netto dos Santos

Rio de Janeiro
Fevereiro de 2008

Staphylococcus aureus RESISTENTES À OXACILINA ISOLADOS DE HOSPITAIS
DO RIO DE JANEIRO: ASPECTOS FENOTÍPICOS E MOLECULARES DA
RESISTÊNCIA E CORRELAÇÃO COM VIRULÊNCIA E GENÓTIPOS

Roberta Mello Ferreira Caboclo

Orientadora: Kátia Regina Netto dos Santos

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia).

Aprovada por:

Presidente, Prof. Sérgio Eduardo Longo Fracalanza

Prof. Simone Aranha Nouér

Profa. Marinella Silva Laport

Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

Rio de Janeiro
Fevereiro de 2008

À minha mãe, grande exemplo da minha vida. Obrigada por ter
feito o possível e muitas vezes o impossível para que eu pudesse
realizar os meus sonhos. Te amo!

AGRADECIMENTOS

“Cada um que passa em nossa vida,
passa sozinho, pois cada pessoa é única
e nenhuma substitui outra.
Cada um que passa em nossa vida,
passa sozinho, mas não vai só
nem nos deixa sós.
Leva um pouco de nós mesmos,
deixa um pouco de si mesmo.
Há os que levam muito,
mas há os que não levam nada.
Essa é a maior responsabilidade de nossa vida,
e a prova de que duas almas
não se encontram ao acaso.”

(Antoine de Saint-Exupéry)

À Dra. Kátia, pela grande oportunidade, ensinamentos, paciência e, sobretudo, pela confiança depositada. Obrigada por ter sido não só orientadora, mas também uma grande amiga e incentivadora.

Aos grandes amigos do Laboratório de Infecção Hospitalar, Andréa, Ariane, André, Cristiane, Carolzitcha, Eliezer, Fernanda, Fred, Gustavo, Ingrid, Ivana, Milena, Natália, Priscila, Ricardo e “Dra.” Viviane, pelo convívio, amizade e imensa ajuda.

Ao Laboratório de Micobactérias, pelo espaço cedido durante as obras do nosso laboratório, em especial aos amigos que fiz nesses três meses de convívio, Ana, Marcus e Marlei.

À Equipe do Laboratório de Microbiologia Molecular, pela ajuda e momentos de descontração.

Aos amigos que fiz ao longo desses dois anos no Instituto de Microbiologia, em especial ao Marcos Dornellas, Karla, Felipe, Orlando e Ivi.

À grande amiga Ivana, por ter me apresentado ao Laboratório de Infecção Hospitalar.

À Equipe do Hospital Naval Marcílio Dias, André, Maria, Beth, Carla e Sargento Queiroz, pelas amostras cedidas e por toda a ajuda.

À Equipe do Hospital Copa D’or, Maria José Felix, Vanessa, Bruna e Danielle Borgui, pelas amostras e informações cedidas.

Aos companheiros de sextas-feiras no bloco A, Ana Paula, Felipe, Karla e Natália, obrigada por todos os bons momentos que passamos juntos.

Ao Eduardo, namorado, amigo e grande companheiro. Obrigada por compartilhar tantas coisas, pelos momentos de alegria, pela paciência nos meus muitos momentos de estresse, por passar madrugadas em claro comigo formatando gráficos, tabelas e slides e por compreender minha ausência principalmente nesses últimos meses.

A minha pequena “grande” família, mãe, irmão e Cecília, simplesmente por existirem. Gil, você também faz parte deste grupo, obrigada por todo o incentivo e ajuda.

A minha segunda família, minhas grandes amigas trouxas, que me acompanham desde a infância, por todos os momentos de descontração, chopes no Pontinho e por estarem presentes em todos os momentos em que precisei. Amo todas vocês.

Aos meus “irmãos” Cecília, Guigo, Meme e Viviane. Não há distância no mundo capaz de apagar a ligação que temos.

Aos meus “filhos” (ou seriam irmãos?) Arthur, Anita e Alice, por me fazerem entender que a felicidade pode estar presente nas coisas simples da vida.

A todos os meus amigos do HGB, por tudo.

Ao Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, nas pessoas da Diretora Profa. Agnes Sá Figureiredo, e da Coordenadora de Pós-Graduação Profa. Thais Souto-Padrón.

A FAPERJ, CNPq, CAPES, PRONEX e FUJB, pelo suporte financeiro.

AGRADECIMENTO ESPECIAL:

Algumas pessoas aparecem em nossas vidas por acaso e são capazes de alterar completamente o rumo de todas as coisas. Quatro pessoas foram essenciais nessa minha jornada, principalmente nos últimos meses, em que precisei tanto de ajuda. No meio de toda a angustia, estresses e lágrimas da reta final descobri em vocês quatro amigos, mas acima de tudo, descobri que ainda podemos encontrar pessoas transparentes, boas e de enorme coração.

Felipe, Karla, Natália e Marlei, obrigada por tudo, pela companhia nas noites no laboratório, pela ajuda em absolutamente tudo o que precisei, pelos momentos de alegria e acima de tudo, pela amizade. Jamais vou esquecer o que vocês fizeram por mim.

“Não fiz o melhor, mas fiz tudo para que o melhor fosse feito.
Não sou o que deveria ser, mas não sou o que era antes”.

(Martin Luther King)

RESUMO

Staphylococcus aureus RESISTENTES À OXACILINA ISOLADOS DE HOSPITAIS DO RIO DE JANEIRO: ASPECTOS FENOTÍPICOS E MOLECULARES DA RESISTÊNCIA E CORRELAÇÃO COM VIRULÊNCIA E GENÓTIPOS

Roberta Mello Ferreira Caboclo

Orientadora: Kátia Regina Netto dos Santos

Resumo da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia).

A epidemiologia das infecções hospitalares por *S. aureus* resistentes à oxacilina (ORSA) tem se alterado devido aos recentes relatos de amostras não multirresistentes, SCCmec IV, associadas a presença de fatores de virulência, como a leucocidina de Panton Valentine (PVL). O objetivo deste trabalho foi verificar a prevalência dos tipos de SCCmec em amostras ORSA isoladas de dois hospitais do Rio de Janeiro e correlacionar com a resistência aos antimicrobianos, virulência e genótipos. Foram analisadas 100 amostras ORSA isoladas de 98 pacientes, 77 isoladas no Hospital Naval Marcílio Dias (HNMD) e 23 no Hospital Copa'Dor (HCD). Entre elas, 61% apresentaram o SCCmec III, 24% SCCmec IV e 15% SCCmec II. As amostras tipo III foram resistentes a pelo menos seis classes de antimicrobianos e 93,5% delas apresentaram Concentração Mínima Inibitória (CMI) para oxacilina maior ou igual a 256 µg/mL. As amostras tipo IV foram, em geral, resistentes a no máximo quatro classes e 91,7% delas apresentou CMI para oxacilina entre 8 e 32 µg/mL. As amostras tipo II apresentaram resistência intermediária aos dois tipos anteriores e CMI para oxacilina de 128µg/mL para 73,3 % das amostras. A CMI para vancomicina foi de 1 µg/mL para 87% das amostras. Após análise por PFGE, 88,9% das 27 amostras tipo III analisadas, foram do genótipo A, relacionado ao clone hospitalar prevalente no Brasil. Das 15 amostras tipo II, nove apresentaram similaridade ao clone USA800 (pediátrico) e três ao clone USA100 (Nova York/Japão). As amostras tipo IV apresentaram grande diversidade genômica. Entre as 18 amostras do HNMD, 66,7% pertenciam ao genótipo F, similar ao clone USA400, relacionado a infecções comunitárias nos EUA. No HCD as seis amostras tipo IV apresentaram seis perfis diferentes. Seis amostras, todas tipo IV, positivas para os genes da PVL, quatro do mesmo paciente no HCD, e as outras duas de pacientes do HNMD, sendo uma considerada de origem hospitalar, foram detectadas. Cinco delas foram similares a um dos clones da Oceania, enquanto a outra foi relacionada ao USA800. Nossos resultados mostram que clones descritos em outros países estão disseminados e causando infecções tanto de origem comunitária quanto hospitalar no Brasil. A diferença observada entre os hospitais em relação a diversidade genômica das amostras ORSA tipo IV pode ser em parte decorrente do perfil e número de pacientes atendidos e/ou do tipo de atendimento médico dispensado.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina; aspectos fenotípicos e moleculares da resistência; virulência; diversidade clonal.

Rio de Janeiro
Fevereiro de 2008

ABSTRACT

OXACILLIN-RESISTANT *Staphylococcus aureus* ISOLATED FROM RIO DE JANEIRO HOSPITALS: PHENOTYPIC AND MOLECULAR PROFILES OF RESISTANCE ASSOCIATED WITH GENOTYPING AND VIRULENCE PATTERNS

Roberta Mello Ferreira Caboclo

Orientadora: Kátia Regina Netto dos Santos

Abstract da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia).

Epidemiology of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* (ORSA) hospital infections has been changing since nonmultiresistant isolates, carrying SCCmec IV and virulence genes, like Panton Valentine leukocidin (PVL) has emerged as a nosocomial pathogen. The aims of the present study was to detect SCCmec types among ORSA isolated from two Rio de Janeiro hospitals and establish a relationship between the resistance, virulence and genotypic patterns. One hundred isolates, obtained from 98 patients were analyzed, 77 from Hospital Naval Marcílio Dias (HNMD) and 23 from Hospital Copa D'or (HCD). The SCCmec typing showed that 61% were SCCmec III, 24% SCCmec IV and 15% SCCmec II. Resistance to at least six antimicrobials was seen among all the SCCmec III isolates and 93,5% of them showed oxacillin Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of 256 µg/mL. SCCmec IV isolates were resistant, in general, to up five antimicrobials and 91,7% presented oxacillin MIC between 8 and 32 µg/mL. SCCmec II isolates showed intermediate profiles of resistance and oxacillin MIC of 128 µg/mL for 73,3% of them. Vancomycin MIC was 1 µg/mL for 87% of the isolates. PFGE analyses showed that 88,9% of SCCmec III isolates presented the genotype A, related to the Brazilian clone. Among the 15 SCCmec II isolates, nine were related to the USA800 clone (Pediatric) and three were related to the USA 100 clone (NY/Japan). The type IV isolates showed high genomic diversity. Among the 18 isolates collected from HNMD, 66,7% presented the genotype F, related to the USA400 clone, associated with community acquired infections in the USA. The ORSA isolates (six strains) from HCD presented six distinct genotypes. The PVL genes were detected in six type IV isolates, four of them collected from the same patient at the HCD and the others from HNMD patients. One isolated collected from HNMD had a nosocomial origin. The PFGE showed that five of these isolates were related to one of the Oceania clones, while the another isolate was like the USA800. Our results reveal that prevalent clones in other countries are emerging in Brazil, being responsible for both community and nosocomial acquired infections. The difference observed between the hospitals in relation to the genomic diversity of type IV ORSA isolates could be associated with the patients profile and number as well as the medical health care.

Key words: Oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*; phenotypic and molecular resistance profiles; virulence; genetic diversity

Rio de Janeiro
Fevereiro de 2008

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	27
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
3.1 Desenho do estudo.....	28
3.1.1 Amostras bacterianas.....	28
3.1.2 Aspectos clínicos e éticos.....	29
3.1.3 Análise estatística.....	30
3.2 Identificação do gênero <i>Staphylococcus</i>	30
3.2.1 Determinação do aspecto morfo-tintorial.....	30
3.2.2 Produção da enzima catalase.....	30
3.2.3 Susceptibilidade a bacitracina.....	31
3.3 Confirmação da identificação da espécie de <i>S. aureus</i> através de testes fenotípicos.....	31
3.3.1 Produção de hemólise.....	31
3.3.2 Produção do fator “clumping”.....	31
3.3.3 Produção da enzima coagulase livre.....	31
3.3.4 Produção de acetoína.....	32
3.4 Avaliação da susceptibilidade aos antimicrobianos.....	33
3.4.1 Teste de difusão a partir do disco.....	33
3.4.2 Teste fenotípico para detecção de resistência induzida à clindamicina por eritromicina.....	33
3.4.3 Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) para oxacilina e vancomicina.....	34
3.5 Métodos Moleculares.....	34
3.5.1 Liberação do DNA através de lise térmica.....	34
3.5.2 Liberação do DNA através da guanidina.....	35
3.5.3 PCR multiplex para detecção dos genes que codificam a leucocidina de Panton Valentine (<i>lukS-PV</i> e <i>lukF-PV</i>) e a α -hemolisina (<i>hla</i>).....	36
3.5.4 PCR multiplex para tipagem do SCCmec.....	37
3.5.5 Análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico por eletroforese em gel de campo pulsado (“Pulsed Field Gel Electrophoresis”, PFGE).....	39
4 RESULTADOS.....	42
5 DISCUSSÃO.....	67
6 CONCLUSÕES.....	80
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82
ANEXOS.....	101

1 INTRODUÇÃO

1. Infecções Hospitalares

As infecções hospitalares bacterianas constituem uma importante causa de morbidade e mortalidade em instituições de saúde de todo o mundo, constituindo um grave problema de saúde pública tanto em países desenvolvidos quanto em países em desenvolvimento. Milhares de pacientes são acometidos anualmente, resultando em tempo de hospitalização prolongado e altos custos para estas instituições (EL FAR, MARINO & MEDEIROS, 2001; WHO, 2002). Esse tipo de infecção apresenta um impacto significativo nas taxas de mortalidade (GARCÍA-MARTÍN *et al.*, 2001; FABBRO-PERAY *et al.*, 2007), além de aumentar o tempo de internação e poder dobrar os gastos por paciente (CHEN, CHOU & CHOU, 2005).

A incidência de infecções hospitalares varia bastante com o tamanho dos hospitais, a especialidade de cada enfermaria, além de outros fatores como tempo de permanência dos pacientes, tendências locais no uso de antimicrobianos e condições de higiene (BERGOGNE-BEREZIN, 1999). Estima-se que 5 a 10% dos pacientes internados adquiram infecções hospitalares, podendo alcançar índices até três vezes maiores nas unidades de terapia intensiva. Unidades de tratamento para grandes queimados e enfermarias de clínica cirúrgica encontram-se em segundo e terceiro lugares, respectivamente (FERNANDES *et al.*, 2000).

Fatores de risco para aquisição de infecções hospitalares incluem idade avançada, presença de comorbidades, antibioticoterapia prévia, intervenções cirúrgicas e uso de procedimentos médicos invasivos (PITTET, 1999). Um estudo conduzido em unidades de terapia intensiva, nos Estados Unidos, demonstrou que 87% das bacteriemias, 86% das

pneumonias e 95% das infecções urinárias estavam associadas à presença de dispositivos médicos invasivos (RICHARDS *et al.*, 1999).

Segundo dados do sistema NNIS (“National Nosocomial Infections Surveillance”), coletados no período de 1990 a 1996, em hospitais dos Estados Unidos, as infecções de origem hospitalares mais frequentes são as urinárias, seguidas de infecções de sítio cirúrgico, bacteriemias e pneumonias (NNIS, 1996).

A cada ano, aproximadamente, dois milhões de pacientes adquirem infecções hospitalares nos Estados Unidos, dos quais aproximadamente 90.000 (4,5%) morrem devido à infecção (CDC, 2001). Nas últimas décadas, esse quadro tem se agravado devido às infecções causadas por bactérias multirresistentes, resultando em tempo de hospitalização ainda maior e maiores taxas de mortalidade, quando comparado a infecções causadas por amostras sensíveis da mesma espécie (MUTO *et al.*, 2003). Mais de 70% das bactérias agentes de infecções hospitalares são resistentes a pelo menos um dos antimicrobianos comumente utilizados no tratamento de infecções causadas pelo patógeno (CDC, 2001). Além disso, os constantes avanços da medicina, tornando crônicas muitas patologias que outrora foram responsáveis por altas taxas de mortalidade e o aumento na expectativa de vida da população são diretamente responsáveis pelo aumento progressivo nas taxas de infecções hospitalares (WHO, 2002).

Dados do sistema NNIS, publicados em 2004, demonstram que as taxas de resistência em bactérias causadoras de infecções hospitalares têm aumentado para a maioria das espécies, entre elas *Enterococcus* resistentes à vancomicina, *Staphylococcus* resistentes à oxacilina e *Pseudomonas aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos e quinolonas, quando comparados aos dados de 1998-2002. O uso de antimicrobianos está fortemente associado à emergência desses patógenos multirresistentes no ambiente hospitalar (KOLLEF, 2000).

Embora muitos dados sejam divulgados em países desenvolvidos, há poucos dados de infecções hospitalares e de seu impacto em países em desenvolvimento. Recentemente, foi desenvolvido um estudo de vigilância, baseado num Consórcio Internacional de Controle de Infecção Hospitalar (INICC, “International Nosocomial Infection Control Consortium”), utilizando dados de 2002 a 2005, coletados em unidades de terapia intensiva de oito países em desenvolvimento, entre eles o Brasil (ROSENTHAL *et al.*, 2006). Os resultados demonstraram que, embora a frequência de utilização de dispositivos médicos seja semelhante a encontrada em hospitais norte-americanos, a incidência de infecções relacionadas a estes dispositivos foi cerca de quatro vezes maior nos países da América Latina. Além disso, infecções causadas por microorganismos multirresistentes, entre eles *S. aureus* resistentes à oxacilina, apresentam prevalência maior (84%) quando comparada a prevalência descrita no sistema NNIS, em 2004 (48%).

1.2 O gênero *Staphylococcus*

Membros do gênero *Staphylococcus* são descritos como cocos Gram-positivos, com 0,5 a 1,5 μm de diâmetro e genoma com baixo conteúdo C + G (BANNERMAN, 2003). Apresentam-se sozinhos, aos pares, em pequenas cadeias de três a quatro células e em cachos. As espécies do gênero são resistentes à bacitracina, imóveis, não formadoras de esporos, tolerantes a altas concentrações de NaCl, geralmente anaeróbias facultativas e catalase positivas, exceto para *S. aureus* subespécie *anaerobius* e *S. saccharolyticus* (BANNERMAN, 2003; PEACOCK, 2005). O gênero *Staphylococcus* pertence à família Staphylococcaceae, sendo composto por 41 espécies e 24 subespécies (EUZÈBY, 2008) amplamente distribuídas na natureza e constituindo um dos principais grupos de bactérias que colonizam pele e mucosas de mamíferos (JARLOV, 1999; PEACOCK, 2005).

Os *Staphylococcus* constituem a principal causas de infecções bacterianas no ambiente hospitalar, mas também estão entre as principais causas de infecções comunitárias (WILKINSON, 1997). As espécies de *Staphylococcus* estão distribuídas em dois grandes grupos: *Staphylococcus* coagulase-negativos (SCN) e coagulase-positivos. Esta divisão é fundamentada na produção de uma enzima extracelular denominada coagulase, capaz de converter o fibrinogênio sangüíneo em fibrina, conferindo à bactéria a capacidade de coagular o plasma humano (ARCHER, 2000). Entre os coagulase-positivos, *Staphylococcus aureus* é o principal representante, não só por sua prevalência em infecções, como também por sua virulência (ARCHER, 1998). Esta espécie difere, consideravelmente, de outras espécies de *Staphylococcus* por produzir uma variedade de toxinas extracelulares e outras proteínas, enquanto os SCN produzem poucos ou nenhum desses fatores (PROJAN & NOVICK, 1997).

Os SCN, que incluem a maioria das espécies do gênero *Staphylococcus*, foram durante muito tempo reconhecidos como patógenos oportunistas (HUEBNER & GOLDMANN, 1999). No entanto, a capacidade dos SCN em causar infecções tornou-se evidente nas últimas décadas, a partir da crescente utilização de recursos modernos e invasivos de diagnóstico e terapêutica, como cateteres, marcapassos e próteses articulares, e devido ao crescente aumento no número de pacientes imunocomprometidos (CASEY, LAMBERT & ELLIOT, 2007).

1.2.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus é a espécie mais estudada do gênero. A grande variedade de infecções que esse microorganismo pode causar é devido à presença de inúmeros mecanismos de virulência (ARCHER, 1998). Essa espécie está associada, desde 1880, com infecções graves, tendo atingido até 82% de taxa de mortalidade por bacteriemia na era pré-antibiótica (SMITH & JARVIS, 1999; SALYERS & WHITT, 2003). Ainda hoje, está relacionado a altas

taxas de morbidade e mortalidade, devido não só a grande variedade de toxinas produzidas como também pela rapidez com que pode desenvolver resistência a diferentes classes de antimicrobianos (CASEY, LAMBERT & ELLIOT, 2007).

O ser humano é considerado o reservatório natural de *S. aureus*, e as narinas anteriores constituem o principal nicho deste microorganismo, sendo aproximadamente 20% dos indivíduos carreadores persistentes e 60% carreadores intermitentes (KLUYTMANS, VAN BELKUM & VERBRUGH, 1997; LOWY, 1998). Essa espécie é frequentemente transmitida por contato pessoal, sendo o reservatório um indivíduo com uma ferida aberta ou um carreador assintomático (MARANAN *et al.*, 1997). Em geral, a infecção ocorre quando há uma quebra na barreira cutâneo-mucosa, com o subsequente acesso desse patógeno aos tecidos adjacentes e/ou à corrente sanguínea. A considerável persistência em superfícies inanimadas favorece a contaminação cruzada e a disseminação do *S. aureus* (LIVERMORE, 2000).

S. aureus pode causar desde infecções cutâneas superficiais, como impetigo, celulite e abscessos, até infecções graves decorrentes da invasão direta dos tecidos por amostras presentes na pele ou mucosas, como bacteriemia, endocardite, pneumonia e meningite (SMITH & JARVIS, 1999). Além disso, essa espécie está relacionada com patologias associadas à produção de exotoxinas com ação de superantígenos, tais como intoxicações alimentares e síndromes da pele escaldada e do choque tóxico (BOHACH *et al.*, 1990).

Dados do programa SENTRY de vigilância da resistência antimicrobiana, apontam *S. aureus* como o agente etiológico mais freqüente em infecções da corrente sanguínea, pele e tecidos moles, além de ser causa freqüente de infecções do trato respiratório inferior, sendo grande parte dessas infecções causadas por amostras resistentes à oxacilina (STREIT *et al.*, 2004). Contudo, as taxas de resistência a esse fármaco têm aumentado consideravelmente nos últimos anos, tornando a vancomicina uma das únicas alternativas para o tratamento dessas

infecções, um antimicrobiano que pode apresentar toxicidade elevada e biodistribuição tecidual variada (RYBAK, 2006).

1.2.1.1 Fatores de Virulência

S. aureus produz uma variedade de fatores de virulência extracelulares e outras proteínas, que contribuem para sua habilidade de colonizar e invadir tecidos e causar doenças (DINGES, ORWIN & SCHLIEVERT, 2000).

A doença causada por *S. aureus* é multifatorial, geralmente resultado da produção simultânea de vários fatores de virulência (BHAKDI & TRANUM-JENSEN, 1991). Inúmeros genes de virulência foram identificados em *S. aureus*, conferindo a esta espécie a capacidade de causar grande diversidade de patologias, no entanto, quais desses genes são necessários em cada uma delas permanece desconhecido. Portanto, é difícil definir o papel exato de um fator de virulência específico no desenvolvimento e evolução clínica da doença causada por esse microorganismo (FENG *et al.*, 2007).

Durante o processo de colonização por *S. aureus*, normalmente, um conjunto de adesinas de superfície está envolvido. Essas adesinas, conhecidas como MSCRAMMS (“microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules”) são capazes de se ligar aos componentes da matriz extracelular do hospedeiro. Além disso, praticamente todas as amostras produzem enzimas como proteases, nuclease, hialuronidase, lipase e collagenase. A função principal dessas enzimas está associada à invasão do patógeno, mas também auxiliam na obtenção de nutrientes através da transformação de substâncias do tecido hospedeiro (DINGES, ORWIN & SCHLIEVERT, 2000).

A parede celular do *S. aureus* é composta de ácido teicóico e peptidoglicana, na qual está inserida a proteína A, específica da espécie, presente em mais de 95% das amostras. Devido à sua reatividade com a porção da fração cristalizada (Fc) das imunoglobulinas, essa

proteína agrega estas moléculas, além de fixar complemento, processos que implicam na patogenia das infecções pelo patógeno (JOHN & BARG, 1996). Segundo alguns autores, mais de 90% das amostras de *S. aureus* também produzem uma cápsula polissacarídica em sua superfície, que atua como fator antifagocitário (JOHN & BARG, 1996; LEE & LEE, 2000).

S. aureus apresentam ainda uma eficaz e complexa estratégia de patogenicidade que resulta na secreção de várias exoproteínas que afetam diretamente o metabolismo de células eucarióticas (MENESTRINA, SERRA & PRÉVOST, 2001). As principais toxinas incluem quatro hemolisinas (α , β , δ e γ), além de exoproteínas adicionais que incluem a toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1), enterotoxinas (SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH, SEI, SEJ, SEM, SEN, SEO), toxinas esfoliativas (ETA e ETB) e leucocidinas (DINGES, ORWIN & SCHLIEVERT, 2000). A principal função dessas exotoxinas adicionais pode ser a inibição das células do sistema imune. Além disso, a TSST-1 e a maioria das enterotoxinas são também superantígenos, com capacidade de ativar linfócitos T, independente da especificidade dessas células, desencadeando uma série de respostas inflamatórias, como choque, febre e hipotensão, decorrentes da liberação de citocinas pelas células do sistema imune (BOHACH *et al.*, 1990; DINGES, ORWIN & SCHLIEVERT, 2000; LOIR, BARON & GAUTIER, 2003; FOSTER, 2005).

Grande parte dos genes que codificam estas toxinas, incluindo as enterotoxinas, está situada em ilhas de patogenicidade, passíveis de serem transferidas entre amostras. Outros mecanismos bem estudados de transferência gênica de fatores de virulência incluem recombinações e transferência por bacteriófagos. A possibilidade de transferência destes genes pode acarretar rápidas alterações na virulência e habilidade em causar doenças de diferentes amostras (HOLDEN *et al.*, 2004; FENG *et al.*, 2007).

1.2.1.1.1 Leucocidina de Panton Valentine

A leucocidina de Panton Valentine (PVL) foi primeiramente descrita em 1932, por Panton e Valentine (PANTON & VALENTINE, 1932). Essa toxina, codificada pelos genes *lukS-PV* e *lukF-PV*, consiste em duas proteínas secretadas separadamente, conhecidas como componentes S e F, que atuam sinergicamente para lisar células polimorfonucleares, monócitos e macrófagos (PREVÓST *et al.*, 1995b). Os genes que a codificam encontram-se inseridos em bacteriófagos que possuem a capacidade de integrar-se no cromossomo de *S. aureus* (KANEKO & KAMIO, 2004).

A leucocidina de Panton Valentine foi reconhecida recentemente como um fator de virulência importante nas infecções por amostras de *S. aureus* resistentes à oxacilina (ORSA, “oxacillin resistant *Staphylococcus aureus*”) de origem comunitária (LINA *et al.*, 1999; VANDENESCH *et al.*, 2003; WANNET *et al.*, 2005). Amostras ORSA produtoras de PVL estão fortemente associadas com infecções cutâneas e pneumonias necrosantes (GILLET *et al.*, 2002; YAMASAKI *et al.*, 2005). Apesar disso, Saïd-Salim e colaboradores (2005) avaliando amostras PVL positivas e negativas quanto à capacidade de lisar células polimorfonucleares, *in vitro*, ao contrário do que se esperava, encontraram resultados semelhantes para ambas. Outro estudo, conduzido por Voyich e colaboradores (2006), utilizando modelos animais de sepse e abscessos, confirmou os resultados anteriores ao demonstrar que amostras PVL positivas e negativas apresentavam a mesma virulência.

Prévost e colaboradores (1995a) encontraram menos de 5% de amostras de *S. aureus* PVL positivas em um hospital geral. Em outro estudo, a prevalência foi de apenas 0,9% dos genes *lukS-PV* e *lukF-PV* em *S. aureus* isolados de bacteriemias (VON EIFF *et al.*, 2004). Contudo, em infecções por ORSA de origem comunitária, essa prevalência pode ser de até 100% (DUFOUR *et al.*, 2002; VANDENESCH *et al.*, 2003). Lina e colaboradores (1999) verificaram que 93% das amostras isoladas de infecções cutâneas primárias eram positivas

para os genes *lukS-PV* e *lukF-PV*, enquanto em abscessos e celulites, os percentuais eram de 50% e 55%, respectivamente. Além disso, os autores verificaram que em pneumonias adquiridas na comunidade, 85% das amostras de *S. aureus* eram positivas para os genes da PVL.

Apesar da prevalência de amostras PVL positivas ser consideravelmente maior em infecções relacionadas a comunidade, um estudo realizado com 97 amostras ORSA isoladas entre 1979 e 1985 em hospitais japoneses encontrou 45,3% de amostras positivas para os genes *lukS-PV* e *lukF-PV*, supondo-se que essas amostras possam ser descendentes de amostras OSSA PVL positivas, o que é em parte confirmado pela observação de que 38% de amostras OSSA isoladas na década de 60 no mesmo país continham os genes da PVL (MA *et al.*, 2006).

Embora o verdadeiro papel da PVL em infecções ainda não esteja bem estabelecido, diversos trabalhos têm sido conduzidos de forma a se obter tratamentos mais eficazes nas infecções por amostras produtoras de PVL. Alguns antimicrobianos, como clindamicina e linezolida, já demonstraram a capacidade de inibir a liberação dessa toxina por células bacterianas quando utilizados em concentrações subinibitórias (DUMITRESCU *et al.*, 2007).

1.2.1.1.2 Alfa –Hemolisina

A alfa-hemolisina, também chamada de alfa-toxina, é a mais bem estudada das citotoxinas de *S. aureus*. O gene que a codifica, *hla*, está presente em até 95% das amostras de *S. aureus* (BHAKDI & TRANUM-JENSEN, 1991). O nome inicial, alfa-hemolisina, é decorrente da capacidade de lisar eritrócitos, apesar do alvo não ser restrito a estas células (MENESTRINA, SERRA & PRÉVOST, 2001). A alfa-hemolisina é secretada na forma de monômeros, porém é na forma de hexâmeros ou heptâmeros que ela é capaz de causar lise celular, ocasionando a formação de poros que permitem o influxo e efluxo de pequenas

moléculas e íons, resultando finalmente na morte de células eucarióticas e lise osmótica de eritrócitos (HILDEBRAND, POHL & BHAKDI, 1991; VALEVA, PALMER & BHAKDI, 1997). O influxo e efluxo de íons, principalmente cálcio, resulta em outros efeitos, tais como aumento do metabolismo do ácido araquidônico, e conseqüentemente maior síntese de prostaglandinas e tromboxano A₂, resultando em vasoconstrição, hipercoagulação, edema pulmonar, entre outros efeitos (BOHACH *et al.*, 1997).

Diversos tipos celulares são sensíveis aos efeitos da alfa-hemolisina, como macrófagos, mastócitos, células epiteliais e musculares. Foi sugerido ainda que a alfa-hemolisina possa estimular a produção de óxido nítrico por células endoteliais e promover a apoptose de linfócitos (BHAKDI & TRANUM-JENSEN, 1991). Outros efeitos relacionados a ação dessa toxina são a dermonecrose e a neurotoxicidade (BHAKDI & TRANUM-JENSEN, 1991; WALEV *et al.*, 1993; DINGES, ORWIN & SCHLIEVERT, 2000). A dermonecrose é resultado da alta afinidade da alfa-hemolisina por queratinócitos, o que poderia explicar o papel do *S. aureus* como importante agente de infecções de pele (WALEV *et al.*, 1993). Receptores específicos nas células alvo não foram totalmente identificados, no entanto a toxina tem a capacidade de se ligar também a moléculas freqüentemente encontradas nas membranas celulares, como fosfatidilcolina e colesterol (MENESTRINA, SERRA & PRÉVOST, 2001). O papel da alfa-hemolisina na patogênese de infecções por *S. aureus* já foi amplamente estudado em modelos animais, demonstrando sua ação como responsável por lesões cutâneas e de córnea (PATEL *et al.*, 1987; WALEV *et al.*, 1993; CALLEGAN *et al.*, 1994).

Embora grande parte das amostras de *S. aureus* contenha o gene *hla*, nem todas produzem a toxina. Um estudo realizado com clones epidêmicos de *S. aureus* resistentes à oxacilina demonstrou que todas as amostras analisadas eram fracas produtoras de alfa-hemolisina. Devido a considerável capacidade letal desta toxina, a sua expressão reduzida

pode estar associada a vantagens já adquiridas em termos de colonização e transmissibilidade, garantido a estes clones o potencial epidêmico (SABERSHEIKH & SAUDERS, 2004).

1.2.2 Resistência aos antimicrobianos

A era antibiótica foi iniciada em 1941, com a utilização da penicilina e, desde então, foi marcada por ciclos constituídos da introdução de novos antimicrobianos seguidos rapidamente do aparecimento de amostras resistentes (SWARTZ, 2000; ITO *et al.*, 2003). Cinco anos após a sua introdução, aproximadamente 50% das amostras de *S. aureus* já se apresentavam resistentes à penicilina atingindo taxas de até 95% de resistência (LIVERMORE, 2000; STREIT *et al.*, 2004).

Meticilina, oxacilina e nafcilina, penicilinas semi-sintéticas fracamente hidrolisadas pela penicilinase, foram desenvolvidas para o tratamento de infecções por *S. aureus* resistentes à penicilina, no final da década de 50 (ENRIGHT *et al.*, 2002). Um ano após a sua introdução, em 1960, a primeira amostra resistente foi descrita na Inglaterra (JEVONS, 1961 *apud* CRUM *et al.*, 2006). A resistência a classes de antimicrobianos não β -lactâmicos é comum entre amostras ORSA hospitalares, incluindo macrolídeos, clindamicina, aminoglicosídeos e sulfonamidas, diferente do que ocorre com as amostras sensíveis à oxacilina (OSSA, “oxacillin-sensible *Staphylococcus aureus*”) (SEAL *et al.*, 2003). Dados coletados do programa TSN (“The Surveillance Network USA”) demonstram que a ocorrência de resistência a outras classes de antimicrobianos é comum entre amostras ORSA, especialmente para ciprofloxacina, clindamicina e eritromicina (STYERS *et al.*, 2006). Um estudo conduzido em 2003, na China, envolvendo 50 amostras ORSA hospitalares demonstrou que 50% delas eram resistentes a pelo menos quatro classes diferentes de antimicrobianos (ZHANG *et al.*, 2003).

O perfil de multirresistência apresentado por amostras ORSA hospitalares tornou a vancomicina o fármaco de escolha para o tratamento de infecções por este microorganismo, resultando no uso acentuado desse antimicrobiano tendo em vista o grande aumento nas taxas de resistência à oxacilina (CASEY, LAMBERT & ELLIOT, 2007). A conjunção desses fatores resultou no cenário perfeito para o surgimento, primeiro, de amostras com resistência intermediária à vancomicina (HIRAMATSU *et al.*, 1997) e, logo depois, amostras plenamente resistentes (CDC, 2002a; CDC, 2002b).

O aumento nas taxas de resistência aos antimicrobianos acarreta diversos problemas clínicos e terapêuticos, sendo o principal deles o aumento nas taxas de morbidade e mortalidade. A crescente prevalência de bactérias multirresistentes resulta na utilização de agentes antibacterianos de uso reservado como agentes de primeira linha, que muitas vezes apresentam toxicidade elevada. Além disso, o tratamento de pacientes com infecções por amostras multirresistentes muitas vezes requer um tempo de hospitalização prolongado, acarretando um alto custo e maior exposição do paciente ao ambiente hospitalar (LIVERMORE, 2003).

1.2.2.1 Resistência à oxacilina/ meticilina

Amostras de *S. aureus* resistentes à oxacilina produzem uma proteína de ligação à penicilina (PBP) alterada, denominada PBP 2a ou PBP 2', de 78 kD, capaz de manter a atividade de transpeptidase, necessária a formação de ligações cruzadas na parede celular bacteriana, enquanto apresenta baixa afinidade pela penicilina e por outros antimicrobianos β -lactâmicos. Essa proteína é codificada pelo gene *mecA*, presente no cromossomo de amostras ORSA (CHAMBERS, 1993).

O gene *mecA* encontra-se inserido no cromossomo, dentro de um elemento genético móvel, o cassete estafilocócico cromossômico *mec* (SCC*mec*, “staphylococcal cassette

chromosome *mec*”; KATAYAMA, ITO & HIRAMATSU, 2000), que pode variar de 21 a 67 kb de DNA. O SCC*mec* é caracterizado pela presença de genes que codificam as recombinases, denominado complexo *ccr*, pela presença de terminais invertidos reconhecidos por estas recombinases, e pelo complexo do gene *mec*, que inclui o gene *mecA*, além dos genes *mecI* e *mecR1*, reguladores da transcrição deste gene. O SCC*mec* também apresenta uma região denominada região J (“junkyard”), que contém vários genes cuja presença parece não ser essencial para a célula. Pode conter ainda segmentos de DNA associados, como seqüências de inserção (IS431), transpósons (Tn554) e cópias de plasmídeos (pUB110 e pT181), codificando genes de resistência para outros antimicrobianos. Acredita-se que a seqüência de inserção IS431 seja um mecanismo de entrada para transpósons e plasmídeos carreando genes de resistência (ITO, KATAYAMA & HIRAMATSU, 1999; KATAYAMA, ITO & HIRAMATSU, 2000; HIRAMATSU *et al.*, 2001; ITO *et al.*, 2001; ITO *et al.*, 2003). Já foram descritas até o momento três classes de complexo do gene *mec*, A, B e C, e quatro tipos de complexo *ccr*, 1, 2, 3 e 5. Com base na classe do complexo dos genes *mec* e *ccr* presentes e em suas combinações, os cassetes SCC*mec* são classificados em seis tipos, I, II, III, IV, V e VI (ITO *et al.*, 2001; MA *et al.*, 2002; ITO *et al.*, 2004; OLIVEIRA, MILHEIRIÇO & DE LENCASTRE, 2006). Na Tabela 1 estão descritas as principais características dos seis cassetes *mec* conhecidos até o momento.

Tabela 1: Características dos diferentes tipos de cassete estafilocócico *mec*

Tipo	Complexo <i>mec</i>	Complexo de recombinação (<i>ccr</i>)	Tamanho (Kb)	Presença de elementos genéticos adicionais		
				IS431	Tn554	Plasmídeos
I	Classe B	<i>ccr1</i>	34	sim	não	não
II	Classe A	<i>ccr2</i>	53	sim	sim	sim
III	Classe A	<i>ccr3</i>	67	sim	sim	sim
IV	Classe B	<i>ccr2</i>	21 - 24	sim	não	não
V	Classe C	<i>ccr5</i>	28	sim	não	não
VI	Classe B	<i>ccr4</i>	Características semelhantes ao SCC <i>mec</i> tipo IV ^a			

(ITO *et al.*, 2001; MA *et al.*, 2002; ITO *et al.*, 2004; OLIVEIRA, ^a MILHEIRIÇO & DE LENCASTRE, 2006)

Os cassetes *mec* tipos I, II e III estão relacionados principalmente a amostras de origem hospitalar. O SCC*mec* tipo I era encontrado entre amostras ORSA na década de 1960, quando poucos antimicrobianos estavam disponíveis, e foi substituído na década de 80 pelos SCC*mec* tipos II e III, que se tornaram prevalentes. Esses dois últimos contêm múltiplos genes de resistência aos antimicrobianos, diferente do SCC*mec* tipo I, que contém apenas o complexo do gene *mec* (HIRAMATSU *et al.*, 2001; ITO *et al.*, 2001; ENRIGHT *et al.*, 2002).

As amostras ORSA de origem comunitária, em geral, apresentam os SCC*mec* tipo IV ou V, que por apresentarem menor tamanho, não possuem marcadores adicionais de resistência. Essas amostras são normalmente susceptíveis à maioria dos antimicrobianos não β -lactâmicos (MA *et al.*, 2002; ITO *et al.*, 2004). O SCC*mec* tipo IV é classificado ainda em subtipos, IVa, IVb e IVc, que refletem variações encontradas na região J (ITO *et al.*, 2003). Os subtipos IVa e IVb foram primeiramente descritos em amostras isoladas de infecções comunitárias em crianças, nos Estados Unidos (MA *et al.*, 2002). O subtipo IVc foi descrito inicialmente em uma amostra ORSA no Japão (ITO *et al.*, 2003). Um estudo envolvendo amostras comunitárias isoladas dos Estados Unidos e Austrália demonstrou que a grande maioria delas contém o subtipo IVa (OKUMA *et al.*, 2002). Já um outro estudo com 92 amostras ORSA

isoladas na Suécia encontrou 66% das amostras SCCmec IV como sendo do tipo IVc e 24% delas como sendo do tipo IVa (BERGLUND *et al.*, 2004). O cassette tipo V foi primeiramente descrito em amostras comunitárias, na Austrália (ITO *et al.*, 2004) e desde então tem sido identificado em amostras ORSA em Taiwan (BOYLE-VAVRA *et al.*, 2005) e na Europa (GEROGIANNI *et al.*, 2006), enquanto o SCCmec VI foi verificado em amostras ORSA isoladas de hospitais portugueses (OLIVEIRA, MILHEIRIÇO & DE LENCASTRE, 2006).

Na Figura 1 estão ilustrados, esquematicamente, as estruturas dos cassetes *mec* I, II, III e IV, os subtipos do SCCmec tipo IV, e o SCCmec tipo V.

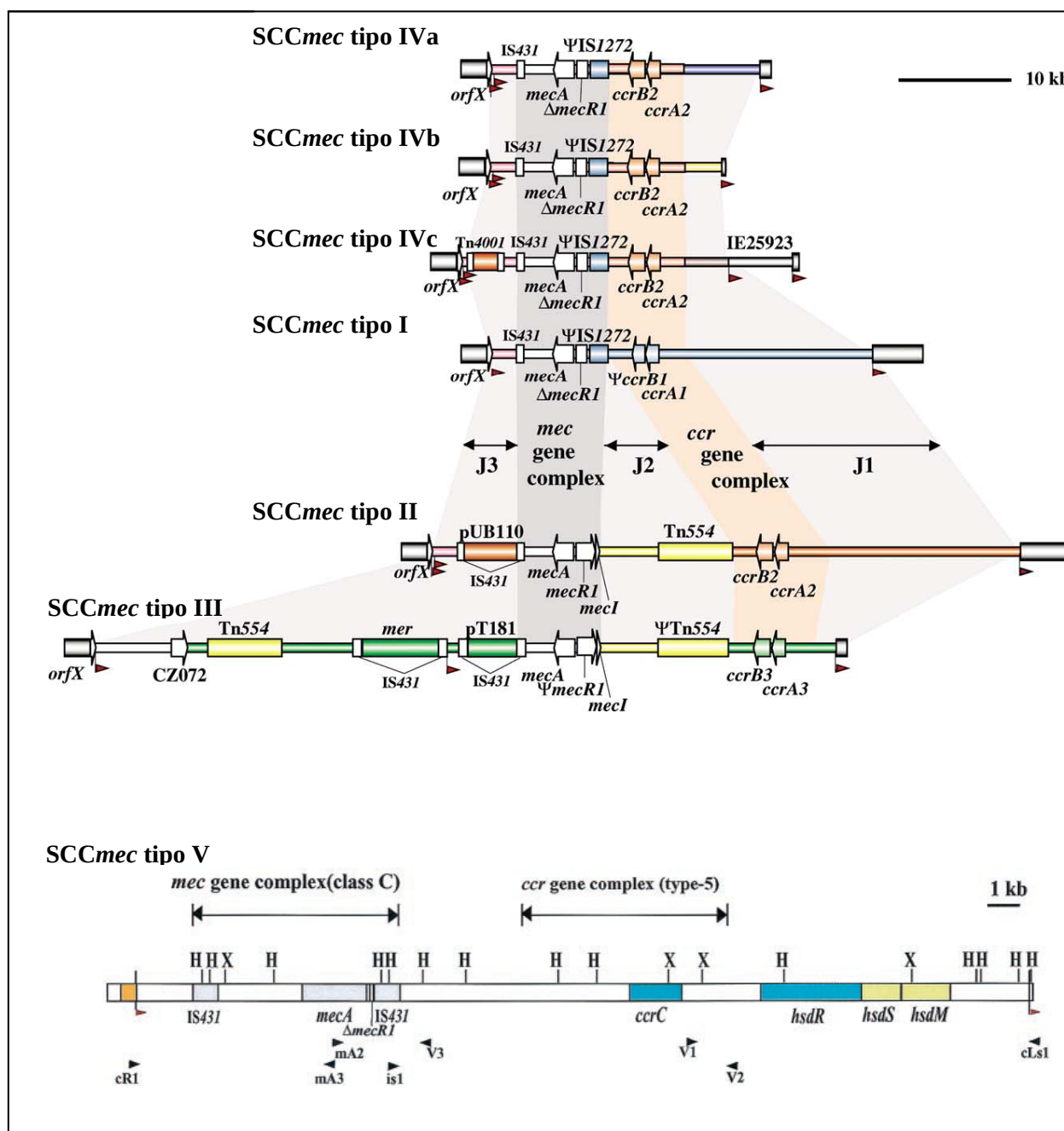


Figura 1: Estruturas dos cassetes estafilocócicos *mec* tipos I, II, III, IV (subtipos IVa, IVb e IVc) e V (ITO et al., 2003; ITO et al., 2004).

A origem do SCCmec ainda não é bem conhecida. Kreiswirth e colaboradores, em 1993, forneceram evidências para a evolução, por transmissão vertical, de um único clone OSSA (OSSA, “oxacillin susceptible *S. aureus*”). A presença, no entanto, de vários tipos SCCmec sugerem múltiplas recombinações no cromossomo de *S. aureus* (ENRIGHT et al., 2002).

Estruturas semelhantes já foram descritas em SCN, sugerindo a transferência horizontal entre diferentes espécies de *Staphylococcus* (ARCHER *et al.*, 1994). Outros estudos demonstram similaridade entre as sequências de aminoácidos das PBPs de *S. sciuri* e *S. aureus*, reafirmando a possibilidade de que o gene *mecA* possa ter se originado à partir dos SCN (WU *et al.*, 1996).

1.2.2.2 Resistência à vancomicina

O primeiro relato de resistência intermediária à vancomicina em amostras de *S. aureus* (VISA, “vancomycin intermediate *S. aureus*”) ocorreu no Japão (HIRAMATSU *et al.*, 1997), seguido de relatos nos Estados Unidos (CDC, 1997), e em diversos países europeus (BIERBAUM *et al.*, 1999; KANTZANOU *et al.*, 1999; MARCHESE *et al.*, 2000). No Brasil, o primeiro relato de amostras VISA foi realizado em São Paulo, por Oliveira e colaboradores, em 2001.

A resistência intermediária à vancomicina está associada a alterações na fisiologia celular de *S. aureus*. Um dos mecanismos descritos consiste no acúmulo de precursores da parede celular, resultando em uma camada de peptidoglicana de maior espessura, capaz de reter vancomicina, antes que a mesma atinja concentrações consideráveis no citoplasma (HIRAMATSU, 2001). Um trabalho realizado em nosso laboratório mostrou que a espessura da parede bacteriana em *Staphylococcus* com resistência a esta droga se apresenta significativamente maior do que as células sensíveis quando analisadas à microscopia eletrônica (NUNES *et al.*, 2006). A análise do genoma de amostras VISA apontou a presença de aproximadamente 100 genes envolvidos nesse processo (CUI *et al.*, 2005). Para que essas alterações ocorram, amostras VISA devem acumular múltiplas mutações, o que sugere que essas amostras foram selecionadas ao longo de muitos anos.

Em 2002, foram descritos os primeiros casos de infecções causadas por *S. aureus* plenamente resistentes à vancomicina nos Estados Unidos (VRSA “vancomycin resistant *Staphylococcus aureus*”) (CDC, 2002a; CDC, 2002b). A resistência plena à vancomicina ocorre de forma diferente do descrito para resistência intermediária. Amostras VRSA adquiriram resistência por receberem o gene *vanA* de *Enterococcus* resistentes à vancomicina (VRE, “vancomycin resistant *Enterococcus*”; CHANG *et al.*, 2003). Este gene dá origem a um precursor D-alanil D-lactato, com menor afinidade pela vancomicina, que dessa forma não consegue impedir a síntese da parede celular (ARTHUR & COURVALIN, 1993). A transferência do gene *vanA* de *Enterococcus* para *Staphylococcus* parece ocorrer de forma consideravelmente lenta, porém o uso exagerado de vancomicina poderia acelerar a seleção de amostras resistentes (COURVALIN, 2006).

Apesar de apenas duas amostras VRSA terem sido descritas até o momento, existe grande preocupação com relação ao tratamento de infecções por ORSA, não só pela possibilidade de desenvolvimento ou aquisição de resistência à vancomicina, mas também pelos recentes relatos de falha terapêutica relacionada a estas amostras, mesmo quando elas se apresentam *in vitro* como sensíveis a este antimicrobiano. Tais fenômenos parecem estar intimamente relacionados a CMI (CMI “concentração mínima inibitória”) observada para vancomicina (SAKOULAS *et al.*, 2004; MOISE *et al.*, 2007). Em um dos estudos, a análise de 30 amostras ORSA isoladas de bacteriemia apontaram correlação significativa entre a CMI para vancomicina e a eficácia clínica do tratamento (SAKOULAS *et al.*, 2004). Neste estudo, apenas 9,5% das amostras com CMI entre 1 e 2 µg/mL obtiveram sucesso terapêutico com vancomicina, enquanto desfecho semelhante foi encontrado em 55,6% das amostras com valores de CMI iguais ou inferiores a 0,5 µg/mL. Resultados semelhantes foram observados em outro estudo conduzido por MOISE e colaboradores, em 2007. Nesta análise, além da correlação significativa também encontrada entre a CMI para vancomicina e o desfecho

terapêutico, o tempo médio de erradicação da infecção foi significativamente maior para os pacientes infectados com amostras ORSA apresentando CMI de 2 µg/mL do que com amostras apresentando CMI menor ou igual a 1 µg/mL.

Apesar do desenvolvimento recente de novos antimicrobianos para serem utilizados infecções por Gram-positivos, como a linezolida, os glicopeptídeos permanecem como os antimicrobianos de escolha para infecções graves por ORSA. Neste cenário, a vancomicina representa a melhor opção devido ao seu baixo custo quando comparado a teicoplanina. Por esse motivo, a correlação entre a CMI para vancomicina e o desfecho negativo do tratamento é preocupante, especialmente porque esses valores encontram-se na faixa do que é considerado susceptível pelo CLSI (CLSI, “Clinical and Laboratory Standards Institute”, 2007).

1.2.3 Epidemiologia das infecções hospitalares por amostras ORSA

Logo após o primeiro relato de resistência à oxaciclina/meticilina em *S. aureus*, em 1961, amostras resistentes foram descritas em outras cidades européias e depois no Japão, Austrália e Estados Unidos (ENRIGHT *et al.*, 2002). Não demorou para as amostras ORSA se estabelecerem como um patógeno nosocomial de maior importância, com um impacto econômico significativo nos serviços de saúde (MALTEZOU & GIAMARELLOU, 2006). Um estudo conduzido em 1999, por Rubin e colaboradores demonstrou que o tratamento de uma infecção por ORSA acarreta um custo 6 a 10% maior do que tratar uma infecção por *S. aureus* sensível à oxacilina. Além disso, a taxa de mortalidade entre pacientes com bacteriemia por ORSA é cerca de 23% contra 1,3% entre aqueles com infecção por ORSA. Além disso, estes pacientes desenvolvem com maior frequência instabilidade hemodinâmica e insuficiência renal aguda (BLOT *et al.*, 2002).

No Brasil, *S. aureus* é o microorganismo mais isolado de infecções e a prevalência destas por amostras ORSA varia bastante nas instituições brasileiras, com taxas que vão de 31,8%, em bacteriemias, até 51,2%, em pneumonias (SADER *et al.*, 2004).

Dados do sistema NNIS, de 2004, revelaram um aumento de 11%, alcançando 59,5%, na prevalência de infecções por ORSA em unidades de terapia intensiva, em hospitais dos Estados Unidos, comparados com os valores obtidos nos anos de 1998 à 2002. Dados do programa SENTRY, que avalia infecções de origem nosocomial em sua grande maioria, exceto aquelas respiratórias de origem comunitária, revelam que a prevalência de amostras ORSA é cerca de 35% na América Latina, sendo as amostras isoladas de pneumonias as que apresentam as maiores taxas de resistência (DIEKEMA *et al.*, 2001). Dados do mesmo programa, obtidos em relação ao continente asiático, revelam taxas de resistência à oxacilina de até 74,5%, no Japão (BELL *et al.*, 2002). O continente europeu apresenta grande variação na prevalência de infecções por ORSA. Segundo dados obtidos do EARSS (“European Antimicrobial Resistance Surveillance System”), em 2005, alguns países permanecem com a prevalência extremamente baixa, como a Holanda, com 0,9% e Suécia, com 1%, e outros como Inglaterra e Romênia, com taxas de resistência mais elevadas (43,6% e 61,4%, respectivamente).

A aquisição de amostras ORSA no ambiente hospitalar está associada a diversos fatores de risco, que incluem, dentre outros, tempo prolongado de hospitalização, procedimentos invasivos de terapêutica e diagnóstico, e utilização prévia de antimicrobianos (SANTOS *et al.*, 1999). O tipo de unidade hospitalar em que o paciente permanece internando também oferece riscos adicionais, sendo as enfermarias de neonatos, unidades de terapia intensiva e de queimados as que oferecem o maior risco (BOYCE, 1997).

O estudo da epidemiologia de infecções por *S. aureus* teve grande avanço com a aplicação da técnica de análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico, após o

tratamento com enzimas de restrição e a separação das bandas por PFGE (“Pulsed Field Gel Electrophoresis”). Em 1995, foi proposta uma padronização da interpretação dos resultados obtidos pelo emprego da técnica, facilitando bastante a utilização da mesma em estudos epidemiológicos com amostras isoladas de uma mesma localidade, em períodos de tempo envolvendo um a três meses (TENOVER *et al.*, 1995). Assim, a técnica de PFGE passou a ser muito utilizada em amostras de *S. aureus* responsáveis por surtos hospitalares (CLANCY *et al.*, 2005; LARSEN *et al.*, 2007).

Apesar dos critérios adotados por Tenover e colaboradores (1995) para a interpretação dos resultados obtidos pela PFGE, esta técnica também passou a ser muito utilizada em estudos de epidemiologia global. Como resultado da combinação das técnicas de PFGE e da análise do polimorfismo dos padrões de inserção do gene *mecA* e do transpóson Tn554, após digestão do DNA cromossômico com a enzima *ClaI*, cinco clones principais ou linhagens clonais de ORSA foram descritos: Ibérico, Brasileiro, Húngaro, New York/Japão e Pediátrico, que refletem a região geográfica onde foram primeiramente isolados ou uma característica epidemiológica única (DOMINGUEZ *et al.*, 1994; TEIXEIRA *et al.*, 1995; ROBERTS *et al.*, 1998; SANCHES *et al.*, 1998; SÁ-LEAO *et al.*, 1999). Esses clones são conhecidos por sua habilidade em causar infecção, facilidade de transmissão, longa persistência e capacidade de disseminação por áreas geográficas diferentes, inclusive entre continentes (PAPAKYRIACOU *et al.*, 2000, PÉREZ-ROTH *et al.*, 2004). A razão para a existência de um mesmo clone de ORSA em áreas geográficas distantes pode ser a disseminação via indivíduos colonizados para países relacionados culturalmente e/ou economicamente (CHONGTRAKOOL *et al.*, 2006). Vários trabalhos observaram a disseminação de clones ORSA para outras localidades, distantes do seu local de origem (DE SOUZA *et al.*, 1998; MATO *et al.*, 1998; ROBERTS *et al.*, 1998; ROBERTS *et al.*, 2000; CRISOSTOMO *et al.*, 2001).

Em 2002, Enright e colaboradores associaram a técnica de MLST (“multilocus sequence typing”), que utiliza o seqüenciamento de regiões gênicas que codificam enzimas de manutenção celular, com a tipagem do SCC*mec*, determinando uma nova proposta de nomenclatura para os clones epidêmicos. As amostras foram classificadas de acordo com o ST (“sequence type”), o fenótipo de resistência e o tipo SCC*mec*. Avaliando uma coleção de amostras hospitalares e comunitárias por essa técnica, eles identificaram a presença de vários tipos SCC*mec* dentro de um mesmo ST, indicando múltiplas introduções, independentes, do gene *mec*, e a transferência horizontal deste gene, entre amostras de *S. aureus*.

Como a maioria das amostras ORSA de origem hospitalar são multirresistentes, a utilização de diversas classes de antibióticos pode exercer uma pressão seletiva que favoreça a disseminação destas amostras no ambiente hospitalar (BOYCE, 1997). Além do aumento contínuo na resistência aos antimicrobianos, a epidemiologia das infecções por ORSA está mudando devido à emergência de ORSA como um patógeno comunitário (ENRIGHT, 2003).

1.2.3.1 Epidemiologia das infecções comunitárias por amostras ORSA

Ao longo das últimas décadas, infecções por ORSA têm sido descritas também na comunidade. Inicialmente, infecções por amostras ORSA estavam associadas a fatores de risco, como utilização de drogas intravenosas, pacientes com doenças crônicas e contato freqüente com serviços de saúde, hospitalização recente e utilização prévia de antimicrobianos (MALTEZOU & GIAMARELLOU, 2006). A partir de 1990, infecções por ORSA foram descritas na população, em pacientes sem fatores de risco associados (HEROLD *et al.*, 1998; MORAN *et al.*, 2005; CDC, 2006). Infecções comunitárias por ORSA foram descritas em indivíduos pertencentes a grupos específicos, como prisões, creches e esportes coletivos (CDC, 2003; KAZAKOVA *et al.*, 2005).

Amostras ORSA de origem comunitária (CA-ORSA, “community acquired ORSA”) em geral são responsáveis por infecções de pele e tecidos moles, como furúnculos, abscesso, foliculites, impetigo e celulites, embora infecções invasivas e pneumonias hemorrágicas, inclusive letais, tenham sido descritas (GILLET *et al.*, 2002; FRANCIS *et al.*, 2005; WANNET *et al.*, 2005; MARTIN, STRANAHAN & RIVERO, 2006). Essas infecções acometem freqüentemente jovens e crianças, ao contrário das amostras de origem hospitalar, cujos principais envolvidos são pacientes idosos (JOHNSON & SARAVOLATZ, 2005). Em 2003, Naimi e colaboradores, demonstraram que a idade média dos pacientes envolvidos em infecções por ORSA hospitalares foi de 68 anos, contra 23 anos, a idade média dos pacientes envolvidos em infecções comunitárias. Fatores de risco clássicos não são observados entre pacientes com infecção por amostras CA-ORSA (RYBAK & LAPLANTE, 2005). Contudo, um estudo recente demonstrou que 85% dos pacientes com infecções devido à CA-ORSA tinha pelo menos um fator de risco associado, demonstrando que a prevalência de infecção por ORSA em indivíduos sem fatores de risco permanece baixa (SALGADO, FARR & CALFEE, 2003). Outro trabalho conduzido em pacientes pediátricos, na Inglaterra, demonstrou que 35% das amostras CA-ORSA analisadas estavam relacionadas a fatores de risco (DIETRICH, AULD & MERMEL, 2004).

Geralmente, as amostras CA-ORSA são resistentes a todos os antimicrobianos β -lactâmicos permanecendo susceptíveis à clindamicina, sulfametoxazol/trimetoprima, quinolonas, rifampicina e linezolida (DERESINSKI, 2005). Esse perfil de susceptibilidade é devido à presença dos SCC*mec* tipo IV ou V, que não contém marcadores adicionais de resistência além do gene *mecA*. Porém, o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das amostras tipos IV e V pode ser rapidamente alterado, tornando-as multirresistentes (KILIC *et al.*, 2006). De fato, infecções por amostras CA-ORSA multirresistentes já foram descritas em

algumas localidades, como Estados Unidos (PAN *et al.*, 2003) e Taiwan (BOYLE-VAVRA *et al.*, 2005).

A correta diferenciação de amostras CA-ORSA de HA-ORSA (“hospital acquired ORSA”) é complexa. Salgado, Farr & Calfee (2003) sugeriram o uso do termo CO-ORSA (“community onset ORSA”), que expressa a localização do paciente no momento da detecção da infecção, em lugar de CA-ORSA, que sugere que o local de aquisição da infecção é conhecido. Contudo, o CDC (“Centers for Disease Control and Prevention”) define critérios para classificação de amostras CA-ORSA, que incluem: diagnóstico realizado em até 48 horas após a internação, não possuir histórico de colonização ou infecção por ORSA, hospitalização ou utilização de sistema “home-care”, não ter sido submetido a diálise e/ou procedimentos cirúrgicos e não possuir cateter ou outro dispositivo médico que atravesse a pele (CDC, 2005).

A origem das amostras CA-ORSA ainda é incerta. Uma possibilidade é de que elas sejam descendentes de amostras hospitalares. No entanto, as amostras hospitalares e comunitárias apresentam características genéticas distintas (OKUMA *et al.*, 2002; COOMBS *et al.*, 2004; CRUM *et al.*, 2006). Outra possibilidade é que as amostras comunitárias tenham se originado da transferência horizontal do gene *mecA* para uma amostra ORSA (CHAMBERS, 2001). Como a taxa de colonização por *S. aureus* é considerável, mesmo em indivíduos saudáveis, permanece a dúvida se a comunidade é um reservatório de ORSA (SCUDELLER *et al.*, 2000). Alguns estudos demonstram que, embora a taxa de colonização por ORSA seja baixa em indivíduos saudáveis (SALGADO, FARR & CALFEE, 2003) essa pode ser consideravelmente maior em indivíduos com fatores de risco associados (PAN *et al.*, 2005).

A epidemiologia das infecções por amostras ORSA tem mudado devido aos recentes relatos de infecções hospitalares por amostras ORSA tipo IV não multirresistentes, inclusive no Brasil (SAISMAN *et al.*, 2003; TRINDADE *et al.*, 2005; SEYBOLD *et al.*, 2006;

GONZALEZ *et al.*, 2006; VIVONI *et al.*, 2006; DE MIRANDA *et al.*, 2007). Uma vez introduzidas nos hospitais, as amostras ORSA SCCmec tipo IV podem apresentar algumas vantagens em relação às amostras pertencentes aos clones de ORSA tipicamente hospitalares, incluindo maior taxa de crescimento e presença de fatores de virulência adicionais, em especial a PVL (BABA *et al.*, 2002; DE MIRANDA *et al.*, 2007). Kim e colaboradores (2006), verificaram que os genes da PVL estavam presentes em 93,6% das amostras SCCmec tipo IV, enquanto nas amostras SCCmec tipo II hospitalares a prevalência foi de apenas 0,2%.

A ocorrência contínua de transferência de amostras ORSA do ambiente hospitalar para a comunidade e da comunidade para os hospitais dificulta o reconhecimento da origem destas amostras, assim como a classificação destas infecções. A análise por PFGE de 116 amostras ORSA isoladas de bacteriemias de pacientes em um hospital na Geórgia, em 2004, mostrou que mais de um terço delas pertenciam ao clone USA300 (SCCmec tipo IV), anteriormente descrito como agente apenas de infecções comunitárias (SEYBOLD *et al.*, 2006). No Brasil, Trindade e colaboradores (2005), analisando 151 amostras obtidas também de bacteriemias, isoladas em um período de sete meses, em um hospital em São Paulo, encontraram 20 (13%) amostras susceptíveis a quatro ou mais antimicrobianos, sendo o SCCmec tipo IV detectado em 95% delas. Ao contrário do descrito para amostras desse tipo, nenhuma foi classificada como sendo de origem comunitária. Vivoni e colaboradores (2006) verificaram a prevalência dos tipos de SCCmec em 34 amostras ORSA isoladas de um hospital universitário, entre 1999 e 2000, no Rio de Janeiro e demonstraram que 88% delas continham o SCCmec tipo III, característico do clone brasileiro e apenas 2 amostras (6%) continham o SCCmec tipo IV. De Miranda e colaboradores (2007), analisando 43 amostras ORSA isoladas de hospitais em Recife, nos anos de 2002 e 2003, observou que, embora 70% delas fosse pertencente ao clone prevalente no Brasil, 14% das amostras eram relacionadas ao clone USA800 (SCCmec IV ou VI), também conhecido como clone pediátrico. Nesse mesmo estudo, os autores avaliaram 38

amostras isoladas em hospitais do Rio de Janeiro, em 2005 e verificaram que 5,3% das amostras eram SCCmec IV e estavam relacionadas ao clone pediátrico. Outro estudo, descrito por Ribeiro e colaboradores (2007), analisando amostras ORSA isoladas entre 2004 e 2006, no Rio de Janeiro e Porto Alegre, também mostrou a presença de duas amostras isoladas de infecções nosocomiais, no Rio de Janeiro, SCCmec tipo IV, com perfil semelhante ao do clone USA400, também associado, inicialmente, a infecções comunitárias severas e inclusive fatais nos Estados Unidos (MCDOUGAL *et al.*, 2003).

Apesar dos recentes relatos de amostras SCCmec IV em diversas regiões do Brasil, existem poucos estudos envolvendo amostras isoladas de hospitais na cidade do Rio de Janeiro que mostrem a prevalência dos tipos SCCmec e de perfis genotípicos. Além disso, nenhum estudo até então mostrou um paralelo entre características apresentadas por amostras ORSA isoladas de um hospital público e um hospital privado, o que pode refletir o tipo de paciente atendido em cada uma destas instituições, assim como o tipo de atendimento dispensado. Desta forma, torna-se fundamental um estudo que apresente as características fenotípicas e moleculares de amostras ORSA isoladas de hospitais na cidade do Rio de Janeiro, permitindo uma análise da prevalência dos diferentes tipos de SCCmec e da presença de genótipos característicos nestas instituições.

2 OBJETIVOS

O objetivo geral desse trabalho foi verificar a prevalência dos tipos de cassete *mec* (SCC*mec*) em amostras de *S. aureus* resistentes à oxacilina (ORSA) isoladas de dois hospitais na cidade do Rio de Janeiro, um público e um privado, e correlacionar com a resistência aos antimicrobianos, virulência e genótipos.

Objetivos Específicos:

1. Determinar o perfil de susceptibilidade de amostras ORSA frente a antimicrobianos através da técnica de difusão à partir do disco.
2. Verificar as concentrações mínimas inibitórias para oxacilina e vancomicina pelo método de diluição em ágar.
3. Analisar as amostras quanto ao tipo de SCC*mec* através de PCR.
4. Verificar a presença dos genes que codificam os fatores de virulência leucocidina de Pantón Valentine (genes *lukS-PV* e *lukF-PV*) e α -hemolisina (gene *hla*) através de PCR.
5. Determinar a diversidade clonal entre as amostras através da técnica de PFGE.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Desenho do estudo

Foi realizada uma análise de casos de infecção e colonização causados por amostras de *S. aureus* resistentes a oxacilina (ORSA), isoladas de dois hospitais gerais da cidade do Rio de Janeiro, o Hospital Naval Marcílio Dias (HNMD) e Hospital Copa D'or (HCD). O HNMD é uma instituição militar, terciária, que possui 532 leitos, sendo 35 deles de unidades de terapia intensiva, enquanto o HCD é uma instituição particular, terciária, com 188 leitos, sendo 47 destes de unidades de terapia intensiva. Foram analisadas amostras ORSA, isoladas consecutivamente no período de junho de 2004 a outubro de 2005 no HNMD e no período de outubro de 2006 a agosto de 2007 no HCD. Para os casos de múltiplas amostras isoladas de um mesmo paciente, apenas uma delas foi selecionada, caso todas apresentassem as mesmas características fenotípicas e genotípicas (tipo de SCCmec) de resistência.

3.1.1 Amostras bacterianas

Todas as amostras utilizadas neste estudo foram identificadas previamente nos hospitais de origem, através do sistema automatizado MicroScan WalkAway (Dade Behring Inc, West Sacramento, CA, EUA) e Vitek (Vitek Systems Inc., Hazelwood, MO, EUA) e mantidas em caldo TSB ("Trypticase Soy Broth", Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) com 20% (v/v) de glicerol, a – 20°C (SAMBROOK, FRITSCH & MANIATIS, 1989). Como controles dos testes realizados no presente estudo, foram utilizadas as diferentes amostras bacterianas citadas na Tabela 2.

Tabela 2 – Características das amostras controle utilizadas no presente estudo

Espécie	Característica	Número	Referência
<i>Staphylococcus aureus</i>	Amostra tipo	12600	ATCC
	Padrão para antibiograma (CLSI)	25923	ATCC
	Padrão para análise de CMI (CLSI)	29213	ATCC
	Amostra gene <i>mecA</i> +	33591	ATCC
	Amostra VISA SCC <i>mec</i> II	700699	ATCC(Mu50)
	Amostra clínica SCC <i>mec</i> IV	522a	Vivoni <i>et al.</i> , 2006
	Amostra clínica SCC <i>mec</i> III	63a	Vivoni <i>et al.</i> , 2006
	Amostra clínica PVL+	523a	Vivoni <i>et al.</i> , 2006
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Amostra tipo	14990	ATCC
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Amostra tipo	29970	ATCC
<i>Staphylococcus intermedius</i>	Amostra tipo	29663	ATCC
<i>Enterococcus faecalis</i>	Amostra padrão	29212	ATCC
<i>Escherichia coli</i>	Amostra padrão	11229	ATCC
<i>Micrococcus luteus</i>	Amostra padrão	10240	ATCC

ATCC – “American Type Culture Collection”; CLSI- “Clinical Laboratory Standard Institute”; CMI – Concentração Mínima Inibitória; VISA – “Vancomycin Resistant *Staphylococcus aureus*”; SCC*mec* – “Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*”; PVL – “Panton-Valentine Leukocidin”

3.1.2. Aspectos clínicos e éticos

O estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética e Pesquisa do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (pelo HNMD) e HCD, sob os números 159/07 e 088/07, respectivamente (ANEXOS 1 e 2).

Com relação aos aspectos clínicos, foram utilizados dados referentes aos locais de internação e sítios de isolamento, além de dados coletados em prontuários para classificação das infecções como hospitalares ou comunitárias. Nenhuma intervenção foi efetuada no acompanhamento dos casos a não ser aquelas rotineiramente realizadas pelos profissionais de saúde das referidas instituições. O estudo envolveu apenas a utilização de

amostras ORSA analisadas na rotina bacteriológica de cada hospital, não havendo nenhum contato com o paciente.

3.1.3 Análise estatística

A análise estatística foi realizada através do teste do Qui-quadrado. Para os resultados serem considerados estatisticamente significativos foi utilizado o valor de $p \leq 0,05$.

3.2. Identificação do gênero *Staphylococcus*

Todas as amostras do estudo foram avaliadas para confirmação do gênero e espécie *S. aureus*. Os testes para a caracterização do gênero *Staphylococcus* foram realizados de acordo com as metodologias descritas por Mac Faddin (1977) e Bannerman & Peacock (2007).

3.2.1 Determinação do aspecto morfo-tintorial

O aspecto morfo-tintorial foi analisado através da coloração de Gram. A leitura foi realizada observando-se a coloração, a morfologia e o arranjo das células bacterianas. A amostra de *S. aureus* ATCC 12600 foi utilizada como controle Gram-positivo, enquanto *E. coli* ATCC 11229 como Gram-negativo.

3.2.2 Produção da enzima catalase

A produção da enzima catalase foi verificada em lâmina, transferindo-se uma colônia bacteriana, crescida em TSA (“Trypticase Soy Agar”, Oxoid; Basingstoke, Inglaterra), com o auxílio de uma agulha bacteriológica para a superfície de uma lâmina e posteriormente, adicionando-se sobre esta uma gota de peróxido de hidrogênio (Proquimios, Rio de Janeiro, Brasil) a 3%. A formação de bolhas foi indicativa de reação positiva. As amostras

S. epidermidis ATCC 14990 e *E. faecalis* ATCC 29212 foram utilizadas como controles positivo e negativo, respectivamente.

3.2.3 Susceptibilidade à bacitracina

Uma suspensão bacteriana, com uma turbidez equivalente a 0,5 da escala McFarland ($\sim 10^8$ UFC/mL) foi preparada em solução salina a 0,85% e semeada, confluentemente, com auxílio de um “swab”, em ágar Müeller-Hinton (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, EUA). Posteriormente, foi depositado sobre o meio um disco impregnado de bacitracina 0,04U (Cecon, São Paulo, Brasil), e a placa foi incubada por 24h, a 35°C. Um halo menor ou igual a 10mm foi indicativo de resistência à bacitracina (BANNERMAN & PEACOCK, 2007). As amostras utilizadas no controle do teste foram *S. aureus* ATCC 12600 (resistente) e *Micrococcus luteus* ATCC 10240 (sensível).

3.3. Confirmação da identificação da espécie de *S. aureus* através de testes fenotípicos

A confirmação da espécie *S. aureus* foi realizada utilizando-se os testes descritos a seguir, de acordo com MacFaddin (1977) e Bannerman & Peacock (2007).

3.3.1 Produção de hemólise

A verificação da produção de hemólise foi realizada por inspeção visual da cultura crescidas em ágar [“Blood Agar Base” (Oxoid)] adicionado com 5% de sangue desfibrinado de carneiro, em 24, 48 e 72h de incubação, a 35°C. O aparecimento de zona de hemólise intensa ao redor das colônias, em até 72h de incubação, foi indicativo da presença de hemólise, enquanto zona de hemólise fraca (1mm) ou ausente em até 72h de incubação foi indicativa de hemólise ausente. A amostra *S. aureus* ATCC 12600 foi

utilizada como controle de hemólise positiva e *S. epidermidis* ATCC 14990 como controle negativo nesse teste.

3.3.2 Produção do fator “clumping”

A produção do fator “clumping” foi verificada utilizando-se o sistema comercial “Slidex Staph Plus” (bioMérieux, Marcy, l’Etoile, França) e a leitura realizada de acordo com instruções do fabricante. As amostras *S. aureus* ATCC 12600 e *S. epidermidis* ATCC 14990 foram utilizadas como controles positivo e negativo do teste, respectivamente.

3.3.3 Produção da enzima coagulase livre

A verificação da produção da enzima coagulase foi realizada utilizando-se o sistema comercial coagu-plasma (Laborclin, LTDA,Paraná, Brasil) de acordo com as instruções do fabricante. A amostra utilizada como controle positivo foi *S. aureus* ATCC 12600, enquanto a amostra de *S. epidermidis* ATCC 14990 foi utilizada como controle negativo no teste.

3.3.4 Produção de acetoina

A produção de acetoina a partir da glicose foi verificada após transferência de uma colônia para 2,5 mL de meio Clark & Lubs, confeccionado de acordo com MacFaddin (1977), e posteriormente incubado a 35°C. Após 48h de incubação foram adicionadas soluções reveladoras de α -naftol (AnalaR, BDH, Inglaterra) a 5% (0,6 mL) e KOH (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) a 40% (0,2 mL). O aparecimento de coloração rosa até 15 min, sob leve agitação, foi observado para amostras positivas. A não alteração na coloração do meio foi indicativo de resultado negativo. As amostras *S. aureus* ATCC 12600 e *S. intermedius* ATCC 29663 foram utilizadas como controles positivo e negativo, respectivamente.

3.4. Avaliação da susceptibilidade aos antimicrobianos

3.4.1 Teste de difusão a partir do disco (Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI, 2003a)

Uma suspensão bacteriana, com uma turbidez equivalente a 0,5 da escala McFarland ($\sim 10^8$ UFC/mL) foi preparada em salina a 0,85%, a partir de uma cultura crescida em ágar sangue, e semeada, confluentemente, com auxílio de um “swab” em ágar Müeller-Hinton (Difco). Os antimicrobianos testados e suas respectivas concentrações foram os seguintes: cefoxitina (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), clindamicina (2 µg), cloranfenicol (30 µg), gentamicina (10 µg), linezolida (30 µg), mupirocina (5 µg), oxacilina (1µg), penicilina (10 UI), rifampicina (5 µg), sulfametoxazol/trimetoprima (25 µg), teicoplanina (30 µg), tetraciclina (30 µg) e vancomicina (30 µg). Todos os antimicrobianos foram obtidos da Cecon (São Paulo, Brasil), exceto linezolida e mupirocina, obtidos da Oxoid.

Os discos de antimicrobianos foram depositados sobre o meio e a leitura dos halos de inibição realizada após 18h de incubação, a 35°C, exceto para os discos de oxacilina, vancomicina e teicoplanina, cuja leitura foi realizada em 24h. A interpretação foi realizada conforme o CLSI (2007). A amostra padrão *S. aureus* ATCC 25923 foi utilizada como controle do teste.

3.4.2 Teste fenotípico para detecção de resistência induzida à clindamicina por eritromicina (CLSI, 2007) – (Teste D)

Durante a realização do teste de difusão a partir do disco (item 4.1) foram posicionados discos de clindamicina (2 µg) e eritromicina (15 µg) a uma distância de 20 mm (entre as bordas internas). A presença de um halo de inibição achatado em torno do

disco de clindamicina (descrito como zona “D”) foi indicativa de resistência induzida por macrolídeos.

3.4.3 Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) para oxacilina e vancomicina (CLSI, 2003b)

A determinação das CMIs para oxacilina e vancomicina (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA) foi realizada pelo método de diluição em ágar. Inicialmente, foi preparada uma turvação bacteriana equivalente à escala 0,5 de McFarland, conforme citado no item 4.1. Posteriormente, esta suspensão foi diluída 1:10 (v/v) em salina, de forma a se obter aproximadamente 10^7 UFCs/mL. Cerca de 10^4 UFC foi inoculada, com auxílio do replicador de “Steers”, nas placas contendo ágar Mueller-Hinton (Difco) e concentrações crescentes do antimicrobiano. No caso da oxacilina, a concentração variou de 0,25 a 256 $\mu\text{g/mL}$ e, para vancomicina, de 0,25 a 32 $\mu\text{g/mL}$. Posteriormente, as placas foram incubadas por 24h, a 35°C. A leitura do teste foi realizada de acordo com os valores do CLSI (2007). Ao meio de oxacilina foi adicionado 2% de NaCl (Reagen, Rio de Janeiro, Brasil). Foi utilizada a amostra *S. aureus* ATCC 29213 como controle sensível e a amostra *S. aureus* ATCC 33591 como controle resistente à oxacilina.

3.5. Métodos Moleculares

3.5.1 Liberação de DNA através de lise térmica

A liberação do DNA bacteriano foi realizada de acordo com Nunes e colaboradores (1999), com modificações. Cinco colônias crescidas em ágar sangue foram transferidas para 100 μL de tampão TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,8). Esta suspensão foi

mantida a temperatura de ebulição, por 10 min e, em seguida, centrifugada por 30 seg (9000xg, a 4°C). O sobrenadante contendo o DNA bacteriano foi coletado e usado na reação de PCR.

3.5.2 Liberação do DNA através da guanidina

A liberação do DNA através da guanidina foi realizada de acordo com Pitcher, Saunders & Owen (1989). Cinco colônias isoladas crescidas em ágar sangue por 24 h foram inoculadas em 3 mL de caldo TSB (Oxoid) e incubadas por 18h, a 35°C. A seguir, 1 mL desta suspensão foi centrifugada (5 min, 8000 xg) e o sedimento ressuspense em 1,5 mL de tampão TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,8). A suspensão foi novamente centrifugada (5min, 8000 xg) e ao precipitado foram adicionados 100 µL de solução de lise (1 mL de tampão TE, 50 mg de lisozima [Sigma], 50 µL de BRIJ 0,5% [Sigma]). A esta solução foram adicionados 5 µL de lisostafina (1mg/mL) comercial (Sigma) e após agitação, esta solução foi incubada por 1h, a 37°C, em banho maria. Após esse período, as amostras foram lisadas utilizando uma solução contendo 500 µL de isotiocianato de guanidina (Gibco BRL – Life Technologies) a 5 M (Isotiocianato de guanidina, 60 g; EDTA 0,5 M pH 8; N-lauril sarcosina 10%, 5 mL; Água, 20 mL). As suspensões celulares foram agitadas, manualmente, e então incubadas a temperatura ambiente por 5 a 10 minutos. Posteriormente os lisados foram resfriados no gelo, por 10 min, e a seguir foram adicionados 250 µL de acetato de amônio (Vetec) a 7,5 M, preparado em água, agitando-se manualmente os tubos e em seguida incubando-se por 10min no gelo. Após esse período uma solução de 500 µL composta de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1 v/v – Vetec) foi adicionada e a mistura agitada. Posteriormente, esta mistura foi centrifugada por 10 min, a 13000 xg. A fase aquosa foi então transferida para um novo tubo onde foi adicionado 430 µL isopropanolol (Vetec). Os tubos foram então invertidos por 1 min para misturar as

soluções. Após centrifugação a 7000 xg por 20 seg o DNA precipitado foi lavado cinco vezes com etanol (Vetec) a 70% e centrifugado. Por fim, o DNA foi ressuspensão em 50 µL de tampão TE, incubado “overnight” em banho Maria, a 37°C e então estocado a 4 °C.

3.5.3 PCR multiplex para detecção dos genes que codificam a leucocidina de Pantone Valentine (*lukS-PV* e *lukF-PV*) e a α -hemolisina (*hla*)

Para detectar os genes que codificam a leucocidina de Pantone Valentine e a α -hemolisina, foi realizado um PCR multiplex utilizando os oligonucleotídeos descritos na Tabela 3. Os oligonucleotídeos *hla*-1 e *hla*-2 foram desenhados, utilizando-se as ferramentas BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST), ClustalX e OligoAnalyzer. O par de oligonucleotídeos foi desenhado para uma sequência gênica específica do gene *hla*, de 208 pb. O ciclo e os produtos gerados pela reação de PCR também se encontram presentes nesta tabela.

Tabela 3: Oligonucleotídeos utilizados, amplicons obtidos e ciclo empregado na PCR para detecção dos genes *lukS-PV* e *lukF-PV* e *hla*

Oligonucleotídeos	Genes	Amplicon	Ciclo	Referência
Luk-PV 1 5'-ATCATTAGGTAAAATGTCTGGACATGATCCA3'	lukS-PV	433pb	94°C – 2min 94°C – 1 min 55°C – 1min 72°C – 1min 72°C – 5min	Lina et al., 1999
Luk-PV 2 5'-GCATCAASTGTATTGGATAGCAAAAGC3'				
hla-1 5'-AATCCTGTCGCTAATGCC3'	hla	208pb		Este estudo
hla-2 5'-CAGCAATGGTACCTTTTCG3'				

A amplificação dos fragmentos codificados pelos genes acima descritos foi realizada em um termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradient, Hamburgo, Alemanha),

utilizando-se um volume total de 50µL para a reação, constituída de 3µL de DNA, 5µL de tampão da enzima (10mM Tris HCl, 25mM KCl), 2mM de MgCl₂, 200µM de cada deoxinucleotídeo trifosfatado (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) (Life Technologies Inc., Gathersburg, MD, EUA), 1,5U de Taq DNA polimerase (Biotools, Madrid, Espanha), 25pmoles dos oligonucleotídeos luk-PV1 e luk-PV2 e 50 pmoles dos primers hla-1 e hla-2. Como controles PVL + foi utilizada a amostra clínica 523, e como controle hla negativo foi utilizada a amostra *S. epidermidis* ATCC 14990.

O produto da reação foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, em TBE (0,89 M Tris, 0,89M ácido bórico, 2,5 mM EDTA, pH 8,2). Após corrida de 1:30 h a 90V, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (0,5µg/mL) e fotografado sob luz ultravioleta. Como padrão de DNA foi utilizado o marcador 100 pb DNA ladder (Life Technologies).

3.5.4 PCR multiplex para tipagem do SCCmec

A determinação do tipo de SCCmec foi realizada conforme descrito por Oliveira e De Lencastre (2002). O resultado desse PCR consiste na amplificação de fragmentos de regiões específicas de cada tipo SCCmec. Como controle interno da reação foi utilizado o par de oligonucleotídeos MRS1 e MRS2, responsável pela amplificação do gene *mecA* (SANTOS *et al.*, 1999).

Na Tabela 4 estão descritas as seqüências dos oligonucleotídeos utilizados, o tamanho dos amplicons e a especificidade para cada tipo de SCCmec.

Tabela 4 – Oligonucleotídeos utilizados e amplicons obtidos na PCR para tipagem do SCCmec

Oligonucleotídeo	Seqüência (5'-3')	Amplicon (pb)	Especificidade (tipo de SCCmec)
CIF2 F2	TTCGAGTTGCTGATGAAGAAGG	495	I
CIF2 R2	ATTTACCACAAGGACTACCAGC		
KDP F1	AATCATCTGCCATTGGTGATGC	284	II
KDP R1	CGAATGAAGTGAAAGAAAGTGG		
MECI P2	ATCAAGACTTGCATTTCAGGC	209	II, III
MECIP3	GCGGTTTCAATTCACTTGTC		
DCS F2	CATCCTATGATAGCTTGGTC	342	I, II, IV
DCS R1	CTAAATCATAGCCATGACCG		
RIF4F3	GTGATTGTTTCGAGATATGTGG	243	III
RIF4R9	CGCTTTATCTGTATCTATCGC		
RIF5 F10	TTCTTAAGTACACGCTGAATCG	414	III
RIF5 R13	GTCACAGTAATTCCATCAATGC		
IS431 P4	CAGGTCTCTTCAGATCTACG	381	IA
pUB110 R1	GAGCCATAAACACCAATAGCC		
IS431 P4	CAGGTCTCTTCAGATCTACG	303	IIIA
pT181 R1	GAAGAATGGGGAAAGCTTCAC		
MRS1	TAGAAATGACTGAACGTCCG	154	Controle interno da reação
MRS2	TTGCGATCAATGTTACCGTAG		

A amplificação dos fragmentos foi realizada em um termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradient, Hamburgo, Alemanha), utilizando-se um volume total de 50 µl composto de: 5 µl de DNA, 5µL de tampão da enzima (10mM de Tris-HCl e 25 mM de KCl), 6 mM de MgCl₂, 400µM de cada deoxinucleotídeo trifosfatado (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) (LifeTechnologies, Parsley, Scotland), 1,5 U de Taq DNA polimerase (Biotools,

Madrid, Spain), 20 pmoles dos oligonucleotídeos CIF2 F2, CIF2R2, MECI P2 e MECI P3, 25 pmoles dos oligonucleotídeos RIF5 F10, RIF5 R13, pUB110 R1 e pT181 R1, 40 pmoles dos oligonucleotídeos DCS F2, DCS R1, IS431 P4, MRS1 e MRS2 e 10 pmoles dos oligonucleotídeos KDP F1, KDP R1, RIF4 F3 e RIF4 R9.

A reação do PCR consistiu em desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos, seguida de 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C e 1 minuto a 72°C, finalizada com um ciclo de extensão final a 72°C, por 4 minutos.

O produto da reação foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 2,5%, em TBE (0,89 M Tris, 0,89M ácido bórico, 2,5 mM EDTA, pH 8,2). Após corrida de 1:30 h a 90V, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (0,5µg/mL) e fotografado sob luz ultravioleta. Como padrão de DNA foi utilizado o marcador 100 pb DNA ladder (Life Technologies).

3.5.5 Análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico por eletroforese em gel de campo pulso ("Pulsed Field Gel Electrophoresis", PFGE)

A análise do perfil de fragmentação do DNA cromossômico foi realizada após separação, por PFGE, dos fragmentos gerados por tratamento com a enzima de restrição *Sma*I. Foi utilizada a técnica descrita por Nunes e colaboradores, 2005, com modificações. Cinco colônias isoladas crescidas em ágar sangue por 24 h foram inoculadas em 5ml de caldo TSB (Oxoid) e incubadas durante 4h, a 35°C. A turvação foi ajustada a uma turbidez equivalente a escala 2 (6×10^8 UFC/mL) de McFarland, com solução salina estéril. A seguir, 1ml desta suspensão foi centrifugado (5min a 700 xg) e o sedimento ressuspenso em 250µl de tampão PIV (NaCl 1M, Tris-HCl 10mM, pH 7,6). A esta suspensão foi adicionado o mesmo volume de agarose de baixo ponto de fusão ("Low Melting Point Agarose", IBI Technical, New Haven, EUA) a 1,8%, dissolvida em tampão PIV e mantida

a 58°C. Após homogeneização, a agarose foi distribuída em moldes, mantidos a 4°C por cerca de 10 min. Os blocos de agarose foram colocados em 2ml de solução de lise EC (Tris-HCl 6mM pH 7,6, NaCl 1M, EDTA 100mM pH 7,5, Brij 58 0,5%, lauril sarcosinato de sódio 0,5%) contendo 10mg/mL de lisozima e 1mg/mL de lisostafina e incubados a 35°C, sob leve agitação, durante 18 a 24h. Após esse período, os tubos foram resfriados a 4°C e a solução substituída por 2mL de solução ESP (EDTA 0,4M pH 9,5, lauril sarcosinato de sódio 1%) contendo 0,1 mg/mL proteinase K (Sigma), e os tubos incubados a 50°C, em banho Maria, durante 18 a 24h. Ao final desta fase, os blocos de agarose foram transferidos para nova solução ESP (sem proteinase) e mantidos a 4°C. A digestão do DNA foi realizada a partir de um bloco de agarose, lavado cinco vezes em tampão TE (Tris-HCl 10mM e EDTA 10mM, pH 7,5) a 35°C, sendo as quatro primeiras lavagens de 1h cada e a última de 18h. Após este processo, o bloco foi transferido para uma solução contendo 150µl do tampão específico da enzima de restrição *SmaI* (Biotools Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemanha) e incubados a 25°C, por 4 h. Posteriormente, o bloco foi transferido para um novo tampão da enzima de restrição contendo 20U da enzima *SmaI* e incubado a 25°C, durante 18-24 h. A seguir, foi removida a solução contendo a enzima e o bloco de agarose fundido a 70°C e aplicado no gel de agarose (Sigma) a 1%, em tampão TBE 0,5x. A eletroforese em campo pulsado (CHEF DR III, Bio-Rad), foi realizada utilizando-se um tempo de pulso crescente de 1 a 35 s, durante 21 h a 6V/cm, a 14°C, com ângulo de 120°. Em seguida, o gel foi corado com brometo de etídio (0,5µg/ml), por 30 min, descorado por 1 h em água destilada, observado sob luz ultravioleta e posteriormente fotografado. Os padrões de bandas das diferentes amostras foram analisados através de comparação visual e classificados de acordo com os critérios de Tenover e colaboradores (1995) e através da análise automatizada com o auxílio do sistema “Image Analysis System” empregando o programa “Molecular Analyst

Fingerprint Plus” versão 1.6 (BioRad Laboratories, Hercules, California, EUA) e o método de “Unweighed Pair Group Method using Arithmetic Averages” (UPGMA) para o cálculo dos coeficientes de similaridade.

4 RESULTADOS

4.1 Amostras bacterianas

Foram coletadas 146 amostras de *S. aureus* detectadas como resistentes à oxacilina (ORSA) pelo sistema automatizado utilizado nos hospitais de origem (MicroScan Walk Away 96 e Vitek Systems Inc.). Dessas, 112 foram isoladas no Hospital Naval Marcílio Dias (HNMD), no período de junho de 2004 a outubro de 2005, e 34 foram isoladas no Hospital Copa D'or, no período de outubro de 2006 a agosto de 2007. Excluindo as amostras múltiplas isoladas de um mesmo paciente, 100 amostras, 77 do HNMD e 23 do HCD, foram selecionadas. As amostras foram oriundas de 98 pacientes, 76 do HNMD e 22 do HCD. Dois pacientes, um de cada hospital, apresentaram infecções por amostras com diferentes perfis, e dessa forma, ambas foram incluídas nas análises.

4.1.2 Características gerais das amostras ORSA analisadas

Todas as amostras foram provenientes de pacientes internados nas dependências de ambos os hospitais. Na Tabela 5 estão descritos os diferentes sítios de isolamento e locais de internação, por hospital. Em geral, 46% das amostras foram isoladas de pacientes em unidades de terapia intensiva. O sítio de isolamento mais freqüente foi sangue (31%), seguido de secreção traqueal (26%), secreções cutâneas (13%), secreção de sítio cirúrgico (7%), lavado broncoalveolar (6%) e urina (6%). Cinco (5%) amostras foram detectadas a partir de “swab” nasal. As seis (6%) amostras restantes foram isoladas de sítios diversos.

4.2 Susceptibilidade antimicrobiana

As 100 amostras incluídas no estudo foram avaliadas quanto à susceptibilidade a 15

antimicrobianos pelo método de difusão a partir do disco, incluindo os discos de cefoxitina, oxacilina e penicilina, utilizados para confirmação da resistência aos β -lactâmicos.

A Tabela 6 apresenta os resultados de resistência antimicrobiana obtidos frente a nove dos 15 antimicrobianos testados. Como todas as amostras apresentaram resistência a cefoxitina, oxacilina e penicilina, e susceptibilidade a linezolida, teicoplanina e vancomicina, estes antimicrobianos não foram incluídos na tabela. As maiores taxas de resistência foram observadas para os antimicrobianos eritromicina (96%), ciprofloxacina (93%), clindamicina (90%) e gentamicina (70%). Taxas intermediárias de resistência foram encontradas para sulfametoxazol/trimetoprima (62%), tetraciclina (61%), cloranfenicol (59%) e rifampicina (55%). A taxa de resistência a mupirocina foi a mais baixa (25%). A comparação entre as taxas de resistência observadas para os dois hospitais avaliados demonstrou que não houve diferença estatística entre elas, exceto para cloranfenicol e mupirocina ($p \leq 0,05$).

Seis (6%) amostras apresentaram susceptibilidade a clindamicina e resistência a eritromicina, mas apenas uma (amostra 969) apresentou o fenótipo de resistência induzida, detectada através do teste D.

A análise do perfil de resistência de cada amostra ORSA frente a todos os antimicrobianos utilizados mostrou 24 fenótipos diferentes a partir das 100 amostras avaliadas (Tabela 7). Sessenta e quatro (64%) amostras foram resistentes a pelo seis de doze antimicrobianos testados, não incluindo os β -lactâmicos, sendo 62,3% entre amostras do HNMD e 69,6% entre amostras do HCD. Resistência a no máximo quatro antimicrobianos foi vista em 27% das amostras, 27,3% entre amostras do HNMD e 26,1% entre amostras do HCD. Duas amostras, isoladas no HCD em 2007, apresentaram resistência apenas aos β -lactâmicos.

4.3 Concentração mínima inibitória (CMI) para oxacilina e vancomicina

As CMIs para oxacilina variaram de 8 µg/mL à maior que 256 µg/mL nas 100 amostras ORSA analisadas, sendo 62 (62%) amostras inibidas frente a CMI igual ou superior a 256 µg/mL do antimicrobiano (Tabela 8). Contudo, 24% das amostras apresentaram sensibilidade entre 8 e 64 µg/mL.

Correlação acentuada foi observada entre os fenótipos de susceptibilidade aos antimicrobianos e as CMIs para oxacilina obtidos. Das 64 amostras resistentes a pelo menos seis antimicrobianos, 58 (90,6%) apresentaram CMI para oxacilina maior ou igual a 256 µg/mL. Entre as 27 amostras com resistência a no máximo quatro antimicrobianos, 17 (63%) foram inibidas em CMI entre 8 e 64 µg/mL, sete (25,9%) apresentaram CMI de 128 µg/mL e apenas 3 (11,1%) foram inibidas em CMI de 256 µg/mL. Entre as 100 amostras ORSA analisadas, as CMIs para vancomicina variaram de 0,5 à 2 µg/mL do antimicrobiano (Tabela 9). Oitenta e sete amostras apresentaram CMI de 1 µg/mL, 10 (10%) apresentaram CMI de 0,5 µg/mL e apenas três (3%) amostras apresentaram CMI de 2 µg/mL. Destas três amostras, uma foi isolada no HNMD, em 2004, e duas no HCD, em 2006 e 2007. A amostra do HNMD (559), isolada de líquido peritoneal, apresentou susceptibilidade a praticamente todos os antimicrobianos, exceto cloranfenicol e eritromicina, com CMI para oxacilina de 16 µg/mL. Entre as amostras isoladas no HCD, uma delas, a amostra 829, isolada em outubro de 2006, de sangue, foi resistente a seis antimicrobianos e apresentou CMI para oxacilina de 256 µg/mL. A outra amostra (970) isolada em fevereiro de 2007, de secreção traqueal, apresentou resistência frente a sete antimicrobianos e CMI para oxacilina de 64 µg/mL.

4.4 Tipagem do cassete estafilocócico *mec* (SCC*mec*)

A análise por PCR multiplex das 100 amostras ORSA demonstrou a presença de segmentos gênicos compatíveis com três tipos de cassete *mec* II, III e IV (Figura 2). Entre as

100 amostras avaliadas, não foi possível, inicialmente, determinar o tipo de SCC*mec* em 10 delas pela técnica de extração de DNA por lise térmica. Dessa forma, essas amostras foram então submetidas à extração do DNA pela guanidina.

A Figura 3 mostra a distribuição dos diferentes tipos de cassete *mec* nas 100 amostras ORSA analisadas. O SCC*mec* tipo III foi o prevalente, observado em 61 (61%) amostras. O SCC*mec* tipo IV foi encontrado em 24 (24%) amostras, enquanto o tipo II foi detectado em 15 (15%) delas. A prevalência destes três tipos foi semelhante nos dois hospitais analisados.

4.4.1 Correlação entre o tipo de SCC*mec*, susceptibilidade aos antimicrobianos e CMIs para oxacilina e vancomicina

A correlação entre o tipo de cassete *mec* presente, a susceptibilidade aos antimicrobianos e as CMIs para oxacilina e vancomicina foi analisada para todas as 100 amostras ORSA. A Tabela 10 mostra a correlação entre as taxas de susceptibilidade aos antimicrobianos e os tipos SCC*mec* II, III e IV. As amostras SCC*mec* tipo III apresentaram sensibilidade, além da vancomicina, teicoplanina e linezolida, apenas para mupirocina (88,5%), cloranfenicol (34,4%), rifampicina (13,1%) e gentamicina (1,6%). Entre as 15 amostras SCC*mec* tipo II, foi observada 100% de sensibilidade a rifampicina, sulfametoxazol/trimetoprima e tetraciclina. A maior taxa de resistência a mupirocina (86,7%) foi observada entre essas amostras tipo II. Entre as 24 amostras SCC*mec* tipo IV, foi observada sensibilidade a todas as classes de antimicrobianos, tendo sido detectadas taxas elevadas para tetraciclina (100%), sulfametoxazol/trimetoprima (95,8%), rifampicina (91,7%), mupirocina (79,2%) e gentamicina (75%). As menores taxas de susceptibilidade entre essas amostras foram observadas para os antimicrobianos eritromicina (16,7%) ciprofloxacina (29,2%), cloranfenicol (37,5%) e clindamicina (41,7%).

Na Figura 4 estão apresentadas as CMIs para oxacilina de acordo com o tipo de cassete

mec. Os resultados demonstram que 57 (93,4%) amostras SCC*mec* III apresentaram níveis altos de resistência a esse antimicrobiano, com CMI igual ou superior a 256 µg/mL. Entre as 15 amostras SCC*mec* tipo II, 11 (73,3%) apresentaram CMI para oxacilina de 128 µg/mL e 4 (26,7%) apresentaram CMI de 256 µg/mL. Entre as 24 amostras SCC*mec* tipo IV detectadas, 22 (91,7%) apresentaram CMI entre 8 e 32 µg/mL de oxacilina. As duas amostras restantes apresentaram CMIs de 64 e 256 µg/mL de oxacilina.

4.5 Análise do perfil de fragmentação do DNA cromossômico através da técnica de PFGE

A diversidade genômica foi avaliada para 66 amostras ORSA através da técnica de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) após tratamento com a enzima de restrição *SmaI*. Todas as amostras SCC*mec* tipos II (15 amostras) e IV (24) foram selecionados para análise. Contudo, entre as 61 amostras tipo III, apenas 27 foram analisadas. Essas foram selecionadas de acordo com a presença de similaridades entre elas em relação a características fenotípicas e moleculares de resistência e de acordo com o período, o local e sítio de isolamento. Sítios de isolamento de maior relevância, como sangue, foram priorizados na seleção. Todas as amostras SCC*mec* tipos II e IV isoladas de um mesmo paciente apresentaram o mesmo perfil genotípico. Os genótipos descritos foram designados por meio de uma letra e às variações ou subtipos dentro do mesmo genótipo foram adicionados números subseqüentes.

As Figuras 5 e 6 apresentam os perfis de fragmentação do DNA cromossômico das amostras SCCmec tipo III e SCCmec tipos IV e II, respectivamente. A Figura 7 mostra o dendograma obtido por análise computadorizada dos perfis apresentados. A amostra 968 (linha 12, Figura 5), embora caracterizada como SCCmec tipo II, foi incluída no gel referente as amostras tipo III, devido ao perfil de fragmentação apresentado.

Um total de 31 perfis de fragmentação do DNA cromossômico foi obtido nas 66 amostras ORSA analisadas, incluídos em 12 genótipos. Entre as 27 amostras SCCmec tipo III foram encontrados 13 perfis incluídos em 3 genótipos, designados como A, B e C. Dessas, as 24 (88,9%) amostras pertencentes ao genótipo A apresentaram cerca de 80% de similaridade entre elas (Tabela 11).

As amostras SCCmec tipo IV apresentaram grande diversidade genômica. Entre as 24 amostras desse tipo, foram observados 11 perfis de fragmentação, incluídos em 6 genótipos (D, E, F, G, H e I). A Tabela 12 mostra a distribuição desses genótipos entre estas amostras. A maioria das amostras (13; 54,2%) pertencia ao genótipo F. Seis (25%) amostras pertenciam ao genótipo designado como E. As outras cinco amostras foram pertencentes a quatro genótipos diferentes (D, G, H e I).

As 18 amostras SCCmec tipo IV isoladas no HNMD apresentaram três genótipos diferentes (D, E e F), sendo 12 (66,7%) pertencentes ao genótipo F, subtipos F1, F2 e F3. Em contrapartida, o HCD apresentou seis amostras SCCmec IV, cada uma de um genótipo diferente. Três genótipos foram encontrados em ambos os hospitais, D, E e F. A Figura 8 mostra a variação temporal dos genótipos D, E e F entre as amostras SCCmec IV no HNMD. Nos 16 meses de estudo, foram isoladas amostras SCCmec IV em nove deles. O genótipo F foi observado em sete desses meses. No mês de julho/2004, duas amostras, genótipos D e E, foram isoladas, e em seguida, em setembro, foi isolada uma amostra do genótipo F. Nos meses de março, abril e maio de 2005, cinco amostras tipo IV foram isoladas, três delas pertencentes

ao fenótipo E e duas ao genótipo F. A partir de julho, até outubro, todas as amostras SCCmec IV isoladas no HNMD pertenciam ao genótipo F e apenas uma ao genótipo E.

A Figura 9 mostra a distribuição temporal das amostras SCCmec IV no HCD, de acordo com o genótipo. Cada uma das seis amostras isoladas apresentou um genótipo diferente.

Entre as 15 amostras SCCmec tipo II, foram observados sete perfis de fragmentação, incluídos em apenas 3 genótipos, J, L e M. Dessas, 12 (80%) foram pertencentes ao mesmo genótipo, designado como J. As outras três amostras pertenciam a três genótipos diferentes, C, subtipo C2, L e M (Tabela 13). A amostra 968 foi agrupada no genótipo C por ter apresentado similaridade com as amostras SCCmec tipo III (Tabela 11).

4.6 Correlação entre a presença de genes codificadores de fatores de virulência, características fenotípicas e genotípicas e aspectos clínicos

Todas as amostras ORSA foram analisadas por PCR multiplex para detecção dos genes *lukS-PV* e *lukF-PV*, que codificam a PVL, e do gene *hla*, que codifica a α -hemolisina. Na Figura 10 pode-se observar a presença de um fragmento de 204 pb, compatível com a presença do gene *hla*, que foi encontrado em todas as amostras clínicas analisadas. A presença de um fragmento de 433 pb, compatível com a presença dos genes *lukS-PV* e *lukF-PV*, foi observada em três amostras, isoladas de três pacientes, dois no HNMD, e um no HCD. Do paciente internado no HCD, foram isoladas quatro amostras positivas para esses genes, apresentando os mesmos perfis fenotípicos e genotípicos.

A Tabela 14 mostra as características fenotípicas e moleculares das três amostras SCCmec tipo IV PVL positivas, além das características clínicas associadas a esses pacientes. As duas amostras do HNMD (584 e 559) foram isoladas em julho de 2004, de secreção de polegar e líquido peritoneal, respectivamente, em diferentes enfermarias. Cada uma apresentou um genótipo diferente (D e E). A amostra do HCD foi isolada em agosto de 2007,

da enfermagem pediátrica. Todas as amostras apresentaram grande susceptibilidade antimicrobiana, a pelo menos 10 dos 12 antimicrobianos testados, tendo um paciente apresentado amostras com resistência apenas aos β -lactâmicos (paciente 3, HCD). Duas amostras apresentaram CMI para oxacilina de 8 $\mu\text{g/mL}$ e uma apresentou CMI 16 $\mu\text{g/mL}$. Uma das amostras, isoladas no HNMD, apresentou CMI para vancomicina de 2 $\mu\text{g/mL}$, enquanto as outras apresentaram CMI de 1 $\mu\text{g/mL}$. Todas as amostras PVL positivas apresentaram o SCCmec tipo IV. Considerando apenas as 24 amostras SCCmec IV, a prevalência dos genes da PVL foi de 12,5%.

Uma das amostras, isoladas no HNMD de líquido peritoneal (559) foi isolada de um paciente idoso, em hemodiálise, com histórico de múltiplas internações e, portanto, foi classificada como de origem hospitalar. A amostra 584 foi isolada de um paciente de 32 anos, internado com furunculose e celulite em polegar direito. A amostra isolada do paciente no HCD foi isolada de uma criança. As infecções adquiridas por esses dois últimos pacientes foram classificadas como comunitárias pelo Serviço de Controle de Infecção Hospitalar dos hospitais de origem.

Tabela 5: Características gerais das 100 amostras ORSA analisadas no presente estudo

Hospital	Nº de amostras isoladas	Nº de pacientes	Local de internação (Nº de amostras; %)	Sítio de isolamento (Nº de amostras; %)
Hospital Naval Marcílio Dias (HNMD)	77	76	UTI (20; 26%) UI (7; 9,1%) UC (4; 5,2%) Enfermarias (46; 59,7%)	Sangue (28; 36,4%)
				Secreção traqueal (18; 23,4%)
				Secreções cutâneas (11; 14,3%)
				Secreção de sítio cirúrgico (7; 9%)
				Urina (6; 7,8%)
Hospital Copa D’or (HCD)	23	22	UTI (12; 52,2%) UTSI (3; 13%) Enfermarias (8; 34,8%)	“Swab” nasal (2; 2,6%)
				Outros (5; 6,5%)
				Secreção traqueal (8; 34,8%)
				Lavado broncoalveolar (6; 26,1%)
				Sangue (3; 13%)
				“Swab” nasal (3; 13%)
				Secreções cutâneas (2; 8,7%)
				Outros (1; 4,4%)

UTI – Unidade de Terapia Intensiva; UI – Unidade Intermediária; UC – Unidade Coronariana; UTSI – Unidade de Terapia Semi-Intensiva

Tabela 6: Percentual de resistência aos antimicrobianos de acordo com o teste de difusão a partir do disco em 100 amostras ORSA isoladas nos hospitais Naval Marcílio Dias e Copa D'or.

Antimicrobiano*	Número (%) de amostras resistentes		
	HNMD	HCD	Total
Ciprofloxacina	73 (94,8)	20 (87)	93 (93)
Clindamicina	71 (92,2)	19 (82,6)	90 (90)
Cloranfenicol	51 (66,2)	8 (34,8)	59 (59)
Eritromicina	75 (97,4)	21 (91,3)	96 (96)
Gentamicina	52 (67,5)	18 (78,3)	70 (70)
Mupirocina	24 (31,2)	1 (4,3)	25 (25)
Rifampicina	43 (55,8)	12 (52,2)	55 (55)
Sulfametoxazol/ Trimetoprima	46 (59,7)	16 (69,6)	62 (62)
Tetraciclina	46 (59,7)	15 (65,2)	61 (61)
Total	77	23	100

HNMD: Hospital Naval Marcílio Dias; HCD: Hospital Copa D'or; * Exceto β -lactâmicos

Tabela 7: Fenótipos de resistência apresentados pelas 100 amostras ORSA analisadas

Hospital	Nº de amostras	Perfil de resistência aos antimicrobianos ^a (nº de amostras)
HNMD	77	CIP, CLI, CLO, ERI, GEN, RIF, SFT, TET (26)
		CIP, CLI, ERI, MUP (9)
		CIP, CLI, ERI, GEN, RIF, SFT, TET (7)
		CIP, CLI, CLO, ERI (6)
		CIP, CLI, ERI, GEN, MUP, RIF, SFT, TET (5)
		CIP, CLI, CLO, ERI, GEN, SFT, TET (5)
		CIP, CLI, CLO, ERI, MUP (5)
		CIP, CLI, CLO, ERI, GEN, MUP, RIF, SFT, TET (2)
		CIP, CLI, CLO, ERI, GEN, MUP (2)
		CIP, CLI, CLO, ERI, GEN (2)
		CIP, CLI, ERI, RIF, SFT, TET (1)
		CIP, CLI, ERI, GEN, MUP (1)
		CIP, ERI, RIF (1)
		ERI, GEN, RIF (1)
		CLO, ERI (2)
		CIP, CLO (1)
		GEN (1)
HCD	23	CIP, CLI, CLO, ERI, GEN, RIF, SFT, TET (6)
		CIP, CLI, ERI, GEN, RIF, SFT, TET (6)
		CIP, CLI, ERI, GEN, SFT, TET (2)
		CIP, CLI, CLO, ERI, GEN, SFT, TET (1)
		CIP, CLI, CLO, ERI, GEN, SFT (1)
		CIP, CLI, ERI, GEN, MUP (1)
		CIP, CLI, ERI, GEN (1)
		CIP, CLI, ERI (1)
		CIP, ERI (1)
		ERI (1)
		- * (2)

HNMD - Hospital Naval Marcílio Dias; HCD - Hospital Copa D'or; ^a Exceto β - lactâmicos; Antimicrobianos testados: CIP - ciprofloxacino; CLI - clindamicina; CLO - cloranfenicol; ERI - eritromicina; GEN - gentamicina; LIN - linezolida; MUP - mupirocina; PEN - penicilina; RIF - rifampicina; SFT - sulfametoxazol/trimetoprima; TEI - teicoplanina; *Resistência apenas aos β - lactâmicos

Tabela 8: Concentração mínima inibitória para oxacilina observada para as 100 amostras ORSA analisadas

CMI para oxacilina ($\mu\text{g/mL}$)	Número (%) de amostras		
	HNMD	HCD	Total
8	3 (3,9)	3 (13,1)	6 (6)
16	2 (2,6)	(-)	2 (2)
32	13 (16,9)	1 (4,3)	14 (14)
64	(-)	2 (8,7)	2 (2)
128	12 (15,6)	2 (8,7)	14 (14)
≥ 256	47 (61)	15 (65,2)	62 (62)
Total	77	23	100

CMI: concentração mínima inibitória; HNMD: Hospital Naval Marcílio Dias; HCD: Hospital Copa D'or; (-) nenhuma amostra encontrada

Tabela 9: Concentração mínima inibitória para vancomicina observada para as 100 amostras ORSA analisadas

CMI para vancomicina ($\mu\text{g/mL}$)	Número (%) de amostras		
	HNMD	HCD	Total
0,5	5 (6,5)	5 (21,8)	10 (10)
1	71 (92,2)	16 (69,5)	87 (87)
2	1 (1,3)	2 (8,7)	3 (3)
Total	77	23	100

CMI: concentração mínima inibitória; HNMD: Hospital Naval Marcílio Dias; HCD: Hospital Copa D'or

Tabela 10: Taxas de susceptibilidade aos antimicrobianos apresentadas pelas 100 amostras ORSA avaliadas em relação aos tipos de SCCmec

Antimicrobianos*	Número (%) de amostras		
	SCCmec III (61)	SCCmec II (15)	SCCmec IV (24)
Ciprofloxacina	0	0	7 (29,2)
Clindamicina	0	0	10 (41,7)
Cloranfenicol	21 (34,4)	11 (73,3)	9 (37,5)
Eritromicina	0	0	4 (16,7)
Gentamicina	1 (1,6)	11 (73,3)	18 (75)
Mupirocina	54 (88,5)	2 (13,3)	19 (79,2)
Rifampicina	8 (13,1)	15 (100)	22 (91,7)
Sulfametoxazol/ Trimetoprima	0	15 (100)	23 (95,8)
Tetraciclina	0	15 (100)	24 (100)

* Exceto β -lactâmicos; Antimicrobianos testados: CIP - ciprofloxacina; CLI - clindamicina; CLO - cloranfenicol; ERI - eritromicina; GEN - gentamicina; LIN - linezolida; MUP - mupirocina; PEN - penicilina; RIF - rifampicina; SFT - sulfametoxazol/ trimetoprima; TEI - teicoplanina

Tabela 11: Características das 27 amostras ORSA SCCmec tipo III analisadas por PFGE

Hospital (Nº de amostras)	Nº da Amostra	Data	Sítio de isolamento	Local de internação	Perfil de Resistência ^a	Oxacilina CMI (µg/mL)	Vancomicina CMI (µg/mL)	Genótipo (PFGE)	Clonalidade ^b
HNMD (21)	581	03/06/04	secreção traqueal	UTI	CIP, CLI, ERI, GEN, RIF, SFT, TET	256	1	A6	Brasileiro
	842	05/07/04	secreção traqueal	UTI	CIP, CLI, CLO, ERI, GEN, SFT, TET	256	1	A2	Brasileiro
	588	02/08/04	sangue	UI	CIP, CLI, CLO, ERI, GEN, RIF, SFT, TET	256	1	A8	Brasileiro
	824	03/08/04	swab nasal	10º andar	CIP, CLI, CLO, ERI, GEN, RIF, SFT, TET	256	1	A3	Brasileiro
	591	04/08/04	sangue	10º andar	CIP, CLI, CLO, ERI, GEN, SFT, TET	256	1	A3	Brasileiro
	592	05/08/04	secreção cutânea	9º andar	CIP, CLI, ERI, GEN, RIF, SFT, TET	>256	1	A4	Brasileiro
	674	16/08/04	sangue	UTI	CIP, CLI, CLO, ERI, GEN, RIF, SFT, TET	>256	1	A2	Brasileiro
	678	25/08/04	sangue	10º andar	CIP, CLI, CLO, ERI, GEN, RIF, SFT, TET	>256	1	A5	Brasileiro
	647	03/09/04	secreção cutânea	8º andar	CIP, CLI, ERI, GEN, MUP, RIF, SFT, TET	256	1	A3	Brasileiro
	648	07/09/04	sangue	DIP	CIP, CLI, ERI, GEN, RIF, SFT, TET	128	1	A7	Brasileiro
	650	13/09/04	secreção cutânea	UC	CIP, CLI, CLO, ERI, GEN, RIF, SFT, TET	>256	1	A4	Brasileiro
	651	17/09/04	sangue	UI	CIP, CLI, ERI, GEN, RIF, SFT, TET	256	1	A1	Brasileiro
	676	09/10/04	sangue	10º andar	CIP, CLI, CLO, ERI, GEN, RIF, SFT, TET	256	1	B1	–
	556	22/12/04	liquor	UTI	CIP, CLI, CLO, ERI, GEN, RIF, SFT, TET	256	1	A2	Brasileiro
	682	27/12/04	sangue	10º andar	CIP, CLI, CLO, ERI, GEN, RIF, SFT, TET	256	1	A2	Brasileiro
	767	26/01/05	secreção de sítio cirúrgico	UTI	CIP, CLI, ERI, GEN, RIF, SFT, TET	256	1	A4	Brasileiro
	831	28/01/05	sangue	UTI	CIP, CLI, CLO, ERI, GEN, RIF, SFT, TET	>256	1	A4	Brasileiro
	845	02/06/05	sangue	Emergência	CIP, CLI, ERI, GEN, MUP, RIF, SFT, TET	256	1	A6	Brasileiro
	848	25/06/05	ponta de cateter	UI	CIP, CLI, ERI, GEN, MUP, RIF, SFT, TET	256	1	A10	Brasileiro
	850	04/07/05	sangue	UTI	CIP, CLI, ERI, GEN, RIF, SFT, TET	256	1	A4	Brasileiro
	853	14/07/05	sangue	10º andar	CIP, CLI, CLO, ERI, GEN, RIF, SFT, TET	256	1	A4	Brasileiro
HCD (6)	830	20/10/06	secreção cutânea	6º andar	CIP, CLI, CLO, ERI, GEN, RIF, SFT, TET	256	1	B2	–
	959	09/12/06	sangue	UTI Cardio	CIP, CLI, ERI, GEN, RIF, SFT, TET	128	1	A5	Brasileiro
	970	04/02/07	secreção traqueal	UTSI	CIP, CLI, ERI, GEN, RIF, SFT, TET	64	2	C1	–
	1006	03/08/07	swab nasal	9º andar	CIP, CLI, CLO, ERI, GEN, SFT, TET	256	1	A9	Brasileiro
	1010	19/08/07	secreção traqueal	UPO	CIP, CLI, ERI, GEN, SFT, TET	256	1	A5	Brasileiro
	1014	30/08/07	sangue	UTI Cardio	CIP, CLI, ERI, GEN, SFT, TET	128	1	A4	Brasileiro

HNMD - Hospital Naval Marcílio Dias; HCD - Hospital Copa D'or; ^a Exceto β-lactâmicos; ^b SANTOS *et al.*, 1999; Antimicrobianos testados: CIP - ciprofloxacino; CLI - clindamicina; CLO -cloranfenicol; ERI - eritromicina; GEN - gentamicina; LIN - linezolida; MUP - mupirocina; PEN - penicilina; RIF- rifampicina; SFT- sulfametoxazol/trimetoprima; TEI - teicoplanina; DIP - Doenças Infecto-Parasitárias; UC - Unidade Coronariana; UI - Unidade Intermediária; UTI - Unidade de Terapia Intensiva; UTSI - Unidade de Terapia Semi-Intensiva; UPO - Unidade Pós - Operatório; UTI Cardio - Unidade de Terapia Intensiva Cardiológica

Tabela 12: Características das 24 amostras ORSA SCCmec tipo IV analisadas por PFGE

Hospital (Nº de amostras)	Nº da Amostra	Data	Sítio de isolamento	Local de internação	Perfil de Resistência ^a	Oxacilina CMI (µg/mL)	Vancomicina CMI (µg/mL)	Genótipo (PFGE)	Clonalidade ^b
HNMD (18)	584 ^c	15/07/04	secreção polegar direito	8º andar	GEN	8	1	D1	Oceania
	559 ^c	22/07/04	líquido peritoneal	Diálise	CLO, ERI	16	2	E1	USA800
	833	13/09/04	urina	10º andar	CIP, CLI, CLO, ERI, GEN, MUP	32	1	F3	USA400
	677	10/03/05	secreção de prótese de quadril	8º andar	CIP, ERI, RIF	8	1	E2	USA800
	771	25/04/05	sangue	8º andar	CIP, CLI, CLO, ERI, MUP	32	1	F1	USA400
	780	07/05/05	secreção traqueal	9º andar	CLO, ERI	16	1	E1	USA800
	772	19/05/05	sangue	Imuno	CIP, CLI, ERI, MUP	32	1	F1	USA400
	773	22/05/05	secreção traqueal	UTI	CIP, CLI, CLO, ERI	8	1	E1	USA800
	852	05/07/05	secreção traqueal	UC	CIP, CLI, CLO, ERI, MUP	32	1	F1	USA400
	856	10/08/05	sangue	UTI	CIP, CLI, CLO, ERI	32	1	F1	USA400
	859	15/08/05	secreção de sítio cirúrgico	6º andar	ERI, GEN, RIF	32	1	E1	USA800
	861	30/08/05	sangue	10º andar	CIP, CLI, CLO, ERI, MUP	32	1	F1	USA400
	862	31/08/05	sangue	UI	CIP, CLI, CLO, ERI, GEN	32	1	F1	USA400
	922	03/09/05	sangue	UTI	CIP, CLI, CLO, ERI	32	1	F1	USA400
	923	06/09/05	secreção de sítio cirúrgico	9º andar	CIP, CLI, CLO, ERI, GEN	32	1	F3	USA400
	919	21/09/05	urina	10º andar	CIP, CLI, CLO, ERI	32	1	F1	USA400
	920	28/09/05	líquido pleural	UC	CIP, CLO	32	1	F2	USA400
	915	24/10/05	urina	10º andar	CIP, CLI, CLO, ERI	32	1	F2	USA400
HCD (6)	829	30/10/06	sangue	6º andar	CIP, CLI, CLO, ERI, GEN, SFT	256	2	I	-
	1003	28/03/07	swab nasal	UTI Cardio	CIP, CLI, ERI	8	0,5	F1	USA400
	969	25/04/07	lavado broncoalveolar	UPO	ERI	8	0,5	H	-
	1007	27/07/07	secreção traqueal	UTI Cardio	CIP, ERI	64	0,5	G	EMRSA-15
	1008	04/08/07	lavado broncoalveolar	10º andar	(-)	32	1	E3	USA800
	1013 ^c	24/08/07	secreção de tíbia	Pediatria	(-)	8	1	D2	Oceania

HNMD-Hospital Naval Marcílio Dias;HCD-Hospital Copa D'or; a Exceto β-lactâmicos; b MCDOUGAL *et al.*, 2003; GOSBELL *et al.*, 2006; ^c Amostras positivas para os genes da PVL; Antimicrobianos testados: CIP- ciprofloxacina; CLI - clindamicina; CLO - cloranfenicol; ERI - eritromicina; GEN - gentamicina; LIN - linezolida; MUP- mupirocina; PEN - penicilina; RIF - rifampicina; SFT- sulfametoxazol/trimetoprima;TEI - teicoplanina; Imuno - Unidade de Imunocomprometidos; UC-Unidade Coronariana; UI -Unidade Intermediária; UTI - Unidade de Terapia Intensiva; UTSI - Unidade de Terapia Semi - Intensiva; UPO - Unidade Pós - Operatório; UTI - Cardio Unidade de Terapia Intensiva Cardiológica

Tabela 13: Características das 15 amostras ORSA SCCmec tipo II analisadas por PFGE

Hospital (Nº de amostras)	Nº da Amostra	Data	Sítio de isolamento	Local de internação	Perfil de Resistência ^a	Oxacilina CMI (µg/mL)	Vancomicina CMI (µg/mL)	Genótipo (PFGE)	Clonalidade ^b
HNMD (13)	649	08/09/04	sangue	10º andar	CIP, CLI, ERI, MUP	128	0,5	J1	USA800
	557	10/09/04	secreção sítio cirúrgico	8º andar	CIP, CLI, ERI, MUP	128	1	J1	USA800
	655	27/10/04	sangue	UI	CIP, CLI, CLO, ERI, MUP	128	0,5	J1	USA800
	659	10/11/04	secreção traqueal	UTI	CIP, CLI, ERI, MUP	128	0,5	J2	USA800
	555	19/11/04	urina	9º andar	CIP, CLI, ERI, MUP	128	1	J1	USA800
	663	01/12/04	sangue	9º andar	CIP, CLI, ERI, MUP	128	0,5	J1	USA800
	554	02/12/04	secreção cutânea	UTI	CIP, CLI, ERI, MUP	256	1	J3	USA100
	670	11/01/05	secreção óssea	8º andar	CIP, CLI, ERI, GEN, MUP	128	1	J1	USA800
	840	15/01/05	secreção traqueal	UTI	CIP, CLI, ERI, MUP	128	1	M	USA200
	913	14/02/05	secreção de sítio cirúrgico	Emergência	CIP, CLI, CLO, ERI, MUP	128	1	J1	USA800
	769	22/04/05	sangue	9º andar	CIP, CLI, ERI, MUP	128	1	J4	USA100
	843	18/05/05	secreção traqueal	UTI	CIP, CLI, CLO, ERI	256	1	L	USA600
	881	24/06/05	secreção de sítio cirúrgico	Centro Cirúrgico	CIP, CLI, CLO, ERI, GEN, MUP	128	1	J1	USA800
HCD (2)	838	22/10/06	lavado broncoalveolar	UTI	CIP, CLI, ERI, GEN, MUP	256	1	J4	USA100
	968	19/04/07	swab nasal	10º andar	CIP, CLI, ERI, GEN	256	1	C2	-

HNMD - Hospital Naval Marcílio Dias; HCD - Hospital Copa D'or; ^a Exceto β-lactâmicos; ^b MCDOUGAL *et al.*, 2003; Antimicrobianos testados: CIP- ciprofloxacino; CLI - clindamicina; CLO - cloranfenicol; ERI - eritromicina; GEN - gentamicina; LIN - linezolida; MUP - mupirocina; PEN - penicilina; RIF - rifampicina; SFT-sulfametoxazol/trimetoprima; TEI -teicoplanina; UC - Unidade Coronariana; UI - Unidade Intermediária; UTI - Unidade de Terapia Intensiva; UTSI - Unidade de Terapia Semi-Intensiva; UPO - Unidade Pós - Operatório; UTI Cardio -Unidade de Terapia Intensiva Cardiológica

Tabela 14: Características das amostras ORSA SCCmec tipo IV positivas para os genes da PVI

Paciente / Hospital	Idade/ Sexo	Local de Internação	Fatores de risco	Tipo de Infecção	Amostra	Sítio de isolamento	Data de isolamento	Perfil de Resistência ^a	Oxacilina CMI (µg/mL)	Vancomicina CMI (µg/mL)	Genótipo (PFGE)	Clonalidade ^b
1/ HNMD	32/M	8º andar	Não	IC	584	secreção polegar direito	15/07/04	GEN	8	1	D1	Oceania
2 / HNMD	61/M	Diálise	Hospitalização prévia Antibioticoterapia Hemodiálise	IH	559	líquido peritoneal	22/07/04	CLO, ERI	16	2	E1	USA 800 (Clone Pediátrico)
3 / HCD*	8/M	Pediatria	Não	IC	1013	secreção de tíbia	15/08/07	(-)	8	1	D2	Oceania

HNMD - Hospital Naval Marcílio Dias; HCD - Hospital Copa D'or; IC - infecção comunitária; IH - infecção hospitalar ; ^a Exceto β-lactâmicos; ^b MCDUGAL *et al.*, 2003; GOSBELL *et al.*, 2006; Antimicrobianotestados: CIP - ciprofloxacina; CLI - clindamicina; CLO - cloranfenicol; ERI - eritromicina; GEN - gentamicina; LIN - linezolida; MUP - mupirocina; PEN -penicilina; RIF - rifampicina; SFT- sulfametoxazol/trimetoprima; TEI - teicoplanina; * Paciente apresentou mais três amostras clínicas positivas para a PVL, isoladas de sague, secreção de sítio cirúrgico e fragmento ósseo.

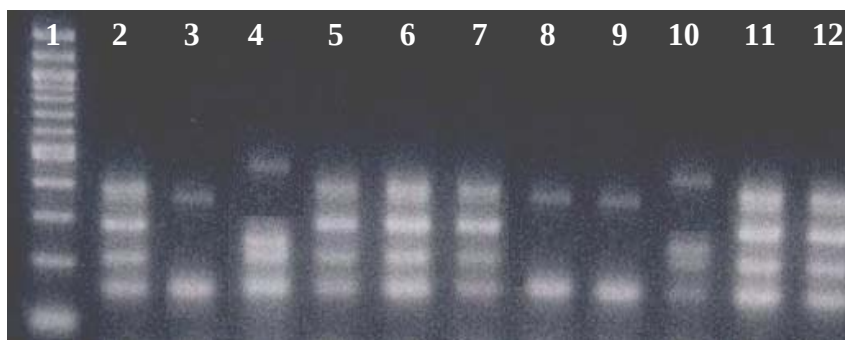


Figura 2: Eletroforese em gel de agarose dos fragmentos dos genes que codificam os diferentes tipos de *SCCmec* em amostras ORSA. Linha 1: Padrão de peso molecular (100 pb DNA ladder); Linha 2: Amostra controle ORSA *SCCmec* tipo II; Linha 3: Amostra controle ORSA *SCCmec* tipo IV; Linha 4: Amostra controle ORSA *SCCmec* tipo III; Linhas 5, 6, 7, 11 e 12: Amostras clínicas *SCCmec* tipo II; Linhas 8, 9: Amostras clínicas *SCCmec* tipo IV; Linha 10: Amostra clínica *SCCmec* tipo III.

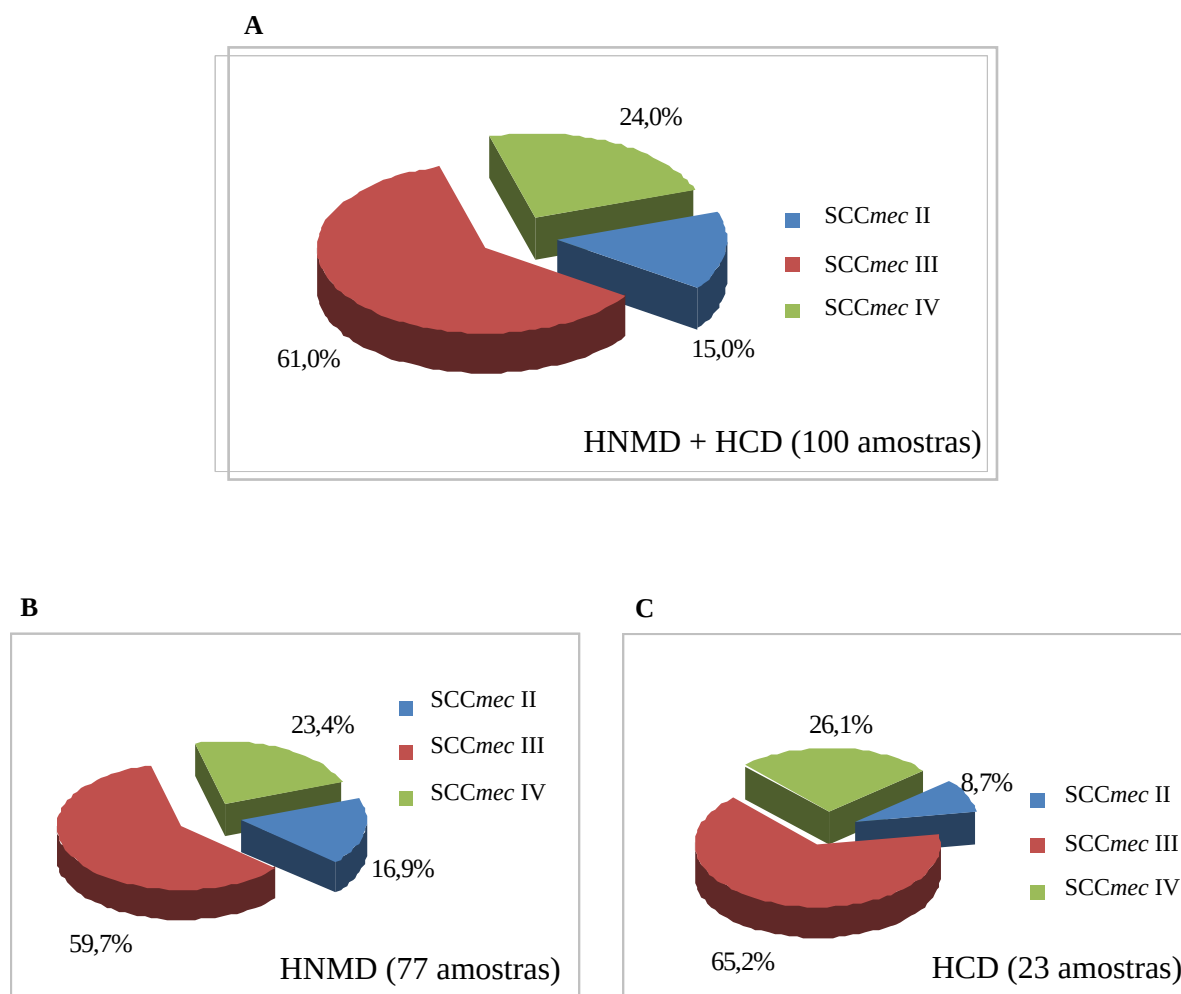


Figura 3: Distribuição dos tipos de SCCmec entre as amostras analisadas. A: Distribuição dos diferentes tipos de SCCmec entre as 100 amostras ORSA analisadas. B: Distribuição dos diferentes tipos de SCCmec entre as 77 amostras ORSA analisadas isoladas no HNMD (Hospital Naval Marcílio Dias). C: Distribuição dos diferentes tipos de SCCmec entre as 23 amostras ORSA analisadas isoladas no HCD (Hospital Copa D'or).

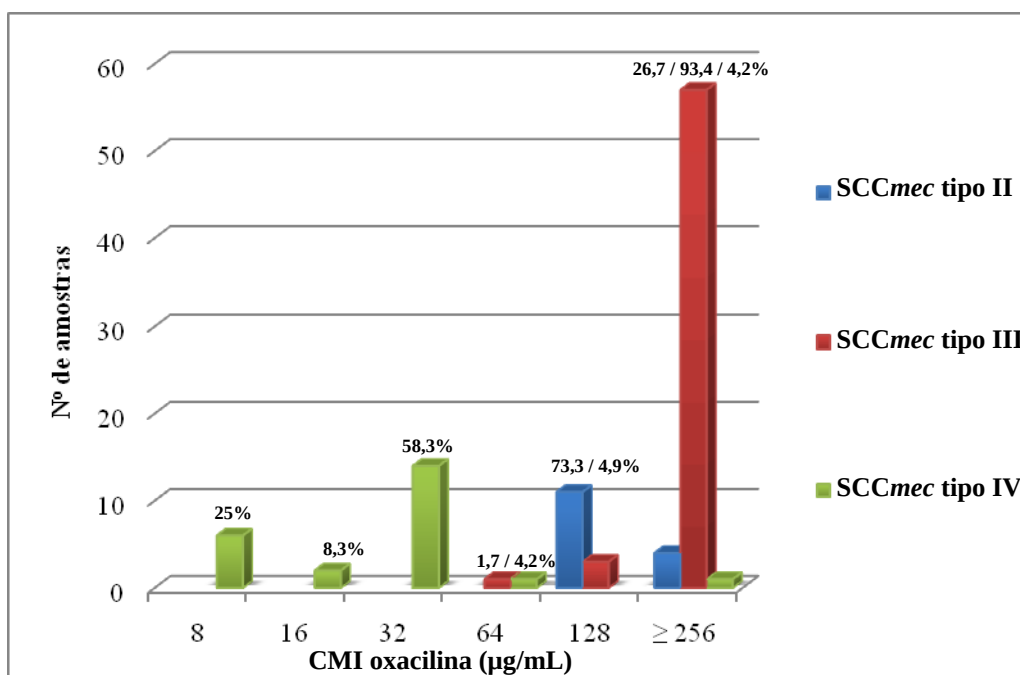


Figura 4: Distribuição da CMI para oxacilina de acordo com o tipo de SCCmec nas 100 amostras ORSA avaliadas

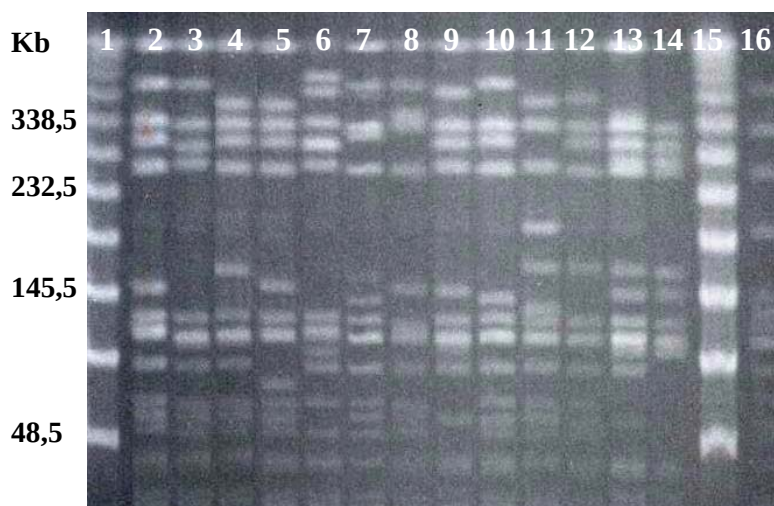


Figura 5: Perfis de fragmentação do DNA cromossômico obtidos após digestão com a enzima *SmaI* e separação por PFGE de amostras ORSA SCCmec tipo III isoladas no HNMD e HCD. Linhas 1 e 15: Padrão de peso molecular; Linhas 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 12: Amostras clínicas representativas do genótipo A (651, 591, 556, 1014, 648, 588, 1006, 1010, 845 e 848); Linhas 11 e 16: Amostras clínicas representativas do genótipo B (676 e 830); Linhas 13 e 14: Amostras clínicas representativas do genótipo C (968 e 970).

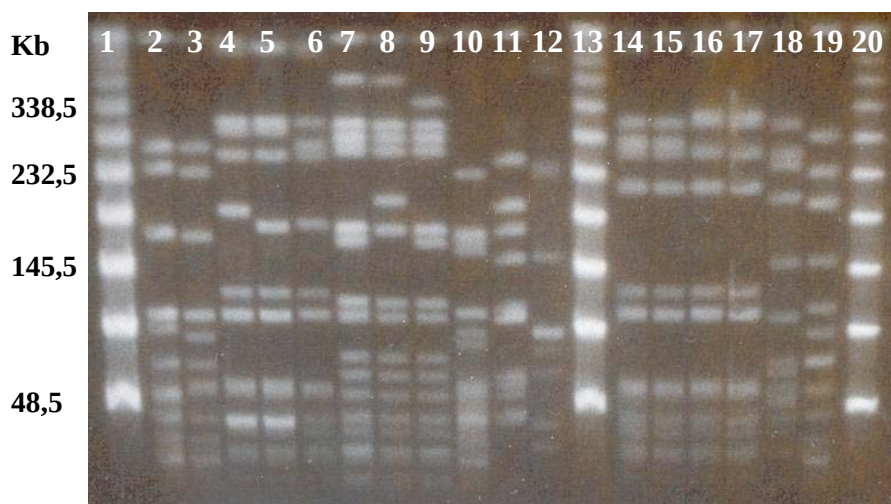


Figura 6: Perfis de fragmentação do DNA cromossômico obtidos após digestão com a enzima *SmaI* e separação por PFGE de amostras ORSA SCCmec tipos IV (Linhas 2 a 12) e SCCmec II (Linhas 14 a 19) isoladas no HNMD e HCD. Linhas 1, 13 e 20: Padrão de peso molecular; Linhas 2 e 3: Amostras clínicas representativas do genótipo D (amostras 1013 e 584); Linhas 4, 5 e 6: Amostras clínicas representativas do genótipo E (559, 780 e 1008); Linhas 7, 8 e 9: Amostras clínicas representativas do genótipo F (862, 920 e 863); Linha 10: Amostra clínica do genótipo H (969); Linha 11: Amostra clínica do genótipo G (1007); Linha 12: Amostra clínica do genótipo I (829); Linhas 14, 15, 16 e 17: Amostras clínicas representativa do genótipo J (557, 659, 769 e 554); Linha 18: Amostra clínica do genótipo L (843); Linha 19: Amostra clínica do genótipo M (840).

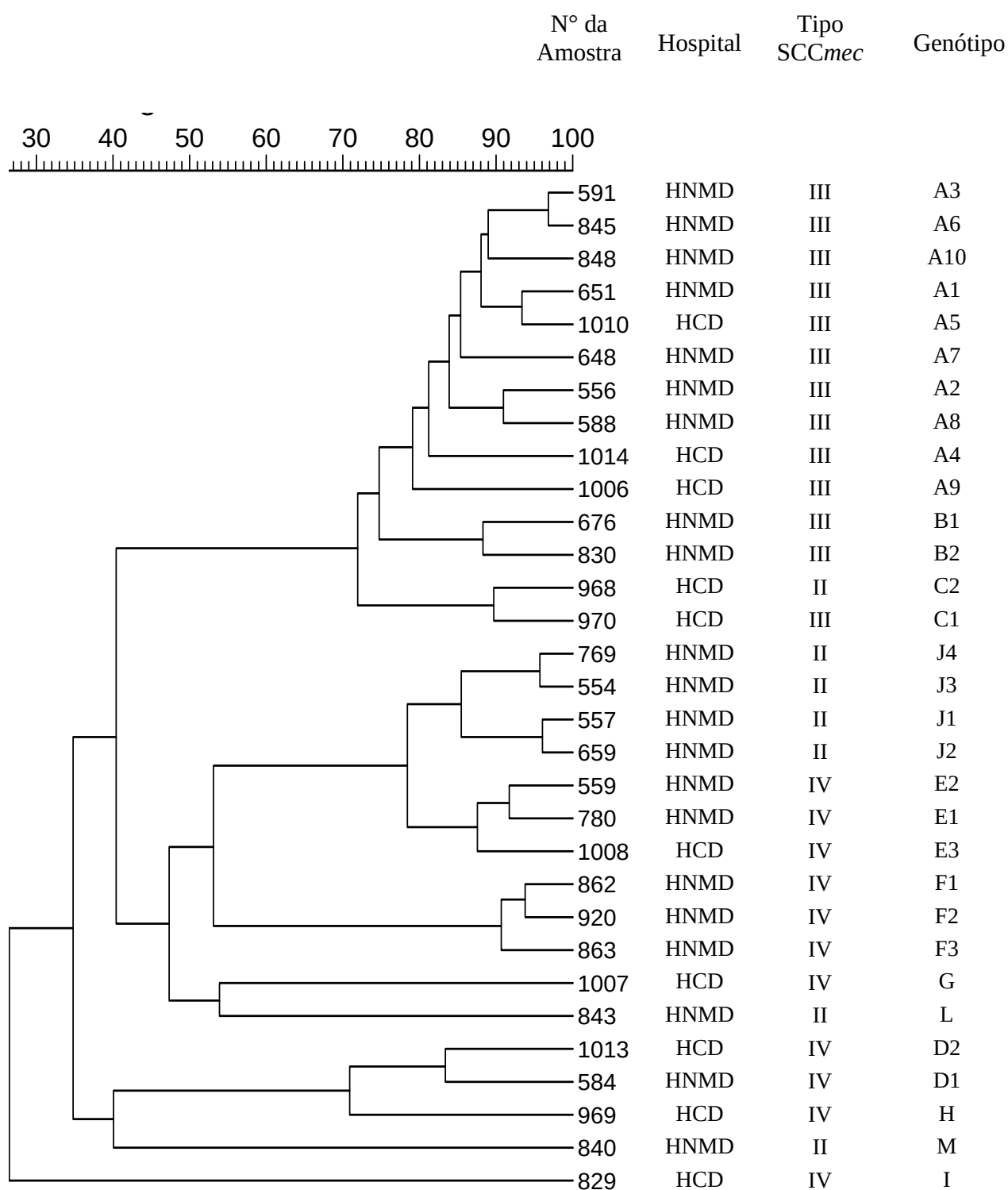


Figura 7: Dendrograma obtido por análise computadorizada dos perfis apresentados nas Figuras 5 e 6

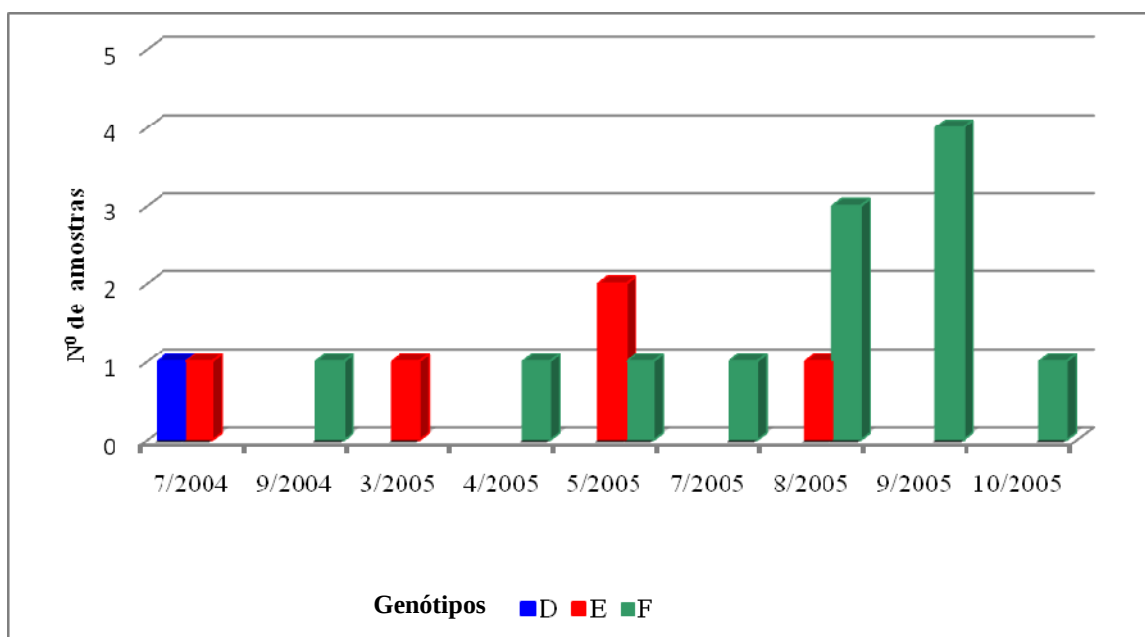


Figura 8: Distribuição temporal das amostras ORSA SCCmec IV no HNMD de acordo com os diferentes genótipos

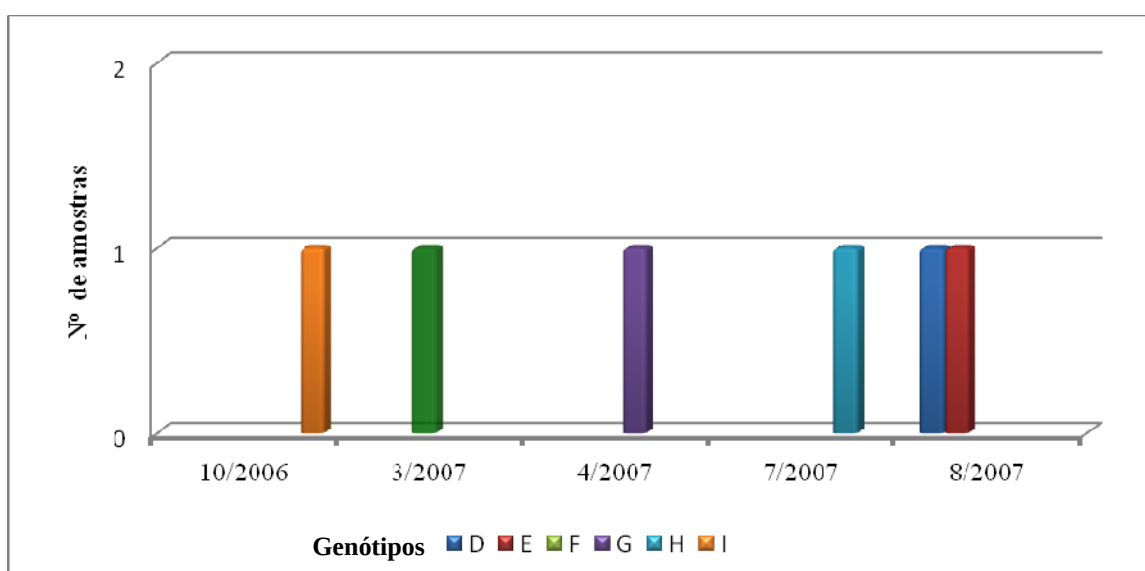


Figura 9: Distribuição temporal das amostras ORSA SCCmec IV no HCD de acordo com os diferentes genótipos

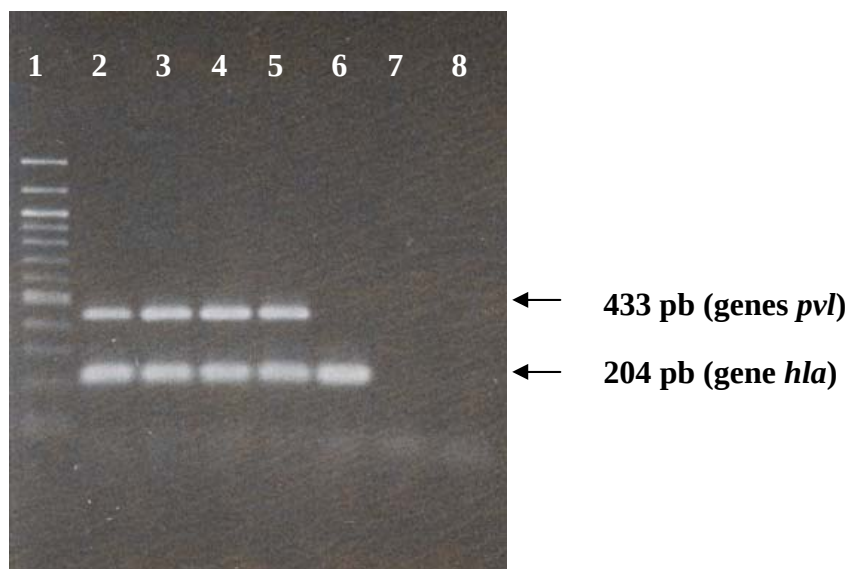


Figura 10 – Eletroforese em gel de agarose dos fragmentos de 204 pb, do gene *hla* e de 433 pb, dos genes *lukS-PV* e *lukF-PV*, amplificados pela técnica de PCR multiplex em amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes a oxacilina. Linha 1: Padrão de peso molecular (100 pb ladder); Linha 2: Amostra controle de *S. aureus* HLA e PVL positiva; Linhas 3, 4 e 5: Amostras clínicas 559, 584 e 1013 HLA e PVL positivas; Linha 6: Amostra controle de *S. aureus* HLA positiva PVL negativa; Linha 7: Amostra controle de *S. epidermidis* HLA negativa PVL negativa; Linha 8: controle negativo da PCR.

5 DISCUSSÃO

Staphylococcus aureus estão entre os agentes mais isolados de infecções hospitalares em todo o mundo (ARCHER, 1998). O cenário tem se agravado devido ao aumento nas taxas de resistência aos antimicrobianos, em especial à oxacilina, fármaco de escolha para o tratamento de infecções causadas por este patógeno (LOWY, 1998). Dados de diversas localidades demonstram que as taxas de resistência a esse antimicrobiano têm aumentado significativamente, seja em regiões desenvolvidas, como Estados Unidos (NNIS, 2004) e países da Europa (EARSS, 2005), como em regiões em desenvolvimento, como os países da América Latina (DIEKEMA *et al.*, 2001). No Brasil, as taxas de resistência à oxacilina em *S. aureus* estão próximas de 50% (SADER *et al.*, 2004).

A resistência à oxacilina é mediada pela expressão de uma proteína, denominada PBP 2', com fraca afinidade pelos antimicrobianos β -lactâmicos (CHAMBERS, 1993). Essa proteína é codificada pelo gene *mecA*, que se encontra inserido em um cassete cromossômico, *SCCmec*. Esse cassete também pode apresentar segmentos de DNA associados, como transpósons e plasmídeos, e genes de resistência a outras classes de antimicrobianos (KATAYAMA, ITO & HIRAMATSU, 2000; ITO *et al.*, 2003). Devido à pressão seletiva ocasionada pelo uso contínuo e indiscriminado de diversos antimicrobianos, o *SCCmec* foi agrupando cada vez mais determinantes de resistência a diversas classes de drogas. Dessa forma, uma vez adquirido esse cassete, as amostras ORSA podem se tornar resistentes a praticamente todos os antimicrobianos utilizados na terapêutica. A análise de amostras ORSA isoladas de diversas localidades, incluindo a América Latina, demonstra que a ocorrência de resistência a múltiplos antimicrobianos é comum entre elas (DIEKEMA *et al.*, 2001). Amostras ORSA isoladas dos Estados Unidos

são resistentes, em média, a três classes de antimicrobianos, além dos β -lactâmicos. Holmes & Jorgensen (2008), analisando amostras ORSA de bacteriemias, isoladas em um hospital americano entre 1999 e 2006, demonstraram que as amostras apresentavam taxas mais elevadas de resistência à eritromicina, ciprofloxacina e clindamicina. Dados europeus demonstram que, em geral, a resistência à oxacilina está associada a resistência cruzada às quinolonas, aminoglicosídeos e macrolídeos (FLUIT *et al.*, 2000). Um estudo conduzido por Teixeira e colaboradores, em 1995, analisando amostras ORSA isoladas de diversas regiões do Brasil, demonstrou que 70% delas eram resistentes a pelo menos nove classes antimicrobianos, incluindo os β -lactâmicos. Sadoyama & Gontijo Filho (2000) também mostraram que mais de 90% das amostras ORSA isoladas em um hospital de Uberlândia eram resistentes a pelo menos oito classes de antimicrobianos. No presente estudo, foram analisadas 100 amostras ORSA, isoladas de dois hospitais da cidade do Rio de Janeiro, frente a 12 antimicrobianos, além dos β -lactâmicos. Os resultados demonstraram taxas de resistência superiores a 90% para os antimicrobianos eritromicina, ciprofloxacina, clindamicina e gentamicina, confirmando os dados observados anteriormente. Taxas intermediárias foram verificadas para sulfametoxazol/trimetoprima, tetraciclina, cloranfenicol e rifampicina. A análise global mostrou que 64% das amostras ORSA apresentaram resistência a pelo menos seis dos 12 antimicrobianos, além de resistência aos β -lactâmicos, sendo 62,3% entre amostras do HNMD e 69,6% entre amostras do HCD. Esses resultados estão de acordo com dados do programa SENTRY que mostram que amostras ORSA brasileiras apresentam resistência, em média, a seis classes de antimicrobianos (DIEKEMA *et al.*, 2001).

Em contrapartida, o presente estudo também demonstrou que 27% das amostras ORSA apresentaram resistência a no máximo quatro antimicrobianos, 27,3% entre amostras do HNMD e 26,1% entre amostras do HCD, sendo duas delas resistentes apenas

aos β -lactâmicos. Nos últimos anos, amostras ORSA hospitalares com perfil aumentado de susceptibilidade aos antimicrobianos foram caracterizadas em vários países, demonstrando que tem havido uma emergência de novos perfis de susceptibilidade entre estas amostras (NAIMI *et al.*, 2001; VANDENESCH *et al.*, 2003; RIBEIRO *et al.*, 2007; NINMO *et al.*, 2006; TENOVER *et al.*, 2006; ROSSNEY *et al.*, 2007).

Seis tipos de SCCmec foram descritos até o momento (ITO *et al.*, 2003; OLIVEIRA, MILHEIRIÇO & DE LENCASTRE, 2006). Amostras carreando o cassete *mec* tipo I foram prevalentes nas primeiras amostras ORSA isoladas na década de 60 e geralmente se apresentavam resistentes apenas aos β -lactâmicos (CRISOSTOMO *et al.*, 2001), enquanto os SCCmec tipos II e III são cassetes que carregam diversos determinantes de resistência à outras classes de antimicrobianos e estão associados a amostras multirresistentes de origem hospitalar (ITO *et al.*, 2001; ITO *et al.*, 2003). No Brasil, estudos apontam a prevalência de amostras ORSA SCCmec III nos hospitais (AMARAL *et al.*, 2005; VIVONI *et al.*, 2006; DE MIRANDA *et al.*, 2007), resultados também verificados no presente estudo, que mostrou a prevalência desse cassete em 61% das amostras isoladas nos dois hospitais do Rio de Janeiro.

Ao contrário do observado em hospitais da América Latina e em alguns países da Europa para amostras tipo III (AIRES DE SOUZA *et al.*, 2001), nos hospitais dos Estados Unidos (MCDOUGAL *et al.*, 2003; KILIC *et al.*, 2006), Japão e Coreia (KO *et al.*, 2005) amostras carreando o SCCmec tipo II são prevalentes. No Brasil, apenas um estudo, conduzido por De Miranda e colaboradores (2007), apontou a presença de uma amostra carreando o SCCmec tipo II, isolada de um hospital universitário do Rio de Janeiro, em 2005. Outro estudo, realizado por Mombach Pinheiro Machado e colaboradores (2007), mostrou apenas 3% de amostras SCCmec tipo II em um hospital de Porto Alegre, RS, porém entre amostras de estafilococos coagulase-negativos. No presente estudo foram

observadas 15 (15%) amostras carreando esse cassete, 13 isoladas no HNMD, em 2004 e 2005, e duas no HCD, isoladas em 2006 e 2007. É provável que esse grande número de amostras ORSA tipo II detectado nos hospitais avaliados, seja decorrente do perfil de estudo utilizado, que avaliou a prevalência de amostras ORSA hospitalares. Além disso, os percentuais podem refletir o tipo de instituição avaliada e o perfil de pacientes atendidos.

Amostras carreando os SCCmec tipos IV e V foram inicialmente associadas a infecções de origem comunitária. No entanto, diversos estudos apontam a emergência de amostras SCCmec tipo IV em hospitais, inclusive no Brasil (TRINDADE *et al.*, 2005; GONZALEZ *et al.*, 2006; SEYBOLD *et al.*, 2006). Um estudo conduzido por Vivoni e colaboradores (2006), analisando 34 amostras ORSA, detectadas entre 1999 e 2000, em um hospital universitário do Rio de Janeiro, encontrou duas (5,9%) amostras SCCmec tipo IV naquela instituição. Recentemente, De Miranda e colaboradores (2007), ao avaliarem 38 amostras ORSA, isoladas em um hospital pediátrico do Rio de Janeiro, em 2005, encontraram um percentual semelhante, com apenas 5,3% de amostras tipo IV. No presente estudo, 24 amostras ORSA, 75% (18 amostras) delas isoladas no HNMD, entre 2004 e 2005, e 25% (6 amostras) no HCD, entre 2006 e 2007, continham esse cassete, números significativamente maiores do que aqueles encontrados nos estudos anteriores. Contudo, é possível que o tipo de hospital e de paciente envolvido, assim como a análise de amostras através de um estudo de prevalência, já justificado no parágrafo anterior, com coleta contínua de amostras, tenha favorecido uma melhor caracterização dessas taxas. Trindade e colaboradores, em 2005, também realizaram um estudo de prevalência de tipos SCCmec, porém apenas em amostras ORSA não multirresistentes oriundas de bacteriemias, e encontraram 12,6% de amostras tipo IV em um hospital de São Paulo.

A correlação entre o perfil de susceptibilidade antimicrobiana das amostras ORSA avaliadas no presente estudo com o tipo de SCCmec detectado mostrou que as amostras

tipo III apresentaram susceptibilidade apenas a poucas classes de antimicrobianos, além da vancomicina, teicoplanina e linezolida. Esses resultados também foram observados para amostras ORSA tipo III avaliadas em estudos anteriores (KIM *et al.*, 2006; VIVONI *et al.*, 2006; AMORIM *et al.*, 2007). Outros estudos têm demonstrado que amostras ORSA tipo II apresentam níveis intermediários de susceptibilidade, quando comparadas às amostras SCCmec III (KIM *et al.*, 2006; MORONEY *et al.*, 2007). Em nosso estudo, a análise das 15 amostras SCCmec tipo II detectadas mostrou resultados semelhantes. Ao contrário das amostras tipo III, essas apresentaram 100% de susceptibilidade a rifampicina, sulfametoxazol/ trimetoprima e tetraciclina. Contudo, a taxa de resistência a mupirocina (86,7%) foi a maior observada para este antimicrobiano entre todas as amostras ORSA avaliadas no presente estudo. Esse fato é de grande importância, visto que a mupirocina é, normalmente, utilizado na descolonização nasal de pacientes hospitalizados portadores de amostras ORSA (GIAMBIAGI DEMARVAL, DOS SANTOS & BASTOS, 2005).

Entre as 24 amostras SCCmec tipo IV analisadas, foram observadas taxas elevadas de susceptibilidade aos antimicrobianos em geral, incluindo gentamicina, rifampicina, sulfametoxazol/trimetoprima, tetraciclina e mupirocina. Taxas intermediárias foram encontradas para eritromicina, ciprofloxacina, cloranfenicol e clindamicina. Esses resultados confirmam dados anteriores, que demonstram que as amostras SCCmec IV apresentam altas taxas de susceptibilidade à grande parte das classes de antimicrobianos disponíveis (KILIC *et al.*, 2006; MORONEY *et al.*, 2007).

Apesar de amostras SCCmec IV não apresentarem um perfil de multirresistência, como apresentado pelas amostras tipo III, a aquisição de determinantes de resistência pode ocorrer como consequência da pressão seletiva exercida pelo uso de antimicrobianos. Nesse estudo, duas amostras SCCmec tipo IV, 833 e 829, isoladas no HNMD e HCD, respectivamente, apresentaram resistência a seis classes de antimicrobianos, além dos β -

lactâmicos, tendo a amostra 829 apresentado resistência inclusive a sulfametoxazol/trimetoprima, fato não observado nem entre amostras tipo II, e CMI para oxacilina de 256 µg/mL. Amostras tipo IV resistentes a pelo menos três classes de antimicrobianos, além dos β-lactâmicos, já têm sido observadas na literatura (AIRES DE SOUZA & DE LENCASTRE, 2003). Boyle-Vavra e colaboradores (2005) encontraram cerca de 60% de amostras ORSA SCCmec tipo IV e V resistentes a quatro ou mais classes de antimicrobianos, excetuando os antimicrobianos β-lactâmicos.

Diversos estudos apontam correlação importante entre amostras não multirresistentes SCCmec tipo IV e os níveis de resistência à oxacilina, demonstrando que grande parte delas apresenta baixos níveis de resistência a este antimicrobiano, com CMIs variando de 4 a 64 µg/mL (OKUMA *et al.*, 2002; FARIA *et al.*, 2005). A avaliação da CMI para oxacilina nas amostras ORSA incluídas no presente estudo e a posterior correlação com o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos e o com o tipo de SCCmec confirmaram estes dados, já que entre as 24 amostras ORSA tipo IV avaliadas, 23 (95,8%) apresentaram CMIs para oxacilina entre 8 e 64 µg/mL.

No presente estudo, a análise da CMI para oxacilina em 76 amostras dos tipos II e III mostrou que em 61 delas esta foi igual ou superior a 256 µg/mL. Dessas, 57 (91,9%) amostras continham o SCCmec tipo III, compatível com o observado na literatura (VIVONI *et al.*, 2006; LAMARO-CARDOSO *et al.*, 2007). Entre as 15 amostras carreando o SCCmec tipo II, 73,3% apresentaram CMI de 128 µg/mL para oxacilina, de acordo com o observado por Zaraket e colaboradores (2007), que ao analisarem a CMI para oxacilina entre amostras ORSA tipo II isoladas no Japão, observaram que essas apresentavam CMIs entre 128 e 256 µg/mL.

Estudos avaliando a susceptibilidade para vancomicina entre amostras ORSA têm apontado um aumento na CMI para este antimicrobiano. Wang e colaboradores (2006), ao

analisarem amostras ORSA, isoladas entre 2000 e 2004, nos Estados Unidos, encontraram apenas 19,9% de amostras apresentando CMI de 1 µg/mL em 2000 contra 79,9% de amostras em 2004. Steinkraus, White & Friedrich (2007), avaliando amostras ORSA isoladas de bacteriemias, no período de 2001 à 2005, também nos Estados Unidos, encontraram resultados semelhantes. Segundo definição do CLSI (2007), amostras de *S. aureus* apresentando CMIs para vancomicina menor ou igual a 2 µg/mL são consideradas susceptíveis. No entanto, alguns trabalhos demonstram que infecções causadas por amostras com CMIs entre 1 e 2 µg/mL podem apresentar menor resposta ao tratamento, resultando inclusive em relatos de falha terapêutica (SAKOULAS *et al.*, 2004; MOISE *et al.*, 2007). Desta forma, a emergência de amostras ORSA apresentando CMIs nesta faixa é de grande preocupação, principalmente em países em desenvolvimento, como o Brasil, onde a vancomicina se apresenta muitas vezes como a última opção de tratamento para infecções por amostras ORSA.

Com o propósito de verificar se o aumento na CMI para vancomicina relatado em outros países também ocorria em amostras ORSA brasileiras e se existiria alguma correlação entre características fenotípicas e moleculares de resistência, a CMI para este antimicrobiano foi determinada em todas as amostras do presente estudo. Os resultados demonstram que embora não exista associação entre os valores encontrados e o perfil de susceptibilidade ou tipo de cassete *mec* detectado, foi observado que 87% das amostras apresentaram CMI para vancomicina de 1 µg/mL. Três amostras, uma isolada no HNMD e duas no HCD, apresentaram CMI de 2 µg/mL. A amostra do HNMD, 559, isolada em 2004, apresentou susceptibilidade a praticamente todos os antimicrobianos, SCC*mec* IV e CMI para oxacilina de 16 µg/mL. Uma das amostras do HCD (amostra 829), isolada em outubro de 2006, foi resistente a seis antimicrobianos, apresentou SCC*mec* IV e elevada CMI para oxacilina (256 µg/mL). A outra amostra (970), isolada em fevereiro de 2007,

apresentou o SCCmec III, resistência frente a 7 classes de antimicrobianos e CMI para oxacilina de 64 µg/mL.

Apesar de inicialmente utilizada para estudo de amostras responsáveis por surtos hospitalares, a técnica de PFGE tem sido bastante utilizada para estudos epidemiológicos em geral. A utilização de outras técnicas moleculares, como MLST, associadas ao PFGE tem mostrado que praticamente 70% das amostras ORSA isoladas de diversas localidades pertencem a cinco clones epidêmicos principais, demonstrando serem estas linhagens de sucesso, pela capacidade de persistirem e espalharem-se inter e intracontinentes (OLIVEIRA, TOMASZ & DE LENCASTRE, 2002). No entanto, mais recentemente, estas mesmas técnicas também têm identificado outros clones que têm se mostrado prevalentes em algumas populações, mas foram inicialmente descritos apenas em poucos países. Nos Estados Unidos, clones prevalentes em infecções comunitárias, conhecidos como USA300 e USA400, têm sido amplamente descritos, não só no país de origem, como também recentemente na Europa e Brasil (TENOVER *et al.*, 2006; DE MIRANDA *et al.*, 2007; LARSEN *et al.*, 2007). Outros, conhecidos como EMRSA-15 e EMRSA-16 são prevalentes em hospitais europeus (MURCHAN *et al.*, 2004; JOHNSON, PEARSON & DUCKWORTH, 2005). Na Austrália, foram descritos diversos clones de origem comunitária pertencentes a genótipos distintos (COOMBS *et al.*, 2004).

No presente estudo, a diversidade genômica de 66 amostras ORSA foi analisada por PFGE, para determinação dos genótipos prevalentes. Entre elas, todas as 24 amostras SCCmec IV e as 15 SCCmec II foram analisadas. Entre as 61 amostras SCCmec tipo III, 27 (44%) foram selecionadas para análise por PFGE. A seleção foi realizada de acordo com a observação de similaridades entre elas em relação a características fenotípicas e moleculares de resistência, e de acordo com o período, o local e sítio de isolamento. Sítios de isolamento de maior relevância, como sangue, foram priorizados na seleção.

Entre as 27 amostras SCCmec III avaliadas apenas 3 genótipos foram encontrados (A, B e C), sendo 88,9% (24 amostras) pertencentes ao genótipo A, já descrito como prevalente em hospitais brasileiros (SANTOS *et al.*, 1999; OLIVEIRA *et al.*, 2001; SOARES *et al.*, 2001; AMARAL *et al.*, 2005).

Entre as 15 amostras SCCmec tipo II, também foi observada pouca diversidade clonal. Apenas três genótipos foram encontrados (J, L e M), sendo 12 (85,7%) amostras pertencentes ao genótipo J. As oito amostras do perfil genotípico J1 e a amostra pertencente ao perfil J2 apresentaram grande similaridade com o clone USA800 (SCCmec IV), também conhecido como clone pediátrico, enquanto as outras três amostras apresentando os perfis J3 (1 amostra) e J4 (2 amostras) mostraram perfis diferindo em apenas uma banda do perfil do clone conhecido como USA100 (SCCmec II), também denominado clone Nova York/Japão (MCDOUGAL *et al.*, 2003). O clone pediátrico foi primeiramente caracterizado em amostras ORSA isoladas de um hospital pediátrico em Portugal, na década de 90 (SÁ-LEÃO *et al.*, 1999). Neste caso, as amostras apresentavam o tipo IV de cassete *mec*. Depois o mesmo fato foi descrito em outras localidades, como outros países da Europa (PÉREZ-ROTH *et al.*, 2004), Estados Unidos (MCDOUGAL *et al.*, 2003) e América Latina (GOMES *et al.*, 2001). No Brasil, De Miranda e colaboradores (2007) encontraram amostras ORSA relacionadas a esse clone isoladas de Recife e Rio de Janeiro, porém também carreando o SCCmec IV. Apesar da grande maioria das amostras desse clone apresentar o cassete *mec* IV, amostras apresentando esse mesmo perfil de fragmentação por PFGE, porém com outros cassetes, como o tipo I, já foram observadas. Além disso, as amostras ORSA USA800 e USA100 apresentam pela técnica de MLST o mesmo ST-5 (ST, “sequence type”) o que poderia justificar a presença de amostras SCCmec tipo II e IV relacionadas ao mesmo clone USA800 (MCDOUGAL *et al.*, 2003).

Amostras com o perfil do clone pediátrico, mas apresentando cassete *mec* tipo II ainda não havia sido descrita na literatura.

O clone USA100 apresenta-se amplamente distribuído nos Estados Unidos (DA SILVA *et al.*, 2003; HUANG *et al.*, 2006), Japão (ZARAKET *et al.*, 2007) e Coréia (KO *et al.*, 2005). No Brasil existem dois estudos que demonstram a presença desse clone, no Rio de Janeiro. Em um deles, realizado por De Miranda e colaboradores (2007), apenas uma amostra, isolada em 2005, carreando o SCC*mec* tipo II, foi encontrada. Esse mesmo estudo demonstrou que os dois clones, USA800 e USA100, são relacionados. Outro trabalho realizado com amostras de colonização de profissionais de saúde de um hospital do Rio de Janeiro também encontrou amostras relacionadas ao clone USA100, porém apresentando o SCC*mec* IV (MELO *et al.*, 2004).

Uma amostra, 843, SCC*mec* tipo II, única representante do genótipo L, isolada no HNMD, apresentou perfil idêntico ao do clone USA600, SCC*mec* II associado a infecções nosocomiais nos Estados Unidos (MCDUGAL *et al.*, 2003). A amostra 840 (HNMD), também representante única do genótipo M, apresentou perfil idêntico ao do clone USA200, segundo clone tipo II prevalente em infecções hospitalares nos Estados Unidos (MCDUGAL *et al.*, 2003).

Os perfis de fragmentação apresentados pelas 24 amostras SCC*mec* tipo IV mostraram que há grande diversidade genômica entre elas. Foram encontrados seis genótipos diferentes: D, E, F, G, H e I. Dentre as 18 amostras desse tipo isoladas no HNMD, três genótipos foram encontrados (E, F e G), sendo 66,7% delas pertencentes ao genótipo F, enquanto entre as seis amostras tipo IV isoladas no HCD, foram detectados os seis genótipos descritos. Diversos autores já mostraram a diversidade genotípica que existe entre essas amostras ORSA tipo IV (OKUMA *et al.*, 2002; VANDENESCH *et al.*, 2003; COOMBS *et al.*, 2004; ROSSNEY *et al.*, 2007). A maior variabilidade genômica

apresentada por essas amostras pode ser em parte devido ao tamanho reduzido do cassete *mec* e, conseqüentemente, à maior mobilidade e capacidade de ser transferido entre amostras (AIRES de SOUZA & DE LENCASTRE, 2003).

A observação dos diferentes genótipos entre amostras tipo IV, no presente estudo, mostrou que as mesmas apresentam similaridade com vários genótipos de amostras ORSA SCC*mec* IV já descritos e provenientes de diversas regiões do mundo (JOHNSON, PEARSON & DUCKWORTH, 2005; MCDUGAL *et al.*, 2003; MURCHAN *et al.*, 2004; PÉREZ-ROTH *et al.*, 2004; GOSBELL *et al.*, 2006). O genótipo F, dominante entre essas amostras foi similar ao clone USA400, tendo os subtipos F1 e F2, apresentado perfis idênticos a esse genótipo, enquanto o subtipo F3 apresentou apenas uma banda de diferença (MCDUGAL *et al.*, 2003). O clone USA400 freqüentemente apresenta a PVL e tem sido associado nos Estados Unidos a infecções de origem comunitária, inclusive com casos fatais (CDC, 1999; BRATU *et al.*, 2005; TENOVER *et al.*, 2006). O genótipo E, segundo prevalente entre as amostras tipo IV, foi relacionado ao clone USA800 (pediátrico), tendo a amostra 1008, subtipo E3, apresentado perfil idêntico ao desse clone. As duas amostras que apresentaram o genótipo D foram geneticamente similares, diferindo em apenas duas ou três bandas, ao clone descrito como da Oceania, um dos clones dominantes entre amostras ORSA não multirresistentes na Austrália (GOSBELL *et al.*, 2006). O representante do genótipo G, amostra 1007, isolada do HCD, foi relacionada ao clone reconhecido como EMRSA-15, SCC*mec* tipo IV, amplamente distribuído em países da Europa (JOHNSON, PEARSON & DUCKWORTH, 2005; MURCHAN *et al.*, 2004; PÉREZ-ROTH *et al.*, 2004). Os outros dois genótipos encontrados (H e I) observados em duas amostras diferentes, isoladas no HCD, apresentaram perfis de fragmentação que não foram relacionados a clones descritos na literatura.

A emergência de amostras ORSA tipo IV em hospitais pode estar relacionada a vantagens dessas amostras com relação às demais. BABA e colaboradores (2002) em estudo realizado com amostras ORSA tipo IV observaram que essas possuem taxas de crescimento maiores. Isto poderia compensar o baixo perfil de resistência apresentado por essas amostras (AIRES de SOUZA & DE LENCASTRE, 2003). Além disso, essas amostras estão comumente associadas à produção adicional de alguns fatores de virulência, em especial a PVL (LINA *et al.*, 1999; DUFOUR *et al.*, 2002; VANDENESCH *et al.*, 2003). Todas as amostras incluídas no estudo foram analisadas quanto à presença dos genes *luKS-PV* e *luKF-PV*, que codificam a PVL e gene *hla*, que codifica a α -hemolisina. O gene *hla* foi observado em todas as 100 amostras ORSA analisadas, confirmando resultados que apontam a alta prevalência dele em *S. aureus* (BHAKDI & TRANUM-JENSEN, 1991; MONECKE *et al.*, 2007). A PCR dos genes da PVL mostrou a presença desses em três (3%) amostras clínicas. Esse resultado está de acordo com estudos anteriores, que demonstram que em amostras ORSA hospitalares a prevalência desses genes é baixa (KILIC *et al.*, 2006; ROSSNEY *et al.*, 2007). Contudo, como todas as amostras PVL positivas apresentavam o cassete *mec IV*, a prevalência desses genes entre as 24 amostras desse tipo se mostrou quatro vezes maior (12,5%).

A avaliação da clonalidade das três amostras positivas para os genes da PVL demonstrou que duas delas, uma isolada em 2004 no HNMD e a outra isolada no HCD, em 2007, foram pertencentes ao mesmo genótipo, designado como D, e apresentaram 82% de similaridade entre elas. Essas amostras foram similares ao genótipo da Oceania, também descrito previamente como carreador dos genes da PVL (GOSBELL *et al.*, 2006). A outra amostra positiva para os genes da PVL, 559, isolada no HNMD, em 2004, foi agrupada no genótipo E, que mostrou perfil de fragmentação compatível com o clone USA800 (clone pediátrico), descrito, em estudos anteriores, como PVL negativo (HARBARTH *et al.*,

2005; TENOVER *et al.*, 2006). As amostras relacionadas ao clone da Oceania foram isoladas de em adulto jovem no HNMD, e de uma criança no HCD. Ambos foram admitidos nos respectivos hospitais com infecções cutâneas comunitárias. Nenhum deles apresentou fatores de risco para aquisição de infecções associadas a cuidados médicos, segundo os critérios do CDC (2005) e de Millar e colaboradores (2007). A amostra relacionada ao clone pediátrico foi isolada de um paciente apresentando fatores de risco para aquisição de amostras ORSA, como: histórico de hospitalização prévia, uso de hemodiálise e utilização prévia de antimicrobianos. Essa amostra foi classificada como sendo de origem hospitalar. Nenhum dos pacientes evoluiu para óbito.

Os resultados desse estudo demonstram que, assim como já descrito em diversos países, também no Brasil está ocorrendo uma alteração na epidemiologia de infecções hospitalares por amostras ORSA, com a substituição de amostras multirresistentes pertencentes a um número limitado de clones epidêmicos por amostras apresentando maior diversidade fenotípica, maior susceptibilidade e relacionadas a infecções de origem comunitária. A porcentagem de amostras com esse perfil (24%), carreando o SCCmec IV, é maior do que o já relatado em outros estudos nacionais. Os dois hospitais estudados admitem pacientes com perfis bastante distintos, já que um deles é um hospital militar público (HNMD), com um grande número de leitos, localizado na zona norte do Rio de Janeiro e o outro um hospital particular (HCD), com um número reduzido de leitos, localizado na zona sul do Rio de Janeiro. Ainda assim, foi possível observar que tais alterações epidemiológicas têm ocorrido em ambas as instituições avaliadas. Apesar disso, a análise molecular das amostras tipo IV demonstrou que aquelas amostras isoladas no HCD apresentaram maior diversidade genômica, enquanto no HNMD houve claramente a disseminação de um genótipo entre vários pacientes, o que pode ser, em parte, reflexo do número de pacientes atendidos e do tipo de atendimento hospitalar dispensado.

6 CONCLUSÕES

- Entre as 100 amostras ORSA analisadas e isoladas de dois hospitais no Rio de Janeiro, 64% delas apresentaram resistência a pelo menos seis classes de antimicrobianos, além dos β -lactâmicos, sendo 62,3% entre amostras do HNMD (hospital público) e 69,6% entre amostras do HCD (hospital privado). Em contrapartida, resistência a no máximo quatro antimicrobianos foi vista em 27% das amostras, 27,3% entre amostras do HNMD e 26,1% entre amostras do HCD.
- A tipagem do SCCmec mostrou que 61% de todas as amostras ORSA continham o SCCmec tipo III, 24% o SCCmec IV e 15% o SCCmec II. Esses percentuais foram similares aos encontrados em cada um dos hospitais. Em geral, as amostras tipo III apresentaram resistência a pelo menos seis antimicrobianos, enquanto em 75% das amostras tipo IV a resistência foi de até no máximo quatro classes de antimicrobianos.
- As amostras tipo II apresentaram fenótipo de susceptibilidade intermediária a observada para as amostras dos tipos SCCmec III e IV.
- A detecção da CMI para oxacilina mostrou que 62% das amostras ORSA foram inibidas em concentração igual ou superior a 256 $\mu\text{g/mL}$, sendo a grande maioria (93,4%) de amostras SCCmec tipo III. Por outro lado, 25% delas apresentaram CMIs entre 8 e 64 $\mu\text{g/mL}$, sendo 96% delas pertencentes ao SCCmec IV. A maioria

(87%) das amostras ORSA avaliadas apresentou CMI para vancomicina de 1 µg/mL, enquanto somente três amostras apresentaram CMI de 2 µg/mL.

- Entre as 66 amostras ORSA avaliadas por PFGE foi observada pouca variabilidade genômica, em especial entre amostras dos tipos II e III. Contudo, entre as 24 amostras SCCmec tipo IV foram caracterizados 11 perfis genotípicos em seis genótipos diferentes. Entre as 18 amostras do HNMD, o genótipo F, relacionado ao clone USA400 foi observado em 66,7% das amostras, enquanto o genótipo E, relacionado ao clone USA800 (clone pediátrico) foi observado em 27,8% delas. Maior diversidade foi observada entre as seis amostras tipo IV isoladas no HCD, que apresentaram seis genótipos diferentes.
- Todas as amostras ORSA continham o gene *hla*, que codifica a α-hemolisina, enquanto em apenas três (3%) amostras foi detectada a presença dos genes *lukS-PV* e *lukF-PV*, que codificam a PVL. As amostras ORSA positivas para os genes da PVL foram isoladas de três pacientes diferentes, tendo dois deles apresentado infecções de origem comunitária e um infecção de origem hospitalar.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AIRES DE SOUSA, M., DE LENCASTRE, H. 2003. Evolution of sporadic isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in hospitals and their similarities to isolates of community-acquired MRSA. *J. Clin. Microbiol.* 41: 3806-3815.

AMARAL, M.M., COELHO, L.R., FLORES, R.P., SOUZA, R.R., SILVA-CARVALHO, M.C., TEIXEIRA, L.A., FERREIRA-CARVALHO, B.T., FIGUEIREDO, A.M.S. 2005. The predominant variant of the Brazilian epidemic clonal complex of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* has an enhanced ability to produce biofilm and to adhere to and invade airway epithelial cells. *J. Infect. Dis.* 192: 801-810.

AMORIM, M.L., FARIA, N.A., OLIVEIRA, D.C., VASCONCELOS, C., CABEDA, J.C., MENDES, A.C., CALADO, E., CASTRO, A.P., RAMOS, M.H., AMORIM, J.M., DE LENCASTRE, H. 2007. Changes in the clonal nature and antibiotic resistance profiles of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with spread of the EMRSA-15 clone in a tertiary care Portuguese hospital. *J. Clin. Microbiol.* 45: 2881-2888.

ARCHER, G.L., NIEMEYER, D.M., THANASSI, J.A., PUCCI, M.J. 1994. Dissemination among *Staphylococci* of DNA sequences associated with methicillin resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38: 447-454.

ARCHER, G.L. 1998. *Staphylococcus aureus*: a well-armed pathogen. *Clin. Infect. Dis.* 26: 1179-1181.

ARCHER, G.L. 2000. *Staphylococcus epidermidis* and other coagulase-negative staphylococci. In: Principles and practice of infectious diseases. Mandall, G. L.; Bennett, J. E. & Dolin, R. (eds). 8th. ed. Churchill Livingstone, New York, N.Y.

ARTHUR, M., COURVALIN, P. 1993. Genetics and mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37:1563-71.

BABA, T., TAKEUCHI, F., KURODA, M., YUZAWA, H., AOKI, K., OGUCHI, A., NAGAI, Y., IWAMA, N., ASANO, K., NAIMI, T. 2002. Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. *Lancet.* 359: 1819-1827.

BANNERMAN, T.L., PEACOCK, S.J. 2007. *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and other catalase-positive cocci. In: Manual of clinical microbiology, Murray, P.R., Barron, E.J., Jorgensen, J.H., Landry, M.L., Pfaller, M.A. (eds), 9th ed, ASM Press. Washington, DC. p.390-410.

BELL, J.M., TURNIDGE, J.D. & SENTRY PARTICIPANTS. 2002. High prevalence of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from hospitalized patients in Asia-Pacific and South Africa: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1998-1999. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 879-881.

BERGLUND, C., MÖLLING, P., SJÖBERG, L., SÖDERQUIST, B. 2004. Predominance of staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) type IV among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a Swedish county and presence of unknown SCC*mec* types with Panton-Valentine leukocidin genes. *Clin. Microbiol. Infect.* 11: 447- 456.

BERGOGNE-BEREZIN, E. 1999. Current guidelines for the treatment and prevention of nosocomial infections. *Drugs.* 58: 51- 67.

BHAKDI, S., TRANUM-JENSEN, J. 1991. Alpha-Toxin of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol. Rev.* 55: 733-751.

BIERBAUM, G., FUCHS, K. LENZ, W., SZEKAT, C., SAHL., H-G. 1999. Presence of *Staphylococcus aureus* with Reduced Susceptibility to Vancomycin in Germany. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 18: 691-696.

BLOT, S.I., VANDEWOUDE, K.H., HOSTE, E.A., COLARDYN, F.A. 2002. Outcome and attributable mortality in critically ill patients with bacteremia involving methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Arch. Intern. Med.* 162: 2229-2235.

BOHACH, G.A.; FAST, D.J.; NELSON, R.D., SCHILIEVERT, P.M. 1990. Staphylococcal and streptococcal pyrogenic toxins involved in toxic shock syndrome and related illnesses. *Critical Rev. Microbiol.* 17: 251-271.

BOHACH, G.A., DINGES, M.M., MITCHELL, D.T., OHLENDORF, D.H., SCHLIEVERT, P.M. 1997. Exotoxins. In: The Staphylococci in human disease, Crossley, K.B. & Archer, G.L.(eds). Churchill Livingstone. New York, USA. p. 83-111.

BOYCE, J.M. 1997. Epidemiology and prevention of nosocomial infection. In: The Staphylococci in human disease, Crossley, K.B. & Archer, G.L.(eds). Churchill Livingstone. New York, USA. p. 309-329.

BOYLE-VAVRA, S., ERESHEFSKY, B., WANG, C.C., DAUM, R.S. 2005. Successful multiresistant community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineage from Taipei, Taiwan, that carries either the novel Staphylococcal chromosome cassette *mec* (SCC*mec*) type VT or SCC*mec* type IV. *J. Clin. Microbiol.* 43: 4719-4730.

BRATU, S., ERAMO, A., KOPEC, R., COUGHLIN, E., GHITAN, M., YOST, R., CHAPNICK, E.K., LANDMAN, D., QUALE, J. 2005. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospital nursery and maternity units. *Emerg. Infect. Dis.* 11: 808-813.

CALLEGAN, M.C., ENGEL, L.S., HILL, J.M., O'CALLAGHAN, R.J. 1994. Corneal virulence of *Staphylococcus aureus*: roles of alpha-toxin and protein A in pathogenesis. *Infect. Immun.* 62: 2478-2482.

CASEY, A.L., LAMBERT, P.A., ELLIOT, T.S.J. 2007. Staphylococci. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 29: 23-32.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). 1997. *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin – United States. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 46: 765-766.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). 1999. Four pediatric deaths from community acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* - Minnesota and North Dakota, 1997-1999. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 48: 707-710.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). 2001. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/drugresistance/healthcare/problem.htm>> Acesso em 28/03/2007.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). 2002a. *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin - United States. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 51: 565-567.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). 2002b. Public Health Dispatch: Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* – Pennsylvania. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 51: 902.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). 2003. Public Health Dispatch: Outbreaks of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin infections - Los Angeles County, California, 2002-2003. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 52: 88.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). 2005. Disponível em: <http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/ar_mrsa_ca_clinicians.html#11> Acesso em 10/02/2008.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). 2006. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection among healthy newborns - Chicago and Los Angeles County, 2004. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 55: 329-332.

CHAMBERS, H.F. 1993. Detection of methicillin-resistant staphylococci. *Infect. Dis. Clin. North. Am.* 7: 425-433.

CHAMBERS, H.F. 2001. The Changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? *Emerg. Infect. Dis.* 7: 178-182.

CHANG, S., SIEVERT, D.M., HAGEMAN, J.C, BOULTON, M.L., TENOVER, F.C., DOWNES, F.P., SHAH, S., RUDRIK, J.T., PUPP, G.R, BROWN, W.J., CARDO, D., FRIDKIN, S.K. & VANCOMYCIN-RESISTANT *Staphylococcus aureus* INVESTIGATIVE TEAM. 2003. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the *vanA* resistance gene. *N. Engl. J. Med.* 348: 1342-1347.

CHEN, Y.Y., CHOU, Y.C., PESUS CHOU, P. 2005. Impact of nosocomial infection on cost of illness and length of stay in intensive care units. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* 26: 281-287.

CHONGTRAKOOL, P., ITO, T., MA, X.X., KONDO, Y., TRAKULSOMBOON, S., TIENSASITORN, C., JAMKLANG, M., CHAVALIT, T., SONG, J-H., HIRAMATSU, K. 2006. Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) typing of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated in 11 asian countries: a proposal for a new nomenclature for SCC*mec* elements. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50: 1001-1012.

CLANCY, M.J., GRAEPLER, A., BREESE, P.E., PRICE, C.S., BURMAN, W.J. 2005. Widespread emergence of methicillin resistance in community-acquired *Staphylococcus aureus* infections in Denver. *South. Med. J.* 98: 1069-1075.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE – CLSI 2003a. *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test*. Approved standards: M2-A8. Wayne, Pennsylvania, USA.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE - CLSI 2003b. *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically*. Approved standards: M7-A6. Wayne, Pennsylvania, USA.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE - CLSI 2007. *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing*. Approved standards: M100-S17. Wayne, Pennsylvania, USA.

COOMBS, G.W., NIMMO, G.R., BELL, J.M., HUYGENS, F., O'BRIEN, F.G., MALKOWSKI, M.J., PEARSON, J.C., STEPHENS, A.J., GIFFARD, P.M. & THE AUSTRALIAN GROUP FOR ANTIMICROBIAL RESISTANCE. 2004. Genetic diversity among community methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains causing outpatient infections in Australia. *J. Clin. Microbiol.* 42: 4735-4743.

COURVALIN, P. 2006. Vancomycin resistance in gram-positive cocci. *Clin. Infect. Dis.* 42: 25-34.

CRISOSTOMO, M.I., WESTH, H., TOMASZ, A., CHUNG, M., OLIVEIRA, D.C., DE LENCASTRE, H. 2001. The evolution of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: similarity of genetics backgrounds in historically early methicillin-susceptible and resistant isolates and contemporary epidemic clones. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98: 9865-9870.

CRUM, N.F., LEE, R.U., THORNTON, S.A., STINE, O.C., WALLACE, M.R., BARROZO, C., KEEFER-NORRIS, A., JUDD, S., RUSSEL, K.L. 2006. Fifteen-year study of the changing epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Am. J. Med.* 119: 943-951.

CUI, L., LIAN, J.Q., NEOH, H.M., REYES, E., HIRAMATSU, K. 2005. DNA microarray-based identification of genes associated with glycopeptide resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 49: 3404-3413.

DA SILVA, M.V.S., SILVA-CARVALHO, M.C., WISPLINGHOFF, H., HALL, G.O., TALLENT, S., WALLACE, S., EDMOND, M.B., FIGUEIREDO, A.M.S., WENZEL, R.P. 2003. Clonal spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a large geographic area of the United States. *J. Hosp. Infect.* 53: 103-110.

DE MIRANDA, O.P., SILVA-CARVALHO, M.C., RIBEIRO, A., PORTELA, F., CORDEIRO, R.P., CAETANO, N., VIDAL, C.F., FIGUEIREDO, A.M.S. 2007. Emergence in Brazil of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates carrying SCCmec IV that are related genetically to the USA800 clone. *Clin Microbiol Infect.* 13: 1165-1172.

DE SOUZA, M.A., SANCHES, S., FERRO, M.L., VAZ, M.J., SARAIVA, Z., TENDEIRO, T., SERRA, J., DE LENCASTRE, H. 1998. Intercontinental spread of a multidrug-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone. *J. Clin. Microbiol.* 36: 2590-2596.

DERESINSKI, S. 2005. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: An evolutionary, epidemiologic, and therapeutic odyssey. *Clin. Infect. Dis.* 40: 562-73.

DIEKEMA, D.J., PFALLER, M.A., SCMITZ, F.J., SMAYEVSKY, J., BELL, J., JONES, R.N., BEACH, M. & SENTRY GROUP. 2001. Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific Region for the SENTRY antimicrobial surveillance program, 1997-1999. *Clin. Infect. Dis.* 32: 114-132.

DIETRICH, D.W., AULD, D.B., MERMEL, L.A. 2004. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in southern New England Children. *Pediatrics.* 113: 347-352.

DINGES, M.M., ORWIN, P. M., SCHLIEVERT, P.M. 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Rev.* 13: 16-34.

DOMINGUEZ, M. A., DE LENCASTRE, H., LINARES, J., TOMAZS, A. 1994. Spread and maintenance of a dominant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clone during an outbreak of MRSA disease in a Spanish hospital. *J. Clin. Microbiol.* 32: 2081-2087.

DUFOUR, P., GILLET, Y., BES, M., LINA, G., VANDENESCH, F., FLORET, D., ETIENNE, J., RICHEL, H. 2002. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in France: emergence of a single clone that produces Pantón-Valentine Leukocidin. *Clin. Infect. Dis.* 35: 819-824.

DUMITRESCU, O., BOISSET S., BES M., BENITO Y., REVERDY M.E., VANDENESCH F., ETIENNE J., LINA G. 2007. Effect of antibiotics on *Staphylococcus aureus* producing Pantón Valntine leukocidin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51: 1515-1519.

EL FAR, F., MARINO, C.G.J., MEDEIROS, E.A.S. 2001. The organization of hospital infections control committees and their importance in Brazil. *Braz. J. Infect. Dis.* 5: 290-293.

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

ENRIGHT, M.C. 2003. The evolution of a resistant pathogen – the case of MRSA. *Curr. Opin. Pharmacol.* 3: 474 - 479.

EUROPEAN ANTIMICROBIAL RESISTANCE SURVEILLANCE SYSTEM (EARSS). 2005. Disponível em: < <http://www.rivm.nl/earss/database.html> > Acesso em: 08/03/2007.

EUZÉBY, J.P. 2008. List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature - Genus *Staphylococcus*. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html>> Acesso em: 11 /01/08.

FABBRO-PERAY, P., SOTTO, A., DEFEZ, C., CAZABAN, M., MOLINARI, L., PINÈDE, M., MAHAMAT, A., DAURÈS, J.P. 2007. Mortality attributable to nosocomial infection: a cohort of patients with and without nosocomial infection in a French University Hospital. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* 28: 265-272.

FARIA, N.A., OLIVEIRA, D.C., WESTH, H., MONNET, D.L., LARSEN, A.R., SKOV, R., DE LENCASTRE, H. 2005. Epidemiology of emerging methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Denmark: a nationwide study in a country with low prevalence of MRSA infection. *J. Clin. Microbiol.* 43: 1836-1842.

FENG, Y., CHEN, C.J., SU, L.H., HU, S., YU, J., CHIU, C.H. 2007. Evolution and pathogenesis of *Staphylococcus aureus*: lessons learned from genotyping and comparative genomics. *FEMS Microbiol. Rev.* 32: 23-37.

FERNANDES, A.T.; FURTADO, J.J.D.; PORFÍRIO, F.M.V., CAVALCANTE, N.J.F. 2000. Infecção Hospitalar da Corrente Sanguínea. In: Fernandes, A.T. (ed.) *Infecção Hospitalar e suas Interfaces na Área de Saúde*. Vol.: 1. ed. Atheneu. Rio de Janeiro - RJ, Brasil, p. 580-606.

- FLUIT, A.C., JONES, M.E., SCHMITZ, F.J., ACAR, J., GUPTA, R., VERHOEF, J. 2000. Antimicrobial susceptibility and frequency of occurrence of clinical blood isolates in Europe from the SENTRY antimicrobial surveillance program, 1997 and 1998. *Clin. Infect. Dis.* 30: 454-460.
- FOSTER, T.J. 2005. Immune evasion by Staphylococci. *Nature*. 3: 948-958.
- FRANCIS, J.S., DOHERTY, M.C., LOPATIN, U., JOHNSTON, C.P., SINHA, G., ROSS, T., CAI, M., HANSEL, N.N., PERL, T., TICEHURST, J.R., CARROL, K., THOMAS, D.L., NUERMBERGER, E., BARTLETT, J.G. 2005. Severe community-onset pneumonia in healthy adults caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the Panton-Valentine leukocidin genes. *Clin. Infect. Dis.* 40: 100-107.
- GARCÍA-MARTÍN, M., LARDELLI-CLARET, P., JIMÉNEZ-MOLEÓN, J.J., BUENO-CAVANILLAS, A., LUNA-DEL-CASTILLO, J.D., GÁLVEZ-VARGAS, R. 2001. Proportion of hospital deaths potentially attributable to nosocomial infection. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* 22: 708 -714.
- GEROGIANNI, I., MPATAVANIS, G., GOURGOULIANIS, K., MANIATIS, A., IRIS SPILIOPOULOU, I., PETINAKI, E. 2006. Combination of staphylococcal chromosome cassette SCCmec type V and Panton-Valentine leukocidin genes in a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* that caused necrotizing pneumonia in Greece. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 56: 213-216.
- GIAMBIAGI DEMARVAL, M., DOS SANTOS, K.R.N., BASTOS, M.C.F. 2005. Mupirocin resistance: our experience in multiresistant staphylococcal strains isolated in Brazil. *Res. Adv. In Microbiology.* 5: 17-25.
- GILLET, Y., ISSARTEL, B., VANHEMS, P., FOURNET, J.C., LINA, G., BES, M., VANDENESCH, F., PIÉMONT, Y., BROUSSE, N., FLORET, D., ETIENE, J. 2002. Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. *Lancet.* 359: 353-359.
- GOMES, A.R., SANCHES, I.S., AIRES DE SOUSA, M., CASTAÑEDA, E., DE LENCASTRE, H. 2001. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Colombian hospitals: dominance of a single unique multidrug-resistant clone. *Microbiol. Drug Resist.* 7: 23-32.
- GONZALEZ, B.E., RUEDA, A.M., SHELBURNE, S.A. 3rd, MUSHER, D.M., HAMILL, R.J., HULTEN, K.G. 2006. Community-associated strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as the cause of healthcare-associated infection. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* 27: 1051-1056.

- GOSBELL, I.B., BARBAGIANNAKOS, T., NEVILLE, S.A., MERCER, J.L., VICKERY, A.M., O'BRIEN, F., COOMBS, G.W., MALKOWSKI, M.J., PERASONS, J.C. 2006. Non-multiresistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia in Sidney, Austrália: emergence of EMRSA-15, Oceania, Queensland and Western Australian MRSA strains. *Pathology*. 38: 239-244.
- HARBARTH, S., FRANÇOIS, P., SHRENZEL, J., FANKHAUSER-RODRIGUEZ, C., HUGONNET, S., KOESSLER, T., HUYGHE, A., PITTET, D. 2005. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Switzerland. *Emerg. Infect. Dis.* 11: 962-965.
- HEROLD, B.C., IMMERGLUCK, L.C., MARANAM, M.C., LAUDERDALE, D.S., GASKIN, R.E., BOYLE-VAVRA, S., LEITCH, C.D., DAUM, R.S. 1998. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children with no identified predisposing risk. *JAMA*. 278: 593-598.
- HILDEBRAND, A., POHL, M., BHAKDI, S. 1991. *Staphylococcus aureus* α -Toxin: dual mechanism of binding to target cells. *J. Biol. Chem.* 266: 17195-17200.
- HIRAMATSU, K., HANAKI, H., INO, T., YABUTA, K., OGURI, T., TENOVER, F.C. 1997. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J. Antimicrob. Chemother.* 40: 135-136.
- HIRAMATSU, K. 2001. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance. *Lancet Infect. Dis.* 1: 147-155.
- HIRAMATSU, K., CUI, L., KURODA, M., ITO, T. 2001. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* 9: 486-493.
- HOLDEN, M.T.G., FEIL, E.J., LINDSAY, J.A., PEACOCK, S.J., DAY, N.P.J., MARK C. ENRIGHT, M.C., FOSTER, T.J., MOORE, C.E., HURST, L., ATKIN, R., BARRON, A., BASON, N., BENTLEY, S.D., CHILLINGWORTH, C., CHILLINGWORTH, T., CHURCHER, C., CLARK, L., CORTON, C., CRONIN, A., DOGETT, J., DOWD, L., FELTWELL, T., HANCE, Z., HARRIS, B., HAUSER, H., HOLROYD, S., JAGELS, K., JAMES, K. D., LENNARD, N., LINE, A., MAYES, R., MOULE, S., MUNGALL, K., ORMOND, D., QUAIL, M.A., RABBINOWITSCH, E., RUTHERFORD, K., SANDERS, M., SHARP, S., SIMMONDS, M., STEVENS, K., WHITEHEAD, S., BARRELLS.G., SPRATT, B.G., PARKHILL, J. 2004. Complete genomes of two clinical *Staphylococcus aureus* strains: Evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 101: 9786-9791.
- HOLMES, R.L., JORGENSEN, H. 2008. Inhibitory activities of 11 antimicrobial agents and bactericidal activities of vancomycin and daptomycin against invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates obtained from 1999 through 2006. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52: 757-760.

HUANG, H., FLYNN, N.M., KING, J.H., MONCHAUD, C., MORITA, M., COHEN, S.H. 2006. Comparisons of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and hospital-associated MRSA infections in Sacramento, California. *J. Clin. Microbiol.* 44: 2423-2427.

HUEBNER, J., GOLDMANN, D.A. 1999. Coagulase-negative staphylococci: role as pathogens. *Annu. Rev. Med.* 50: 223-236.

ITO, T., KATAYAMA, Y., HIRAMATSU, K. 1999. Cloning and nucleotide sequence determination of the entire *mec* DNA of pre-methicillin resistant *Staphylococcus aureus* N315. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 1449-1458.

ITO, T., KATAYAMA, Y., ASADA, K., MORI, N., TSUTSUMIMOTO, K., TIENSATORN, C., HIRAMATSU, K. 2001. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 1323-1336.

ITO, T., OKUMA, K., MA, X.X., YUZAMA, H., HIRAMATSU, K. 2003. Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. *Drug Resist. Updat.* 6: 41-52.

ITO, T., MA, X.X., TAKEUCHI, F., OKUMA, K., YUZAWA, H., HIRAMATSU, K. 2004. Novel type V staphylococcal cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccr*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48: 2637-2651.

JARLOV, J.O. 1999. Phenotypic characteristics of coagulase-negative staphylococci: typing and antibiotic susceptibility. *Acta. Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* 107: 1-42.

JOHN, J.F., BARG N.L. 1996. *Staphylococcus aureus*. In: *Hospital Epidemiology and Infection Control*. Mayhall, C.G. (ed.) 1st ed. Williams & Wilkins Company, Baltimore, USA p. 271-289.

JOHNSON, A.P., PEARSON, A., DUCKWORTH, G. 2005. Surveillance and epidemiology of MRSA bacteraemia in the UK. *J. Antimicrob. Chemother.* 56: 455-462.

JOHNSON, L.B., SARAVOLATZ, L.D. 2005. Community acquired MRSA: current epidemiology and management issues. *Infect. Med.* 22: 16-20.

KANEKO, J., KAMIO, Y. 2004. Bacterial two-component and hetero-heptameric pore-forming cytolytic toxins: Structures, pore-forming mechanism and organization of the genes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68: 981-1003.

KANTZANO, M., TASSIOS, P.T., TSELINI-KOTSOVILI, A., LEGAKIS, N.J., VATAPOULOS, A. 1999. Reduced susceptibility to vancomycin of nosocomial isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 43: 729-731.

KATAYAMA, Y., ITO T., HIRAMATSU, K. 2000. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 1549-1555.

KAZAKOVA, S.V., HAGEMAN, J.C., MATAVA, M., SRINIVASAN, A., PHELAN, L., GARFINKEL, B., BOO, T., MCALLISTER, S., ANDERSON, J., JENSEN, B., DODSON, D., LONSWAY, D., MCDOUGAL, L.K., ARDUINO, M., FRASER, V.J., KILLGORE, G., TENOVER, F.C., CODY, S., JERNIGAN, D.B. 2005. A clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among professional football players. *N. Engl. J. Med.* 352: 468-75.

KILIC, A.; LI, H.; STRATON, C.W., TANG, Y-W. 2006. Antimicrobial susceptibility patterns and staphylococcal cassette chromosome *mec* types of, as well as Panton-Valentine leukocidin occurrence among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from children and adults in middle Tennessee. *J. Clin. Microbiol.* 44: 4436- 4440.

KIM, J.S., SONG, W., KIM, H.S., CHO, H.C., LEE, K.M., CHOI, M.S., KIM, E.C. 2006. Association between the methicillin resistance of clinical isolates of *Staphylococcus aureus*, their staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) subtype classification, and their toxin gene profiles. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 56: 289-295.

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

KO, K.S., LEE, J.Y., SUH, J.Y., OH, W.S, PECK, K.R., LEE, N.Y., SONG, J.H. 2005. Distribution of major genotypes among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Asian countries. *J. Clin. Microbiol.* 43: 421-426.

KOLLEF, M.H. 2000. Inadequate antimicrobial treatment: an important determinant of outcome for hospitalized patients. *Clin. Infect. Dis.* 31: 131-138.

KREISWIRTH, B., KORNBLUM, J., ARBEIT, R.D., EISNER, W., MASLOW, J.N., MCGEER, A., LOW, D.E., NOVICK, R.P. 1993. Evidence for a clonal origin of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Science.* 259: 227-230.

LAMARO-CARDOSO, J., CASTANHEIRA, M., DE OLIVEIRA, R.M., E SILVA, S.A., PIGNATARI, A.C., MENDES, R.E, PIMENTA, F.C., ANDRADE, A.L. 2007. Carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children in Brazil. *Diagn. Microbiol. Infect Dis.* 57: 467- 470.

LARSEN, A., STEGGER, M., GOERING, R., SØRUM, M., SKOV, R. 2007. Emergence and dissemination of the methicillin resistant *Staphylococcus aureus* USA300 clone in Denmark (2000-2005). *Euro Surveill.* 12. Epub ahead of print.

LEE, C.Y., LEE, J.C. 2000. Staphylococcal capsule. In: *Gram-Positive Pathogens*. Fischetti, V.A.; Novick, R.P.; Ferretti, J.J.; Portnoy, D.A. & Rood, J.I. (eds), 1st edition. ASM Press, Washington, D.C., USA. p. 361-366.

LINA, G., PIÉMONT, Y., GODAIL-GAMOT, F., BES, M., PETER, M.O., GAUDUCHON, V., VANDENESH, F., ETIENNE, J. 1999. Involvement of Panton-Valentine leukocidin producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin. Infect. Dis.* 29: 1128-32.

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

LIVERMORE, D.M. 2003. Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. *Clin. Infect. Dis.* 36: 11-23.

LOIR, Y.L., BARON, F., GAUTIER, M. 2003. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet. Mol. Res.* 2: 63-76.

LOWY, F.D. 1998. Medical Progress: *Staphylococcus aureus* infections. *N. Engl. J. Med.* 339: 520-532.

MA, X.X., ITO, T. TIENSASITORN, C., JAMKLANG, M., CHONGTRAKOOL, P., BOYLE-VAVRA, S., DAUM, R.S., HIRAMATSU, K. 2002. Novel type of staphylococcal cassette chromosome *mec* identified in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 1147-1152.

MA, X.X., ITO, T., CHONGTRAKOOL, P., HIRAMATSU, K. 2006. Predominance of clones carrying Panton-Valentine leukocidin genes among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated in Japanese hospitals from 1979 to 1985. *J. Clin. Microbiol.* 44: 4515-4527.

MAC FADDIN, J.F. 1977. Biochemical tests for identification of medical bacteria. Williams & Wilkins Company, Baltimore, USA. p. 312.

MALTEZOU, H.C., GIAMARELLOU, H. 2006. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 27: 87-96.

MARANAN, M.C., MOREIRA, B., BOYLE-VAVRA, S., DAUM, R.S. 1997. Antimicrobial resistance in Staphylococci: epidemiology, molecular mechanisms and clinical relevance. *Infect. Dis. Clinics. North. Am.* 11: 813-841.

MARCHESE, A., BALISTRERI, G., TONOLI, E., DEBBIA, E.A., SCHITO, G.C. 2000. Heterogeneous vancomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in a large Italian hospital. *J. Clin. Microbiol.* 38: 866-869.

MARTIN, T.C., STRANAHAN, P., RIVERO, J.C. 2006. A fatal case of community acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus* brain abscess in a previously healthy adolescent. *West. Indian. Med. J.* 55: 200- 204.

MATO, R., SANTOS, S., VENDITII, M., PLATT, D.J., CHUNG, M., DE LENCASTRE, H. 1998. Spread of the multiresistant Iberian clone of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) to Italy and Scotland. *Microbial. Drug Resist.* 4: 107-112.

MCDUGAL, L.K., STEWARD, C., D., KILLGORE, G.E., CHAITRAM, J.M., MCALLISTER, S.K., TENOVER, F.C. 2003. Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database. *J. Clin. Microbiol.* 41: 5513-5120.

MELO, M.C.N., SILVA-CARVALHO, M.C., FERREIRA, R.L., COELHO, L.R., SOUZA, R.R., GOBBI, C.N., ROZEMBAUM, R., SOLARI, C.A., FERREIRA-CARVALHO, B.T., FIGUEIREDO, A.M.S. 2004. Detection and molecular characterization of gentamicin-susceptible, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clone in Rio de Janeiro that resembles the New York/ Japanese clone. *J. Hosp. Infect.* 58: 276-285.

MENESTRINA, G., SERRA, M.D., PRÉVOST, G. 2001. Mode of action of β -barrel pore-forming toxins of the staphylococcal α -toxin family. *Toxicon.* 39: 1661-1672.

MILLAR, B.C., LOUGHREY, A., ELBORN, J.S., MOORE, J.E. Proposed definitions of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). 2007. *J. Hosp. Infect.* 67: 109-113.

MOISE, P.A., SAKOULAS, G., FORREST, A., SCHENTAG, J.J. 2007. Vancomycin in vitro bactericidal activity and its relationship to efficacy in clearance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *J. Antimicrob. Chemother.* 51: 2582-2586.

MOMBACH PINHEIRO MACHADO, A.B., REITER, K.C., PAIVA, R.M., BARTH, A.L. 2007. Distribution of staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) types I, II, III and IV in coagulase-negative staphylococci from patients attending a tertiary hospital in southern Brazil. *J. Med. Microbiol.* 56: 1328-1333.

MONECKE, S., SLICKERS, P., ELLINGTON, M.J., KEARNS, A.M., EHRLICH, R. 2007. High diversity of Panton-Valentine leukocidin positive, methicillin susceptible isolates of *Staphylococcus aureus* and implications for the evolution of community-associated methicillin-resistant *S. aureus*. *Clin. Microbiol. Infect.* 13: 1157-1164.

MORAN, G.J., AMII, R.N., ABRAHAMIAN, F.M., TALAN, D.A. 2005. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in community-acquired skin infections. *Emerg. Infect. Dis.* 11: 928-930.

MORONEY, S.M., HELLER, L.C., ARBUCKLE, J., TALAVERA, M., WIDEN, R.H. 2007. Staphylococcal cassette chromosome *mec* and Panton-Valentine leukocidin characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones. *J. Clin. Microbiol.* 45: 1019-1021.

MURCHAN, S., AUCKEN, H.M., O'NEILL, G.L., GANNER, M., COOKSON, B.D. 2004. Emergence, spread, and characterization of phage variants of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* 16 in England and Wales. *J. Clin. Microbiol.* 42: 5154-5160.

MUTO, C.A., JERNIGAN, J.A., OSTROWSKY, B.E., RICHEL, H.M., JARVIS, W.R., BOYCE, J.M., FARR, B.M. 2003. SHEA Guideline for preventing nosocomial transmission of multidrug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus*. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* 24: 362-386.

NAIMI, T.S., LEDELL, K.H., BOXRUD, D.J., GROOM, A.V., STEWARD, C.D., JOHNSON, S.K., BESSER, J.M., O'BOYLE, C., DANILA, R.N., CHEEK, J.E., OSTERHOLM, M.T., MOORE, K.A., SMITH, K.E. 2001. Epidemiology and clonality of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Minnesota, 1996-1998. *Clin. Infect. Dis.* 33: 990-996.

NAIMI, T.S., LEDELL, K.H., COMMO-SABETTI, K., BORCHARDT, S.M., BOXRUD, D.J., ETIENNE, J., JOHNSON, S.K., VANDENESCH, F., FRIDKIN, S., O'BOYLE, C., DANILA, R.N., LYNFIRLD, R. 2003. Comparison of community- and health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *JAMA.* 290: 2976-2984.

NATIONAL NOSOCOMIAL INFECTIONS SURVEILLANCE (NNIS) SYSTEM REPORT. 1996. Data summary from October 1986-April 1996, issued May 1996. *Am. J. Infect. Control.* 24: 380-388.

NATIONAL NOSOCOMIAL INFECTIONS SURVEILLANCE (NNIS) SYSTEM REPORT. 2004. Data summary from january 1992 through june 2004. *Am. J. Infect. Control.* 32: 470-485.

NIMMO, G.R., COOMBS, G.W., PEARSON, J.C., O'BRIEN, F.G., CHRISTIANSEN, K.J., TURNIDGE, J.D, GOSBELL, I.B., COLLIGNON, P., MCLAWS, M.L. 2006. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the Australian community: an evolving epidemic. *Med. J. Aust.* 184: 384-388.

NUNES, A.P.F., TEIXEIRA, L.M., BASTOS, C.C.R., SILVA, M.G., FERREIRA, R.B., FONSECA, L.S., SANTOS, K.R.N. 2005. Genomic characterization of oxacillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus* isolated from Brazilian medical centres. *J. Hosp. Infect.* 59: 19-26.

NUNES, A.P.F., TEIXEIRA, L.T., IORIO, N.L.P., BASTOS, C.C.R., FONSECA, L. S., SOUTO-PADRÓN, T., SANTOS, K.R.N. 2006. Heterogeneous resistance to vancomycin in *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus warneri* clinical strains: characterisation of glycopeptide susceptibility profiles and cell wall thickening. *Int J Antimicrob Agents.* 27: 307-315.

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

OKUMA, K., IWAKAWA, K., TURNIDGE, J.D., GRUBB, W.B., BELL, J.M., O'BRIEN, F.G., COOMBS, G.W., PEARMAN, J.W., TENOVER, F.C., KAPI, M., TIENSASITORN, C., ITO, T., HIRAMATSUI, K. 2002. Dissemination of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in the community. *J. Clin. Microbiol.* 40: 4289-4294.

OLIVEIRA, D.C., DE LENCASTRE, H. 2002. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 2155-2161.

OLIVEIRA, D.C., TOMASZ, A., DE LENCASTRE, H. 2002. Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet Infect. Dis.* 2: 180-189.

OLIVEIRA, D.C., MILHEIRIÇO, C., DE LENCASTRE, H. 2006. Redefining a structural variant of staphylococcal cassette chromosome *mec*, SCC*mec* type VI. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50: 3457-3459.

OLIVEIRA, G.A., DELL'AQUILA, A.M., MASIERO, R.L., LEVY, C.E., GOMES, M.S., CU, L., HIRAMATSU, K., MAMIZUKA, E.M. 2001. Isolation in Brazil of nosocomial *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* 22: 443- 448.

PAN, E.S., DIEP, B.A., CARLETON, H.A., CHARLEBOIS, E.D., SENSABAUGH, G.F., HALLER, B.L., PERDREAU-REMGTON, F. 2003. Increasing prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in California jails. *Clin. Infect. Dis.* 37: 1384-1388.

PAN, E.S., DIEP, B.A., CHARLEBOIS, E.D., AUERSWALD, C., CARLETON, H.A., SENSABAUGH, G.F., PERDREAU-REMGTON, F. 2005. Population dynamics of nasal strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and their relation to community-associated disease activity. *J. Infect. Dis.* 192: 811-818.

PANTON, P.N., VALENTINE, F.C.O. 1932. Staphylococcal toxin. *Lancet.* 1: 506-508.

PAPAKYRIACOU, H., VAZ, D., SIMOR, A., LOUIE, M., MCGAVIN, M.J. 2000. Molecular analysis of the accessory gene regulator (*agr*) locus and balance of virulence factor expression in epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Infect. Dis.* 181: 990-1000.

PATEL, A.H., NOWLAN, P., WEAVERS, E.D., FOSTER, T. 1987. Virulence of protein A-deficient and alpha-toxin-deficient mutants of *Staphylococcus aureus* isolated by allele replacement. *Infect. Immun.* 55: 3103-3010.

PEACOCK, S.J. 2005. *Staphylococcus*. In: *Topley & Wilson's Microbiology & Microbial Infections*, Boviello, S.P.; Murray, P.R. & Funke, G. (eds), 10th ed, vol 2. ASM Press. Washington, DC. USA. p.772-831.

PÉREZ-ROTH, E., LORENZO-DIAS, F., BATISTA, N., MORENO, A., MÉNDEZ-ÁLVAREZ, S. 2004. Tracking methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones during a 5-year period (1998 to 2002) in a Spanish hospital. *J. Clin. Microbiol.* 42: 4649-4656.

PITCHER, D.G., SAUDERS, N.A., OWEN, R.J. 1989. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Lett. Appl. Microbiol.* 8: 151-156.

PITTET, D., HARBARTH, S., RUEF, C., FRANCIOLI, P., SUDRE, P., PÉTIGNAT, C., TRAMPUZ, A., WIDMER, A. 1999. Prevalence and risk factors for nosocomial infections in four university hospitals in Switzerland. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* 20: 37-42.

PRÉVOST, G., CRIBIER, B., COUPPIÉ, P., PETIAU G., SUPERSAC, G., FINCK-BARBANÇON, V., MONTEIL, H., PIEMONT Y. 1995a. Panton-Valentine leucocidin and gamma-hemolysin from *Staphylococcus aureus* ATCC 49775 are encoded by distinct genetic loci and have different biological activities. *Infect. Immun.* 63: 4121-4129.

PRÉVOST, G., COUPPIÉ, P., PRÉVOST, P., GAYET S., PETIAU G., CRIBIER B., MONTEIL H., PIEMONT Y. 1995b. Epidemiological data on *Staphylococcus aureus* strains producing synergohymenotropic toxins. *J. Med. Microbiol.* 42: 237-245.

PROJAN, S.T., NOVICK, R.P. 1997. The molecular basis of pathogenicity. In: The Staphylococci in human disease, Crossley, K.B. & Archer, G.L.(eds). Churchill Livingstone. New York, USA. p. 55-81.

RIBEIRO, A., CORONADO, A.Z., SILVA-CARVALHO, M.C., FERREIRA-CARVALHO, B.T., DIAS, C., ROZEMBAUM, R., TEIXEIRA, L.A., FIGUEIREDO, A.M.S. 2007. Detection and characterization of international community-acquired infections by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Rio de Janeiro and Porto Alegre cities causing both community- and hospital-associated diseases. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 59: 339-345.

RICHARDS, M.J., EDWARDS, J.R., CULVER, D.H., GAYNES, R.P. 1999. Nosocomial infections in medical intensive care units in the United States. *Crit. Care Med.* 27: 887-892.

ROBERTS, R.B., DE LENCASTRE, A., EISNER, W., SEVERINA, E.P., SHOPSIN, B., KREISWIRTH, B.N., TOMASZ, A. 1998. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in 12 New York hospitals. *J. Hosp. Infect.* 178: 164-171.

ROBERTS, R.B., CHUNG, M., DE LENCASTRE, A., HARGRAVE, J., TOMASZ, A., NICOLAU, D.P., JOHN, J.F., KORZENIOWSKI, O. 2000. Distribution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones among health care facilities in Connecticut, New Jersey, and Pennsylvania. *Microbiol. Drug Resist.* 6: 245-251.

ROSENTHAL, V.D., MAKI, D.G., SALOMAO, R., ÁLVAREZ-MORENO, C., MEHTA, Y., HIGUERA, F., CUELLAR, L.E., ARIKAN, O.A., BOUQAL, R., LEBLEBICIOGLU, H. 2006. Device-associated nosocomial infections in 55 intensive care units of 8 developing countries. International Nosocomial Infection Control Consortium. *Ann. Intern. Med.* 145: 582-591.

ROSSNEY, A.S., SHOR, A.C., MORGAN, P.M., FITZGIBBON, M.M., O'CONNELL, B., COLEMAN, D.C. 2007. The emergence and importation of diverse genotypes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) harboring the Panton-Valentine Leukocidin gene (*pvl*) reveal that *pvl* is poor marker for community-acquired MRSA strains in Ireland. *J. Clin. Microbiol.* 45: 2554-2563.

RUBIN, R.J., HARRINGTON, A.P., DIETRICH, K., GREENE, J.A., MOIDUDDIN, A. 1999. The economic impact of *Staphylococcus aureus* infection in New York City hospitals. *Emerg. Infect. Dis.* 5: 9-17.

RYBAK, M.J. 2006. The pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of vancomycin. *Clin. Infect. Dis.* 42: 35-39.

RYBAK, M.J., LAPLANTE, K.L. 2005. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a review. *Pharmacotherapy.* 25: 74-85.

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

SABERSHEIKH, S., SAUDERS, N.A. 2004. Quantification of virulence -associated gene transcripts in epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by real time PCR. *Mol. Cell. Probes.* 18: 23-31.

SADER, H.S., JONES, R.N., GALES, A.C., SILVA, J.B., PIGNATARI, A.C. & THE SENTRY PARTICIPANTS GROUP (LATIN AMERICA). 2004. SENTRY antimicrobial surveillance program report: latin american and brazilian results for 1997 through 2001. *Braz. J. Infect. Dis.* 8: 25-79.

SADOYAMA, G., GONTIJO FILHO, P.P. 2000. Risk factors for methicillin resistant and sensitive *Staphylococcus aureus* infection in a Brazilian university hospital. *Braz J Infect Dis.* 4: 135-143.

SAÏD-SALIM, B., MATHEMA, B., BRAUGHTON, K., DAVIS, S., SINSIMER, D., EISNER, W., LIKHOSHVAY, Y., DELEO, F. R., KREISWIRTH, B.N. 2005. Differential distribution and expression of Panton-Valentine leucocidin among community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *J. Clin. Microbiol.* 43: 3373-3379.

SAISMAN, L., O'KEEFE, M., GRAHAM, P.L., WU, F., SAÏD-SALIM, B., KREISWIRTH, B., LASALA, A., SCHLIVERT, P.M., DELLA-LATTA, P. 2003. Hospital transmission of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among postpartum women. *Clin. Infect. Dis.* 37: 1313-1319.

SAKOULAS, G., MOISE-BRODER, P.A., SCHENTAG, J., FORREST, A., MOELLERING Jr, R.C., ELIOPOULOS, G.M. 2004. Relationship of MIC and bactericidal activity to efficacy of vancomycin for treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *J. Clin. Microbiol.* 42: 2398-2402.

- SALGADO, C., FARR, B.M., CALFEE, D.P. 2003. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a meta-analysis of prevalence and risk factors. *Clin. Infect. Dis.* 36: 131-139.
- SALYERS, A.A., WHITT, D.D. 2003. Bacterial pathogenesis: a molecular approach. 2th ed, ASM Press. Washington, DC. USA. p. 216-231.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. 1989. Extration and purification of plasmid DNA. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY. Appendix A.5.
- SANCHES, I.S., SARAIVA, Z.C., TENDEIRO, T.C., SERRA, J.M., DIAS, D.C., DE LENCASTRE, H. 1998. Extensive intra-hospital spread of a methicillin-resistant staphylococcal clone. *Int. J. Infect. Dis.* 3: 26-31.
- SANTOS, K.R., TEIXEIRA, L.M., LEAL, G.S., FONSECA, L.S., GONTIGO FILHO, P.P. 1999. DNA typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: isolates and factors associated with nosocomial acquisition in two Brazilian university hospitals. *J. Med. Microbiol.* 48: 17-23.
- SCUDELLER, L., LEONCINI, O., BONI, S., NAVARRA, A., REZZANI, A., VERDIROSI, S., MASERATI, R. 2000. MRSA carriage: the relationship between community and healthcare setting. A study in an Italian hospital. *J. Hosp. Infect.* 46: 222-229.
- SEAL, J.B., MOREIRA, B., BETHEL, C.D., DAUM, R.S. 2003. Antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* at the university of chicago hospitals: a 15-year longitudinal assessment in a large university-based hospital. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 24: 403-408.
- SEYBOLD, U., KOURBATOVA, E.V., JOHNSON, J.G., HALVOSA, S.J., WANG, Y.F., KING, M.D., RAY, S.M., BLUMBERG, H.M.. 2006. Emergence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 genotype as a major cause of health-care associated blood stream infections. *Clin. Infect. Dis.* 42: 647-656.
- SMITH, T., JARVIS, W. 1999. Antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus*. *Microb. Infect.* 1: 795-805.
- SOARES. M.J., TEIXEIRA, L.A., NUNES, M.R., DA SILVA CARVALHO, M.C., FERREIRA-CARVALHO, B.T., FIGUEIREDO, A.M.S. 2001. Analysis of different molecular methods for typing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates belonging to the Brazilian epidemic clone. *J. Med. Microbiol.* 50: 732-742.
- STEINKRAUS, G., WHITE, R., FRIEDRICH, L. 2007. Vancomycin MIC creep in non-vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA), vancomycin-susceptible clinical methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) blood isolates from 2001-05. *J. Antimicrob. Chemother.* 60: 788-794.

STREIT, J.M., JONES, R.N., SADER, H.S., FRITSCH, T.R. 2004. Assessment of pathogen occurrences and resistance profiles among infected patients in the intensive care unit: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program (North America, 2001). *Intern. J. Antimicrob. Agents.* 24: 111-118.

STYERS, D., SHEEHAN, D.J., HOGAN, P., SAHM, D.F. 2006. Laboratory-based surveillance of current antimicrobial resistance patterns and trends among *Staphylococcus aureus*: 2005 status in the United States. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 5: 1-9.

SWARTZ, M.N. 2000. Impact of antimicrobial agents and chemotherapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 2009-2016.

TEIXEIRA, L.A., RESENDE, C.A., ORMONDE, L.R., ROSENBAUM, R., FIGUEIREDO, A.M.S., DE LENCASTRE, H., TOMAZS, A. 1995. Geographic spread of epidemic multiresistant *Staphylococcus aureus* clone in Brazil. *J. Clin. Microbiol.* 33: 2400-2404.

TENOVER, F.C., ARBEIT, R.D., GOERING, R.V., MICKELSEN, P.A., MURRAY, B.E., PERSING, D.H., SWAMINATHAN, B. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 33: 2233-2239.

TENOVER, F.C., MCDUGAL, L.K., GOERING, R.V., KILLGORE, G., PROJAN, S.J., PATEL, J.B., DUNMAN, P.M. 2006. Characterization of a strain of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* widely disseminated in the United States. *J. Clin. Microbiol.* 44: 108-118.

TRINDADE, P., PACHECO, R.L., COSTA, S.F., ROSSI, F., BARONE, A.A., MAMIZUKA, E.M., LEVIN, A.S. 2005. Prevalence of SCCmec type IV in nosocomial bloodstream isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 43: 3435-3437.

VALEVA, A., PALMER, M., BHAKDI S. 1997. Staphylococcal alpha-toxin: formation of the heptameric pore is partially cooperative and proceeds through multiple intermediate stages. *Biochemistry.* 36: 13298-13304.

VANDENESCH, F., NAIMI, T., ENRIGHT, M.C., LINA, G., NIMMOS, G.R., HEFFERNAN, H., LIASSINE, N., BES, M., GREENLAND, T., REVERDY, M.E., ETIENE, J. 2003. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine Leukocidin genes: worldwide emergence. *Emerg. Infect. Dis.* 9: 978-984.

VIVONI, A.M., DIEP, B.A., MAGALHÃES, A.C.G., SANTOS, K.R., RILEY, L.W., SENSABAUGH, G.F., MOREIRA, B.M. 2006. Clonal composition of *Staphylococcus aureus* isolates at a Brazilian University Hospital: identification of international circulating lineages. *J. Clin. Microbiol.* 44: 1686-1691.

VON EIFF, C., FRIEDRICH, A.W. PETERS, G., BECKER, K. 2004. Prevalence of genes encoding for members of the staphylococcal leukotoxin family among clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 49: 157-162.

VOYICH, J.M., OTTO, M., MATHEMA, B., BRAUGHTON, K.R., WHITNEY, A.R., WELTY, D., LONG, R.D., DORWARD, D.W., GARDNER, D.J., LINA, G., KREISWIRTH, B.N., DELEO, F.R. 2006. Is Pantone-Valentine leukocidin the major virulence determinant in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease? *J. Infect. Dis.* 194: 1761-1770.

WALEV, I., MARTIN, E., JONAS, D., MOHAMADZADEH, M., MULLER-KLIESER, W., KUNZ, L., BHAKDI, S. 1993. Staphylococcal alpha-toxin kills human keratinocytes by permeabilizing the plasma membrane for monovalent ions. *Infect. Immun.* 61: 4972-4979.

WANG, G., HINDLER, J.F., WARD, K.W., BRUCKNER, D.A. 2006. Increased vancomycin MICs for *Staphylococcus aureus* clinical isolates from a university hospital during a 5-year period. *J. Clin. Microbiol.* 44: 3883-3886.

WANNET, W.J.B., SPALBURG, E., HECK, M.E.O.C., PLUISTER, G.N., TIEMERSMA, E., WILLEMS, R.J.L., HUIJSDENS, X.W., DE NEELING, A.J., ETIENNE, J. 2005. Emergence of virulent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains carrying Pantone Valentine leukocidin genes in the Netherlands. *J. Clin. Microbiol.* 43: 3341-3345.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). 2002. Prevention of hospital-acquired infection: a practical guide. 2nd edition.

WILKINSON, B.J. 1997. Biology. In: The Staphylococci in human disease. Crossley K.B. & Archer G.L.(eds). Churchill Livingstone. New York, USA. p. 1-38.

WU, S., PISCITELLI, C., DE LENCASTRE, H., TOMAS Z,A. 1996. Tracking the evolutionary origin of the methicillin resistance gene: cloning and sequencing of a homologue of *mecA* from a methicillin susceptible strain of *Staphylococcus sciuri*. *Microb. Drug Resist.* 2: 435-441.

YAMASAKI, O., KANEKO, J., MORIZANE, S., AKIYAMA, H., ARATA, J., NARITA, S., CHIBA, J., KAMIO, Y., IWATSUKI, K. 2005. The association between *Staphylococcus aureus* strains carrying Pantone-Valentine leukocidin genes and the development of deep-seated follicular infection. *Clin. Infect. Dis.* 40: 381-385.

ZARAKET, H., OTSUKA, T., SAITO, K., DOHMAE, S., TAKANO, T., HIGUCHI, W., ONKUBO, T., OZAKI, K., TAKANO, M., REVA, I., BARANOVICH, T., YAMAMOTO, T. 2007. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Hospitals in Niigata, Japan: Divergence and Transmission. *Microbiol. Immunol.* 51: 171-176.

ZHANG, Y.L., WANG, N.P., LAI, F.C., LI, Q., LI, Z. Q. 2003. Survey on drug resistance of *Staphylococcus aureus* to commonly used antibiotics. *Chemother.* 4: 251-253.



HOSPITAL NAVAL MARCÍLIO DIAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Rio de Janeiro, 23 de agosto de 2007.

Ilmo Sra. Coordenadora
Alice Helena Dutra Violante
Ao Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital Universitário Clementino Fraga Filho - UFRJ

Referente à análise do projeto de pesquisa intitulado: **“Staphylococcus aureus resistentes à oxacilina: análise da diversidade clonal, resistência e virulência em amostras isoladas de um hospital do Rio de Janeiro”**.

Por meio desta, estamos encaminhando para análise deste Comitê de Ética, a seguinte documentação do projeto de pesquisa supra citado, da pesquisadora **ROBERTA MELLO FERREIRA CABOCLO**.

Informo a V.S^a que por orientação da CONEP, estamos enviando para apreciação e aprovação, o projeto da pesquisadora acima citada, aluna de mestrado, do Centro de Ciência de Saúde da UFRJ. O motivo do envio para esse Comitê, se dar por estarmos temporariamente sem o registro de funcionamento.

Gostaríamos de poder contar com a colaboração de V.S^a, e desde já agradecer o apoio dispensado pelo atendimento no contato telefônico com o funcionário deste Comitê.

- Protocolo do Estudo;
- Termo de autorização;
- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido;
- Carta ao Comitê de Ética;
- Termo de Autorização para desenvolver a pesquisa;
- Folha de Rosto preenchida;
- Curriculum lattes do pesquisador e do Orientador.
- Resumo tipo lauda em disquete e em folha A-4
-

Caso haja necessidade de complementar a documentação, solicitamos o favor de contactar o CEP/HNMD através do telefone **2599 5572 / 5437** - secretário (2º SG - EF **Queiroz**).

Reiteramos os agradecimentos pela colaboração de V.S^a.

Atenciosamente,

Dalva Maria Carvalho Mendes
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa/HNMD



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
Hospital Universitário Clementino Fraga Filho
Faculdade de Medicina
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Coordenador:

☒ Alice Helena Dutra Violante
Médico - Prof. Associado

Secretário:

☒ Zuzana Rodrigues da Silva
Professora

Membros Titulares:

☐ Beatriz Maria Alasia de Herédia
Médico - Prof. Associado

☐ Eduardo Jorge Bastos Côrtes
Médico - Prof. Assistente

☒ Eliza Regina Ambrosio
Assistente Social - Mestre

☒ Helena Warzynsky
Representante dos Usuários

☐ Luiz Carlos Duarte de
Miranda

☐ Luzia da Conceição de Araújo
Marques

☐ Enfermeiro - Mestre

☒ Mário Teixeira Antonio
Farmacêutico - Especialista

☒ Paulo Feijó Barroso
Médico - Prof. Adjunto

☐ Regiane de Fátima Rivelli
Farmacêutica - Doutoranda

☐ Roberto Coury Pedrosa
Médico - Doutor

Membros Suplentes:

☒ Anna Paola Trindade Rocha
Pierucci

☐ Nutricionista - Professor Adjunto

☐ Beatriz Moritz Trope
Médico - Doutor

☐ Carlos Alberto Guimarães
Médico - Prof. Adjunto

☐ Cesônia de Assis Martinusso
Comunicação Social-Jornalismo

☐ Lucia Helena Luiza Vieira Amim
Médico - Mestre

☐ Doutoranda/FMUFRJ

☐ Maria da Conceição Zacharias
Médico - Prof. Assistente

☐ Maria de Fátima Gustavo Lopes
Representante dos Usuários

☐ Mariângela Oliveira da Silva
Enfermeiro

☐ Mário Fernando Petzhold
Engenheiro - Doutor

☒ Orlando Nunes Cosenza
Sociólogo - Doutor

☐ Rui Haddad
Médico - Prof. Adjunto

☐ Vânia Dias de Oliveira
Assistente Social

CEP - MEMO - n.º 769/07

Rio de Janeiro, 27 de setembro de 2007.

Da: Coordenadora do CEP

A (o): Sr. (a) Pesquisador (a): Dr.ª Roberta Mello Ferreira Caboclo

Assunto: Parecer sobre projeto de pesquisa.

Sr. (a) Pesquisador (a),

Informo a V. Sa que o CEP constituído nos Termos da Resolução n.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e, devidamente registrado na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa, recebeu, analisou e emitiu parecer sobre a documentação referente ao protocolo e seu respectivo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, conforme abaixo discriminado:

Protocolo de Pesquisa: 159/07 - CEP

Título: "Staphylococcus aureus resistentes à oxacilina: análise da diversidade clonal virulência e resistência em amostras isoladas de um hospital geral do Rio de Janeiro".

Pesquisador (a) responsável: Dr.ª Roberta Mello Ferreira Caboclo

Data de apreciação do parecer: 10/09/2007

Parecer: "APROVADO."

Informo ainda, que V.S.a. deverá apresentar relatório semestral, previsto para 10/03/2008, anual e/ou relatório final para este Comitê acompanhar o desenvolvimento do projeto. (item VII. 13.d., da Resolução n.º 196/96 – CNS/MS).

Atenciosamente,

Prof.ª Alice Helena Dutra Violante
Coordenadora do CEP

Prof. Paulo Feijó Barroso
Coordenador Substituto do CEP

ANEXO 2



Rio de Janeiro, 13 de abril de 2007

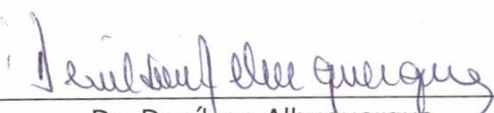
Do: Comitê de Ética em Pesquisa
Coordenador: Dr Denílson Albuquerque

Para: Roberta Mello Ferreira Caboclo e Danielle Borghi
Área de interesse: Farmacologia - Medicina
Protocolo: **(Nº 088/07)**

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Copa D'Or, após avaliação em sua reunião ordinária ocorrida em 10 de abril de 2007, aprovou o projeto de pesquisa: **"Detecção de marcadores de virulência e relação entre os diferentes tipos de SCCmec e resistência à antimicrobianos em amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina isoladas em hospitais da cidade do Rio de Janeiro"**, uma vez que o protocolo não envolve seres humanos e segue os aspectos éticos da pesquisa conforme legislação brasileira.

Ressaltamos que a pesquisadora deverá comunicar toda e qualquer alteração do projeto, além de apresentar relatórios parciais do andamento do mesmo rigorosamente a cada 03 (três) meses, a partir da aprovação do estudo.

Atenciosamente,



Dr. Denílson Albuquerque
Coordenação do Comitê de Ética em Pesquisa

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)