

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE -
MESTRADO

TÂNIA MARIA GASPAR NOVAIS

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Staphylococcus aureus*
RESISTENTE À OXACILINA EM HOSPITAIS DE SÃO LUIS - MA.**

São Luís

2008

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

TÂNIA MARIA GASPAR NOVAIS

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Staphylococcus aureus*
RESISTENTE À OXACILINA EM HOSPITAIS DE SÃO LUIS - MA.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - Mestrado da Universidade Federal do Maranhão, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Azizedite Guedes Gonçalves.
Co-Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Elsa Masae Mamizuka

São Luís

2008

Novais, Tânia Maria Gaspar.

Caracterização molecular de *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina em hospitais de São Luis-MA/ Tânia Maria Gaspar Novais – São Luís, 2008.

45 folhas.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Azizedite Guedes Gonçalves.
Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) –
Universidade Federal do Maranhão, 2008.

1. *Staphylococcus aureus*. I. Título.

CDU: 615.12:579.86(812.1)

TÂNIA MARIA GASPAR NOVAIS

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Staphylococcus aureus*
RESISTENTE À OXACILINA EM HOSPITAIS DE SÃO LUIS - MA.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - Mestrado da Universidade Federal do Maranhão, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Azizedite Guedes Gonçalves (Orientadora)
Doutora em Microbiologia
Universidade Federal do Maranhão

Prof^a. Dr^a Patrícia de Maria Silva Figueiredo
Doutora em Microbiologia
Centro Universitário do Maranhão

Prof^a. Dr^a. Rosângela Cipriano de Souza
Doutora em Medicina Tropical.
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Valério Monteiro Neto
Doutor em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro
Universidade Federal do Maranhão

Para meus pais amados.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus e nossa Senhora pela vida e iluminação.

Aos meus pais, Antonio Novais e Amparo Gaspar, pelo amor que me fez o que eu sou.

Aos meus irmãos Sandra Gaspar e Antonio Junior, pelo carinho e incentivo dispensado.

À Direção do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, em particular à Profª Drª Marilene Borges, coordenadora do PPG-Mestrado, pela oportunidade de participar do programa.

À Professora e amiga Drª. Azizedite Guedes, pela atenção, confiança, força e ensinamentos a mim dispensados.

À Professora Drª. Elsa Mamizuka e seu grupo de pesquisa da Microbiologia da USP- São Paulo em especial a Lara Mendes, pelo auxílio e incentivo do trabalho realizado.

Ao professor Silvio Monteiro pela colaboração na análise dendrograma desse trabalho.

Ao Laboratório de Análises Clínicas do HUPD pela colaboração no desenvolvimento do trabalho;

Ao Laboratório Cedro e aos profissionais do setor de Microbiologia desse laboratório, em especial a Drª Sirlei Garcia Marques e Luciana, pelo fornecimento das amostras.

Aos professores Valério Monteiro Neto e Rosângela Cipriano, pelas sugestões e correções realizadas no exame de qualificação.

Aos meus amigos Sirlei Marques, Ana Célia Lucena, Adriana Câmara, Andréa Fontenele, Patrícia Figueiredo, Paula Lauande, Josselene Louzeiro, Profº Bismarck Sauáia, José Ferreira Lima, Wanda Ramos, Alicia Santos, Ione Cristina Pereira, Viraneide Marques, Patrícia, Professora Sandra Cutrim, Rosália pelo incentivo e ajuda prestada durante a realização dos trabalhos.

A vida está cheia de desafios que, se aproveitados de forma criativa, transformam-se em oportunidades.

Maxwell Maltz

RESUMO

O *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) é um importante patógeno, isolado em infecções humanas, principalmente em pacientes hospitalizados e representa um grave problema em vários países do mundo, incluindo o Brasil. Esta pesquisa apresentou como objetivos caracterizar molecularmente cepas de MRSA em dois hospitais privados e três públicos de São Luis-MA, comparar os perfis genômicos de MRSA existentes nos hospitais estudados, avaliar o perfil de sensibilidade em relação aos antimicrobianos e correlaciona-lo com o perfil genômico. Foram estudadas 50 amostras de MRSA isoladas de hemoculturas no período de maio de 2006 a junho de 2007. Para o teste de sensibilidade aos antimicrobianos utilizou-se o Método de Kirby-Bauer. A caracterização genotípica foi realizada por *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE). A caracterização molecular por PFGE permitiu a identificação de cinco perfis genômicos distintos (A, B, C, D e E). Os perfis genômicos A e B apresentaram o maior número de amostras de MRSA e estão disseminados em todos os hospitais estudados. O perfil genômico C encontra-se presente somente nos hospitais da rede pública. No hospital 5 (H5) estão disseminados todos os perfis genômicos identificados com uma maior diversificação de clones na clínica médica. O dendrograma construído a partir dos perfis genômicos revelou a presença de quatro *clusters*. Do total dos grupos, houve maior frequência de MRSA em hospitais públicos (76%) do que nos privados (24%). As UTIs destacaram-se com maior número de casos de MRSA (58%). Quanto ao perfil de sensibilidade aos antimicrobianos, todas as amostras demonstraram sensibilidade a vancomicina e resistência múltipla para as demais drogas testadas. Verificou-se que 36 (72%) dos isolados de MRSA apresentaram o mesmo perfil de sensibilidade com padrões genéticos distintos e 14 (28%) apresentaram perfil de sensibilidade diferente para alguns antibióticos tais como: rifampicina, tetraciclina, Sulfametoxazol/Trimetoprim e ciprofloxacina. Os resultados obtidos nesta pesquisa nos indicam que o estudo genético exerce um papel importante no delineamento das infecções por *S. aureus*, considerando que só o antibiograma não forneceria parâmetros suficientes para uma precisa relação epidemiológica entre as amostras dos portadores de MRSA.

Palavras-chave: Caracterização molecular. Infecção Hospitalar

Resistência à oxacilina, *Staphylococcus aureus*

ABSTRACT

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is an important pathogen isolated from human infections, mainly from hospitalized patients. It represents a serious problem in several countries, including Brazil. The purposes of this study were to characterize, at molecular level, MRSA strains from two private and three public hospitals in São Luis-MA; to compare the genomic profiles of MRSA strains existing in the studied hospitals; to evaluate the susceptibility profiles to antimicrobials, and to correlate them with the genomic profiles. Fifty MRSA strains isolated from blood cultures, from May 2006 to June 2007, were studied. The antimicrobial susceptibility was determined by the Kirby-Bauer method and genotyping was carried by pulsed field gel electrophoresis (PFGE). The molecular characterization by PFGE allowed the identification of 5 distinct genomic profiles (A, B, C, D, and E). The genomic profiles A and B were presented by the majority of MRSA strains and were widespread in all hospitals included in this study. The genomic profile C was found only in public hospitals. All genomic profiles were disseminated in the hospital 5 (H5), with great clonal diversity in the Medical Ward Unit. The dendrogram constructed with the genomic profiles revealed the presence of four clusters. The frequency of MRSA was higher in public hospitals (76%) than in the private ones (24%). The majority of the MRSA cases were detected in ICUs (58%). Regarding the antimicrobial susceptibility profiles, all strains were susceptible to vancomycin, but displayed resistance to multiple drugs. It was verified that 36 (72%) MRSA isolates presented the same susceptibility profile with distinct genetic patterns and 14 (28%) displayed different susceptibility profiles for some antibiotics, such as: rifampicin, tetracycline, sulfamethoxazole/trimethoprim, and ciprofloxacin. The results obtained in this study indicate that the genetic analysis has an important role in the delineation of *S. aureus* infections, since antibiogram by itself would not provide enough parameters for a precise epidemiological relationship among strains of MRSA carriers.

Keywords: Molecular characterization. Hospital Infection. Oxacillin resistance.

Staphylococcus aureus

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – Perfis de DNA genômico A, B e C após digestão com enzima <i>Sma</i> I por PFGE de cepas de MRSA isoladas de hemoculturas no aparelho CHEF-DRII da Bio Rad, e suas categorias relacionadas de dois hospitais públicos e dois privados no período de maio de 2006 a junho de 2007, em São Luis-MA-----	20
FIGURA 2 – Perfis de DNA genômico A, C, D e E após digestão com enzima <i>Sma</i> I por PFGE de cepas de MRSA isoladas de hemocultura no aparelho CHEF-DRII da Bio Rad, e suas categorias relacionadas de três hospitais públicos e um privado no período de maio de 2006 a junho de 2007, em São Luis-MA-----	21
FIGURA 3 – Dendrograma construído com base no coeficiente de similaridade genética entre as amostras de MRSA isoladas de hemocultura por PFGE, no período de maio de 2006 a junho de 2007, em São Luis -MA -----	24

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Distribuição de MRSA isolados de hemoculturas conforme os setores e os hospitais de origem no período de maio de 2006 a junho de 2007, em São Luis-MA-----	18
TABELA 2 – Perfil de resistência aos antimicrobianos das 50 cepas de MRSA isoladas de hemoculturas de três hospitais públicos e dois privados no período de maio de 2006 a junho de 2007, em São Luis-MA.-----	19
TABELA 3 – Perfis genômicos de MRSA provenientes de hemoculturas de três hospitais públicos e dois privado, no período de maio de 2006 a junho de 2007, em São Luís – MA-----	23
TABELA 4 – Relação de perfis de resistência aos antimicrobianos e tipagem molecular por PFGE de 50 amostras de MRSA isoladas de hemoculturas de dois hospitais privados e três públicos no período, de maio 2006 a junho 2007, de São Luis-MA-----	26

LISTA DE SIGLAS

MRSA – *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*
ORSA - *Staphylococcus aureus* oxacilina resistente
PBPs - *Penicilin Binding Protein*
PRP – Penicilina Resistente Penicilinase
Kb – Kilobases
SSC*mec* - *Staphylococcus Chromosome Cassete mec*
UTIN – Unidade de Terapia Intensiva Neonatal
UTI – Unidade de Terapia Intensiva
CM – Clínica Médica
CC – Clínica Cirúrgica
VRE – *Vancomycin resistant Enterococcus*
IH - Infecção Hospitalar
PCR - *Polimerase Chain Reaction*
PFGE - *Pulsed Field Gel Electrophoresis*
USP - Universidade de São Paulo
BHI - *Brain Heart Infusion*
TSB- *Trypticase-Soil-Broth*
µl – microlitro
µg – micrograma
SMZ+TMP – Sulfametoxazol + Trimetoprima
IR - Intimamente relacionados
PR - Possivelmente relacionados
ATCC – *American Type Culture Collection in Washington DC*
CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO -----	01
2	OBJETIVOS -----	10
2.1	Gerais -----	10

2.2	Específicos -----	10
3	MATERIAL E MÉTODOS -----	11
3.1	Área de Estudo e seleção das amostras -----	11
3.2	Identificação bacteriana -----	11
3.3	Teste de sensibilidade aos antimicrobianos -----	12
3.4	Tipagem molecular -----	13
3.4.1	Preparação dos plugs com o DNA bacteriano -----	13
3.4.2	Digestão do DNA bacteriano com enzima de restrição <i>SmaI</i> -----	14
3.4.3	Preparação do gel de Agarose e corrida do gel -----	14
3.4.4	Critérios de interpretação -----	15
4	RESULTADOS -----	17
5	DISCUSSÃO -----	28
6	CONCLUSÃO -----	34
	REFERÊNCIAS-----	35
	ANEXO I - Soluções e reagentes -----	42

1 INTRODUÇÃO

O *Staphylococcus aureus* é uma bactéria associada a diversas patologias incluindo infecções da pele e mucosas, bacteremia, endocardites, infecção do sistema nervoso central e trato genitourinário (O'NEILL, 2000).

O isolamento dos estafilococos resistentes às penicilinas foi observado logo após os primeiros experimentos com a introdução da penicilina G na clínica em 1941, registrando-se em 1944 e 1945 índices de resistência de 12 a 22%. Ao final da década de 1950, os estafilococos isolados em hospitais americanos, mostravam-se resistentes às penicilinas, devido à produção de penicilinases inativadoras dessas drogas, codificadas por plasmídios transmissíveis por transdução (TAVARES, 2000).

Staphylococcus aureus é, talvez, o patógeno de maior preocupação devido à virulência intrínseca, à diversidade de infecções potencialmente fatais e à sua capacidade de adaptação às diferentes condições ambientais. Devido à ampla utilização de antimicrobianos no cenário hospitalar e comunitário e à disseminação do patógeno por pacientes previamente colonizados, ao final da década de 1960, aproximadamente 80% de todos os estafilococos isolados mostravam-se resistentes à penicilina. Atualmente, mais de 90% dos isolados de estafilococos nosocomiais e comunitários são produtores de penicilinase e resistentes a outras classes de antibióticos como macrolídeos, estreptomicina e tetraciclina (LOWY, 2003).

Para combater os estafilococos foram descobertas as penicilinas antiestafilocócicas, como a metilicina ou oxacilina e seus derivados, e as cefalosporinas da primeira e segunda geração. Na atualidade, estas bactérias vêm mostrando crescente resistência aos beta-lactâmicos em hospitais de grande porte, com serviços de emergência aberto ao público e centro de referência para pacientes infectados. Nesses estafilococos, chamados MRSA ou ORSA (*Staphylococcus aureus* metilicina resistente ou oxacilina resistente), a resistência é resultado de genes cromossômicos que codificam modificações no receptor de ação dos beta-lactâmicos, as proteínas fixadoras de penicilinas (*penicilin binding proteins* ou PBPs), havendo a produção de novas PBPs (PBP2a ou PBP 2') com pequena afinidade pelos beta-lactâmicos (TAVARES, 2000).

A presença da PBP2a faz com que a metilicina e os compostos *penicilina- penicilinase resistente (PRP)* apresentem baixa afinidade pelo local de ligação na bactéria, a parede celular, e deixem de ser efetivos. O grupo *PPR* é composto pela oxacilina, metilicina nafcilina, cloxacilina e dicloxacilina, e constitui a classe de drogas de escolha para o tratamento de infecções por *S. aureus* produtores de penicilinas (Beta-lactamase positivo) que não apresentam alteração de PBP2a (ROSSI, 2005).

O MRSA foi descrito pela primeira vez no Reino Unido em 1961, quando se detectou a baixa afinidade das PBPs aos antibióticos (WILSON, 2006).

A resistência à metilicina é determinada pela aquisição de um cassete estafilocócico cromossomal - *mec* (*Staphylococcal Chromosome*

Cassete mec-SSCmec), um elemento genético móvel de 20-60 Kb, compreendendo o gene *mecA* e os elementos regulatórios de sua transcrição, gene *mecI* e *mecRI* (MATHEWS et al., 1987).

Até o momento, foram descritos cinco tipos de *SSCmec* (I,II,III, IV, V), os quais podem estar associados a estruturas genéticas móveis como transposons (tn 554) e plasmídios, responsáveis pela resistência aos antimicrobianos não beta-lactâmicos (HIRAMATSU, 2001);(ITO et al., 2003).

No Brasil, a presença de MRSA com *SSCmec* tipo IV foi documentada por Trindade e cols, no Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo. Durante sete meses observaram que 13% (20/151) das bactérias hospitalares por MRSA apresentaram suscetibilidade a várias classes de antimicrobianos, onde, 95% destas possuíam *SSCmec* tipo IV, a tipificação molecular evidenciou pelo menos 4 tipos diferentes de perfis com predomínio de um perfil clonal (DANTAS, 2007).

A partir do início dos anos 90 esse agente se converteu em uma das principais causas de infecções adquiridas em hospitais, com alta taxa de prevalência em alguns países, como Estados Unidos e sul da Europa e, menos freqüente no norte da Europa, com menos de 5% (WILSON, 2006).

A incidência de infecção por esse microrganismo vem a cada dia aumentando e estudos demonstram que o MRSA apresenta letalidade maior do que os *S. aureus* sensíveis a oxacilina (ASENSIO et al., 1996).

Um estudo sobre a investigação da diversidade clonal do MRSA no nordeste, realizado por Santos Filho e colaboradores (1996), verificaram que a disseminação do clone de MRSA encontrado em João Pessoa, Paraíba é similar aos descritos em outras cidades do Brasil.

Na última década, os microrganismos Gram-positivos, em especial o *S. aureus*, emergiram como importantes agentes causadores de infecção da corrente sanguínea (SALOMÃO et al.,1993).

Dados recentes do Programa de Vigilância Antimicrobiana Sentry apontam que o *S. aureus* em infecção da corrente sanguínea assumiu o primeiro lugar entre as bactérias isoladas nas hemoculturas, não só em hospitais brasileiros, como em outros centros da América Latina, representando 21,3% do total de bactérias isoladas (SADER, 2002).

As infecções por *S. aureus* acometem pacientes em todas as faixas etárias, com maior frequência nos extremos de idade e pior prognóstico em pacientes acima de 50 anos (WATANAKUNAKOM, 1987).

Em 1971, 5% das cepas hospitalares de *S. aureus* enviadas ao laboratório de referência no Reino Unido eram resistentes a meticilina, subindo para 43% em 2002, sendo obrigatório a notificação de todos os casos de bacteremia por MRSA, que ocorrem principalmente em pacientes idosos e em geral provenientes de feridas cirúrgicas ou de cateteres intravenosos. Durante o período de 2001-2005, na Inglaterra (Reino Unido), foram reportados dez mil casos anuais de bacteremias intra-hospitalares por *S. aureus*, sendo a maior parte por MRSA (WILSON, 2006).

Segundo Conterno et al., em 1994, no Hospital São Paulo, o *S.aureus* foi um agente importante das bacteremias, principalmente hospitalares com alta letalidade, variando 5% a 47%, dependendo das unidades estudadas e do tratamento instituído.

As taxas gerais de infecção nas UTI Neonatais (UTIN) variam de 6 a 25%, sendo maior nos recém-nascidos (RN) pré-termos com peso menor que 1500g. Dentre os agentes infecciosos mais prevalentes nas UTIN, os estafilococos lideram as estatísticas, principalmente pelas longas permanências do RN nestas unidades, que originam elevado risco de bacteremia (GRAHAM, 2002)

No hospital Universitário Clementino Fraga Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro (HUCFF), a maioria das amostras de MRSA isoladas apresentavam perfil fenotípico de multirresistência com incidência de 0,89 casos por pacientes-dia/ano até 2004. Em 2005 a incidência de MRSA aumentou para 1,5 casos por paciente-dia/ano (DANTAS, 2007).

A aquisição de MRSA nosocomial está frequentemente relacionada com fatores de risco predisponentes que incluem: idade, hospitalização prolongada, uso de dispositivos como cateter venoso central, internação em unidade de terapia intensiva (UTI), procedimentos cirúrgicos, intertransferências de pacientes, proximidade dos pacientes colonizados/infectados por MRSA e, universalmente, uso prévio de antibióticos, especialmente os de amplo espectro como as cefalosporinas (BOYCE, 1992); (SAFDAR; MARKI, 2002).

As infecções causadas pelo MRSA eram única e exclusivamente documentadas em hospitais. Entretanto, nos últimos anos, as infecções causadas por MRSA e adquiridas na comunidade têm sido documentadas de modo crescente. Estas infecções vêm ocorrendo em indivíduos saudáveis sem nenhum fator de risco identificável: estas cepas chamadas de associadas à comunidade ou adquirida na comunidade (CA-MRSA), não são epidemiologicamente relacionadas às cepas de MRSA adquiridas em hospitais. Os primeiros casos documentados de infecções por CA-MRSA ocorreram entre aborígenes australianos e nativos americanos no Canadá, no início da década de 90. Posteriormente, estas infecções se propagaram pelo mundo incluindo diversos surtos, tanto nos Estados Unidos como em diversos outros países (LOPES, 2005).

Cepas MRSA clássicas apresentam-se freqüentemente resistentes a outros grupos de drogas indicadas para o tratamento dos estafilococos, como clindamicina, eritromicina, tetraciclina e, menos freqüentemente a gentamicina e sulfametoxazol/trimetroprima (ROSSI et al., 2005).

As iniciativas terapêuticas para pacientes com infecção por MRSA são limitadas. Os glicopeptídeos (vancomicina e teicoplanina) são consideradas drogas clássicas de escolha para o tratamento de infecções provocadas por MRSA. Cepas de MRSA são sempre resistentes a todas as cefalosporinas, inclusive as de quarta geração, assim como aos cabapenêmicos, independentemente do resultado obtido no antibiograma (ROSSI et al., 2005).

A vancomicina atua ligando-se especificamente ao dipeptídeo D-alanil-D-alalina do pentapeptídeo precursor do peptidoglicano, na interface da membrana citoplasmática/parede celular, impedindo a transferência de unidades recém sintetizadas para a matriz parietal em crescimento inibindo assim a formação dos polímeros de peptidoglicano da parede celular (CRISANTO,2003).

Embora seja uma droga ativa contra microrganismos Gram-positivos e alguns anaeróbios, a vancomicina é especificamente indicada como uma opção para o tratamento de infecções estafilocócicas sistêmicas em pacientes alérgicos às penicilinas ou para as infecções por estafilococos

resistentes à meticilina (TAVARES, 2001). É também indicada para o tratamento de pneumonias, osteomielites, septicemias, endocardites estafilocócicas e meningoencefalites como alternativa às penicilinas e as cefalosporinas (ALBANESE, 2000).

A teicoplanina diferencia-se da vancomicina principalmente por sua farmacocinética ser mais favorável, apresentando meia vida sérica mais longa, permitindo assim sua administração em dose única diária. Ainda apresenta menor toxicidade que a vancomicina, podendo ser administrada por via intramuscular (TAVARES, 2001).

Com o uso contínuo de vancomicina em infecções hospitalares por MRSA, vem sendo observado a perda gradual de sua eficácia por desenvolvimento de resistência, tornando-se necessário introduzir novas terapias alternativas para o tratamento de infecções por gram-positivos multirresistentes (CRISANTO, 2003).

Em 1997 foi descrito, pelo professor Hiramatsu, da Universidade de Jutendo, Japão, um caso de uma cepa MRSA resistente à vancomicina isolada de uma ferida cirúrgica de um garoto de 4 meses (OLIVEIRA; MAMIZUKA, 2001; VELÁQUEZ, 2002). Em 2000 foram encontradas, no Brasil, as primeiras cepas de *S. aureus* com susceptibilidade intermediária a vancomicina (VISA) nos estados do Rio de Janeiro, São Paulo e Porto Alegre (OLIVEIRA; MAMIZUKA, 2001).

Em julho de 2002, foi isolado o primeiro caso documentado de infecção causada por *S. aureus* com resistência completa a vancomicina (VRSA) (MIC >32mcg/ml), a partir de um swab obtido no sítio de saída de um cateter vascular em um morador de Michigan de 40 anos, portador de diabetes, enfermidade vascular periférica e insuficiência renal crônica (CDC, 2002).

O isolamento de VRSA obtido a partir do sítio de saída do cateter foi identificado inicialmente no laboratório de um hospital local, usando o teste de MIC e análises moleculares. O isolado continha o gene *vanA* que pode ter sido adquirido através da troca de material genético a partir do enterococo resistente a vancomicina (CDC, 2002).

A linezolida foi divulgada em 1996 por Brickner e cols cientistas da companhia Upjohn (atualmente Pharmacia), EUA. Foi o primeiro membro de outro grupo de novos antibióticos o das oxazolidinonas, demonstrando

atividade contra bactérias resistentes a outros antibióticos, como o MRSA, *S. pneumoniae* resistente às penicilinas e enterococos resistentes a vancomicina (PLOUFFE et al., 2000).

O mecanismo de ação da linezolida consiste em inibir a síntese protéica ao ligar-se à subunidade 50S do ribossomo, deformando o RNA transportador e inibindo sua ligação ao ribossomo, impedindo assim o início da formação do complexo peptídico (DRESSER et al., 1998).

Um novo grupo de antimicrobianos utilizado contra MRSA e VISA é Ceftobiprole, uma cefalosporina com afinidade aumentada pela PBP2a (MACHADO, 2005).

Um estudo realizado por Chambers (2005), em coelhos com endocardites por MRSA e VISA, demonstrou que o ceftobiprole exerce uma ação equivalente a vancomicina contra MRSA e superior à vancomicina nas endocardites por VISA.

As estreptograminas ou sinergistinas constituem um grupo de antibióticos formados por substâncias complexas, onde um dos componentes é macrolídeo. A quinupristina-dalfopristina tem ação bacteriostática, agindo por inibição da síntese protéica ao se ligarem ao componente 50S do ribossoma. A dalfopristina bloqueia a ligação dos aminoácidos ao peptídeo em formação e a quinupristina impede o alongamento da cadeia peptídica, que é liberada precocemente, sem ter ocorrido a formação da proteína (TAVARES, 2001)

Quinupristina-dalfopristina é uma estreptogramina semi-sintética injetável, apresenta ação ativa contra uma ampla variedade de microrganismos gram-positivos, incluindo cepas de MRSA, pneumococo resistente à penicilina e à eritromicina e *Vancomycin Resistant Enterococcus* (VRE) (SOUZA et al., 2005).

As glicilciclinas são derivados das tetraciclina que ampliam seu espectro de ação e as tornam menos sensíveis aos mecanismos de resistência bacteriana. A tigeciclina, um dos antibióticos desse grupo, foi lançado nos EUA em agosto de 2005 e disponibilizado no mês de maio de 2006 no Brasil, em lançamento conjunto para América Latina. Tem amplo espectro de ação, agindo contra estreptococos em geral (incluindo pneumococos e enterococos multirresistentes), estafilococos (MRSA, VISA e VRSA), enterobactérias, bacilos gram-negativos não-fermentadores como *Acinetobacter sp* (inclusive

resistentes aos carbapenêmicos). Em ensaios clínicos, a tigeciclina foi equivalente ao imipenem no tratamento de infecções intra-abdominais graves e à vancomicina mais aztreonam em infecções complicadas da pele e dos tecidos moles. Tem boa penetração tecidual e sua meia-vida permite administração a cada 12 horas, uso exclusivamente intravenoso (SADER,2005; LOPES,2006).

O controle de infecções hospitalares (IH) é um assunto complexo que exige a participação de clínicos, epidemiologistas e microbiologistas, sendo estes responsáveis tanto pelo diagnóstico das infecções hospitalares quanto pela investigação microbiológica dos surtos epidêmicos. As informações normalmente fornecidas pelo laboratório de microbiologia, tais como identificação em nível de espécie, padrão de sensibilidade a antimicrobianos e biótipo, podem ser suficientes para estabelecer uma relação entre diferentes amostras em alguns casos (SADER, 2001).

Vários métodos de tipagem epidemiológica têm sido utilizados na avaliação de patógenos hospitalares. Existem métodos mais tradicionais (não-moleculares) e os métodos mais avançados que empregam técnicas moleculares. Os métodos tradicionais tais como, antibiograma, sorotipagem, biotipagem e fagotipagem, têm sido utilizados freqüentemente na avaliação de infecções hospitalares (SADER, 2001). Os métodos de difusão em disco, microdiluição e microdiluição são adequados para detectar linhagens de MRSA, se forem seguidos de métodos padrões. A difusão em disco é um método confiável para detecção de MRSA (CLSI 2006; JOLLY, GOLDBERG, 1989). Oxacilina é a droga indicada para detectar a resistência do *Staphylococcus* spp *in vitro* por ser a mais resistente à degradação e a mais sensível para detecção de heterorresistência (ROSSI, 2005).

Entre os métodos moleculares, destacam-se: a ribotipagem, tipagem plasmidial, tipagem de bacteriófagos e técnicas baseadas em *Polimerase Chain Reaction* (PCR) e *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE). Este último é considerado *gold standard* para tipagem de MRSA, devido a sua melhor estabilidade e grande poder discriminatório para as estirpes que apresentam similaridade genética (PANNUTI, 1995; STRUELENS, 1992).

Devido ao alto poder discriminatório, a PFGE tem sido recomendada por muitos pesquisadores como o método de escolha para a

tipagem de MRSA. A PFGE consiste basicamente de uma modificação da eletroforese convencional com campo elétrico constante em que a direção da corrente elétrica sofre alterações freqüentes, permitindo a resolução de moléculas grandes de DNA (BIRREN, 1993).

É um método utilizado para a genotipagem de estafilococos sendo indicado para estudos com finalidade epidemiológica e particularmente útil na investigação de surtos hospitalares (CHANG et al., 2000)

Na PFGE as enzimas de restrição reconhecem sítios pouco freqüentes, o que resulta em fragmentos de DNA grandes. O número de fragmentos varia de um isolado para outro. A combinação desses fatores possibilita a formação de padrões eletroforéticos de fácil análise e comparação (SADER et al.,1995; BANNERMAN, 1995).

Com o auxílio da PFGE, foi verificada a existência de cinco clones de MRSA disseminados internacionalmente. Esses cinco clones foram designados como ibérico, brasileiro, húngaro, Nova Iorque/Japonês e pediátrico, de acordo com a área geográfica onde foram primariamente isolados. Estes clones são responsáveis, em conjunto pela maioria das infecções por MRSA no mundo (OILIVEIRA,2002).

Levando-se em consideração a alta prevalência de bactérias gram-positivas multirresistentes isoladas de hemoculturas e devido a ausência de registro na literatura maranhense a respeito dos clones de MRSA que circulam nos hospitais, este trabalho tem como objetivos:

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Caracterizar molecularmente cepas de *Staphylococcus aureus* resistente à metilina e oxacilina isoladas de hemoculturas de três hospitais públicos e dois privados em São Luis – MA, no período de maio de 2006 a junho de 2007

2.2 ESPECÍFICOS

- Comparar os perfis genômicos de cepas de MRSA isoladas de hemoculturas nos hospitais estudados.

- Correlacionar os setores de cada hospital com hemoculturas positivas para MRSA.

- Avaliar o perfil de sensibilidade em relação aos antimicrobianos.

- Correlacionar o perfil de sensibilidade com o perfil genômico.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1 Área de estudo e seleção das amostras

As amostras bacterianas foram selecionadas a partir do isolamento de *S. aureus* resistente à oxacilina provenientes de hemoculturas em três hospitais públicos e dois privados, no período de maio de 2006 a junho de 2007, em São Luis-MA.

Os hospitais da rede pública foram: H3, H4 e H5. O Hospital H3 (121 leitos) possui nível de atenção ambulatorial e hospitalar de média complexidade e internação, demanda espontânea e apresenta setores cirúrgicos, clínicos, UTI adulto. O Hospital H4 (148 leitos), é considerado de urgência/emergência, funcionando 24 horas, com nível de atenção ambulatorial e hospitalar de média e alta complexidade, e internação, atendimento de

demanda espontânea e referenciada, especialidades cirúrgicas, clínicas, UTI adulto e Pediatria. O Hospital H5 (506 leitos), apresenta nível de atenção ambulatorial e hospitalar de demanda espontânea e referenciada, de média e alta complexidade. Esta unidade é um complexo Hospitalar de Ensino atendendo duas unidades, sendo uma Materno-Infantil, que juntas apresentam especialidades cirúrgicas, clínicas, UTI adulto, UTI cardíaco, Pediatria, UTI pediátrica, UTI neonatal, obstétrica, hemodinâmica. Os Hospitais H1(100 leitos) e H2 (55 Leitos) são da rede privada, com nível de atenção ambulatorial e de internação com Urgência/emergência de média complexidade, apresentando especialidades: cirúrgicas, clínicas, UTI adulto. Contudo, apenas o Hospital H2 apresenta leitos de UTI neonatal. (BRASIL, 2007).

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital Universitário – Presidente Dutra (HUPD) com protocolo de número 33104-266/07.

3.2 Identificação bacteriana

As amostras de sangue foram semeadas em frasco próprio de hemocultura, utilizados no aparelho Bactec 90120 da marca BD®. Quando o aparelho sinalizava positividade nos frascos de hemoculturas, os mesmos eram retirados e repicados em placas de ágar sangue incubadas a 35°C em estufa bacteriológica por 24 horas.

A identificação do *S. aureus* foi realizada através da coloração de Gram onde analisou-se as características morfo-tinturiais dos microrganismos presentes nas amostras estudadas, provas da catalase e coagulase (MURRAY, 1999).

Prova da catalase

A detecção desta enzima foi realizada como descrito por MacFaddin, (2000). Sobre uma lâmina limpa, foi depositada uma alçada de cultivo bacteriano puro e adicionamos uma gota de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Interpretação do teste: a formação de bolhas foi indicativa de prova positiva e a ausência da mesmas de prova negativa.

Prova da coagulase

A pesquisa da enzima coagulase foi realizada utilizando-se plasma de coelho liofilizado em lâmina. Nos casos de interpretação duvidosa o teste foi feito em tubo. Inoculou-se uma alçada da colônia pura isolada em meio de cultura não seletivo em 0,5 mL de plasma reconstituído e incubamos a 35°C. As leituras foram realizadas após 4 e 24 horas de incubação. A formação de coágulo foi indicativa de prova positiva.

3.3 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

Para a execução do antibiograma empregamos o método de difusão do disco (Kirby-Bauer) de acordo com os critérios de interpretação do *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*, 2006.

As drogas testadas foram clindamicina (2µg), ciprofloxacina (5µg), eritromicina (15µg), gentamicina (10µg), oxacilina (1µg) rifampicina (5µg), sulfametoxazol-trimetropima (25µg), penicilina (10UI), vancomicina (30µg), tetraciclina (30µg).

3.4 Tipagem molecular

Este teste foi realizado no laboratório de referência de genotipagem da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade de São Paulo (USP), sob a coordenação da professora Doutora Elsa Mamizuka.

As amostras bacterianas foram tipadas utilizando-se a técnica de (PFGE), segundo Pfaller et al (1993).

3.4.1 Preparação dos *plugs* com o DNA bacteriano

As amostras bacterianas foram repicadas do caldo BHI (*Brain-Heart-Infusion*) para placas de ágar sangue e em seguida incubadas em estufa 37°C por um noite.

Após esse período, 2 a 4 colônias bacterianas foram transferidas para tubo de caldo TSB (*Triptycase-Soil-Broth*) e incubadas a 37°C sob agitação em shaker ajustado para velocidade de 180 rpm *overnight*. Posteriormente, as amostras em caldo TSB foram centrifugadas (4000 rpm por 5 minutos) e o sobrenadante descartado. O sedimento foi lavado três vezes com solução salina (0,9%) e após a segunda lavagem a suspensão foi transferida para tubo de Eppendorf (1,5 ml de capacidade) previamente pesado, e submetido ao processo de centrifugação (6500 rpm por 1 min.). A seguir, o sobrenadante foi retirado dos tubos de Eppendorf para serem pesados. A diferença entre o Eppendorf vazio e o cheio multiplicada por 1000 correspondeu a quantidade em µl de tampão 50mM de EDTA (pH 8,0) adicionado.

O sedimento com o tampão foi homogeneizado em agitador de tubo tipo vórtex e foram adicionados no mesmo eppendorff 400ul de tampão EC, previamente aquecido a 50°C, 450ul de agarose (Low Melting) a 2% e 20ul de lisostafina (1mg/mL).

Essa mistura foi rapidamente transferida para os blocos de agarose e colocados na geladeira por 30 minutos.

Com o auxílio de uma palheta os blocos foram colocados em placa de macrodiluição contendo 2ml de tampão EC e incubados por 7 horas a 37°C.

3.4.2 Digestão do DNA bacteriano com enzima de restrição *Sma*I

Após a incubação, os blocos foram lavados três vezes com tampão CHEF TE, com meia hora de intervalo entre uma lavagem e outra. Foi retirado todo o tampão CHEF TE e os blocos incubados com 2mL de tampão ES e 100µl de Proteinase K (20mg/mL) a 50°C por 16 horas. Decorrido esse tempo, o tampão ES e a enzima proteinase K foram desprezados e os *plugs* lavados cinco vezes sobre agitação com CHEF TE com intervalo de uma hora para cada lavagem. Finalizada esta etapa, os *plugs* foram divididos ao meio e uma banda do mesmo foi colocada em placa de microdiluição e depois acrescentado 300µl de tampão DNS. Os mesmos foram dispostos em agitador de placas à temperatura ambiente por uma hora. Nesse período, foram realizadas 4 lavagens com intervalo de uma hora.

Em seguida a solução Tampão DNS foi desprezada e adicionado 200µl de tampão da enzima diluída (tampão sem enzima de restrição – Mix 1) e foi incubado por uma hora a 4°C (geladeira).

Foi retirado o tampão sem enzima de restrição e adicionado 200µl do Mix 2 (tampão da enzima + enzima de restrição *SmaI*) e incubado na geladeira por 2 horas.

Depois das duas horas foi retirado da geladeira e colocado em estufa 30°C por 12 horas. Após este período, a placa de microdiluição foi retirada da estufa, bloqueada com 200µl de solução tampão 1X TBE.

3.4.3 Preparação do gel de Agarose e corrida do gel

Foi montado o molde do gel de agarose preparado para corrida (Seaken Gold Agarose por PFGE) numa bancada reta e nivelada junto com o pente na barra de acrílico. Após solidificação do mesmo foi introduzido em cada orifício os *plugs* com DNA e em seguida fechados com o restante da agarose.

O gel foi colocado no equipamento de corrida eletroforética, previamente programado. O equipamento usado foi CHEF MAPPER XA SYSTEM da BIO-RAD.

PROGRAMAÇÃO.

BLOCO 1 : tempo de corrida = 12h, voltagem = 6,0volts/cm; ângulo = 120°C; tempo de pulso inicial = 1s e final = 5s; temperatura = 14°C

BLOCO 2: tempo de corrida = 12h, voltagem = 6,0volts/cm; ângulo = 120°C; tempo de pulso inicial = 15s e final = 30s; temperatura = 14°C.

A leitura do gel foi realizada no dia seguinte.

3.4.4 Critérios de interpretação

Os perfis de DNA foram considerados idênticos quando as bandas coincidiram e nas amostras que diferiram apenas por uma ou duas bandas bem definidas foram consideradas semelhantes ou variantes genotípicos de um mesmo clone.

A relação de similaridade entre dois isolados foi estimada com base nos critérios de interpretação para os padrões de fragmentos de bandas, produzidos pela digestão do DNA cromossômico com a enzima *Sma*I segundo TENOVER et al. (1995).

Isolados iguais: dois isolados foram considerados geneticamente idênticos quando os padrões de fragmentos de restrição presentes em ambos os isolados apresentaram o mesmo número de bandas com o mesmo peso molecular. A interpretação epidemiológica desses resultados é que os isolados foram considerados derivados de uma mesma cepa.

Isolados intimamente relacionados: um isolado foi considerado intimamente relacionado à cepa do surto quando seu padrão de bandas, obtido pela PFGE, diferiu do padrão da cepa do surto em duas a três bandas.

Isolados possivelmente relacionados: um isolado foi considerado possivelmente relacionado à cepa do surto quando as modificações consistiram em até dois eventos genéticos independentes, ou seja, observou-se 4 a 6 bandas diferentes, diferenças estas explicáveis por simples inserções ou deleções de DNA ou por ganho ou de perda de sítios de restrição.

Isolados não relacionados: um isolado é considerado não relacionado à cepa do surto quando o perfil do DNA cromossômico, obtido pela PFGE, difere do perfil da cepa do surto em 3 ou mais eventos genéticos independentes, o que correspondeu geralmente a diferenças de 7 ou mais bandas discordantes.

A análise comparativa dos perfis de MRSA obtida por PFGE foi inicialmente realizada visualmente e agrupados. A diferença de bandas definiu um perfil em relação ao outro. A construção do dendrograma, para verificação da relação genética entre as cepas foi realizada com auxílio do programa SPSS for Windows 10.0 (1999).

4. RESULTADOS

No período estudado foram isoladas 50 cepas de MRSA provenientes de hemoculturas distribuídas nos seguintes hospitais: 08 (16%) no Hospital 1 (privado), 04 (8%) no Hospital 2 (privado), 04 (8%) no Hospital 3 (público), 10 (20%) no Hospital 4 (público) e 24 (48%) no Hospital 5 (público). De acordo com os setores hospitalares, foi observado maior frequência de MRSA nas UTIs 29 (58%), sendo 19 (38%) na UTI geral e 8 (16%) na UTI neonatal, seguido da Clínica Médica 15 (30%). O hospital 5, apresentou maior número de casos de MRSA 24 (48%), distribuídos na UTI 14 (58,33%), clínica médica 7 (29,17%), clínica cirúrgica 2 (8,33%) e pediatria 1 (4,17%). Estes dados podem ser visualizados na Tabela 1.

No que diz respeito ao teste de sensibilidade aos antimicrobianos, todas as amostras bacterianas apresentaram sensibilidade a vancomicina e resistência a clindamicina e eritromicina. Quarenta e nove isolados (98%) demonstraram resistência a ciprofloxacina e sulfametoxazol/trimetoprima. Quanto a rifampicina e tetraciclina houve um percentual de sensibilidade diversificado em todos os hospitais (Tabela 2).

O estudo do DNA genômico por PFGE permitiu a caracterização de cinco padrões distintos de perfis cromossômicos de MRSA. Estes padrões foram designados com as letras maiúsculas de **A** até **E**. Todos os padrões encontrados estão representados nas Figuras 1 e 2.

Os subtipos, ou seja, amostras com padrões semelhantes, mas não idênticos, foram denominados com a mesma letra maiúscula, porém com número arábico após a letra (A1, A2, B1, B2, C1, C2, D1, D2, E1, E2). Isolados com padrão de bandas que diferiram de 2 a 3 bandas foram considerados intimamente relacionados (**IR**) (**A1, B1, C1, D1, E1**) e, isolados com padrão de bandas que diferiram de 4 a 6 foram denominados de possivelmente relacionados (**PR**) (**A2, B2, C2, D2, E2**).

Tabela 1: Distribuição de MRSA isolados de hemoculturas conforme os setores e os hospitais de origem no período de maio de 2006 a junho de 2007, em São Luis-MA

	<i>H 1</i>	<i>H 2</i>	<i>H 3</i>	<i>H 4</i>	<i>H 5</i>	TOTAL
SETORES	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
ClinicaCirúrgica	1 (12,5)			2 (20)	2 (8,3)	5
Clinica Médica	1 (12,5)	2 (50)	2 (50)	3 (30)	7 (29,2)	15
UTI geral	6 (75)	2 (50)	2 (50)	5 (50)	4 (16,6)	19
UTIneonatal					8 (33,3)	8
UTIpediátrica					1 (4,2)	1
UTIcardio					1 (4,2)	1
Pediatria					1 (4,2)	1
Total/Amostras	8 (16)	4 (8)	4 (8)	10 (20)	24 (48)	50 (100)

n = número de isolados; H1 e H2 (Hospitais privados); H3, H4 e H5 (Hospitais públicos)

Tabela 2: Perfil de resistência aos antimicrobianos de 50 cepas de MRSA isoladas de hemoculturas de três hospitais públicos e dois privados, no período de maio de 2006 a junho de 2007, em São Luis-MA.

ANTIMICROBIANOS	UNIDADES HOSPITALARES						Total n= 50
	H1 n= 8	H2 n= 4	H3 n= 4	H4 n= 10	H5 n= 24		
	R	R	R	R	R	R	
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Ciprofloxacina	8 (100)	4 (100)	4 (100)	10 (100)	23 (95,8)		49 (98)
Tetraciclina	6 (75)	2 (50)	3 (75)	10 (100)	20 (83,4)		41 (82)
SMZ+TMP	7 (87,5)	4 (100)	4 (100)	10 (100)	24 (100)		49 (98)
Vancomicina	0	0	0	0	0		0
Rifampicina	5 (62,5)	3 (75)	2 (50)	7 (70)	23 (95,8)		40 (80)
Clindamicina	8 (100)	4 (100)	4 (100)	10 (100)	24 (100)		50 (100)
Eritromicina	8 (100)	4 (100)	4 (100)	10 (100)	24 (100)		50 (100)

SMZ+TMP – Sulfametoxazol + Trimetoprim; H1 e H2 (Hospitais privados); H3, H4 e H5 (Hospitais públicos); R = resistente; S= sensível; n = número de isolados

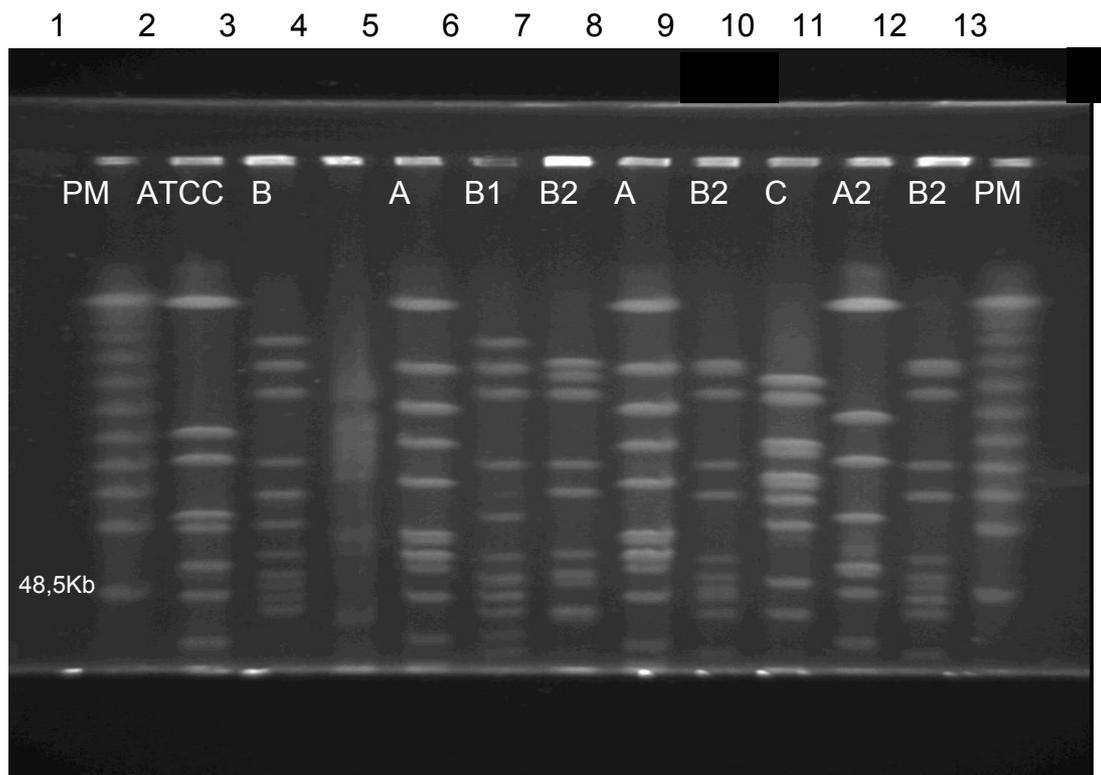


Figura 1 – Perfis de DNA genômico A, B e C após digestão com enzima *Sma*I por PFGE de cepas de MRSA isoladas de hemoculturas no aparelho CHEF-DRII da Bio Rad, e suas categorias relacionadas de dois hospitais públicos e dois privados no período de maio de 2006 a junho de 2007, em São Luis-MA.

- Canaleta 1: marcador de peso molecular Size Range: 50-1000Kb
(Ladder-New England- Biolabs)
 - Canaleta 2: ATCC – Cepa padrão de *Staphylococcus aureus*
 - Canaletas 5 e 8: perfis iguais (A) – UTIs (H1- privado e H5 público)
 - Canaleta 11: (A2) PR com A – UTI (H5 público)
 - Canaletas 9 e 12: (B2) PR com B – ambas da UTI (H5 publico)
 - Canaleta 3 : perfil B – UTI (H1 privado)
 - Canaleta 6 : (B1) IR com B - CM (H3 – público)
 - Canaleta 7 : (B2) PR com B, UTI (H2 – privado)
 - Canaleta 10: perfil genômico (C) – CM (H5- público).
- IR= intimamente relacionado diferentes; PR = possivelmente relacionados
Padrão de dimensão molecular: 48,5Kb

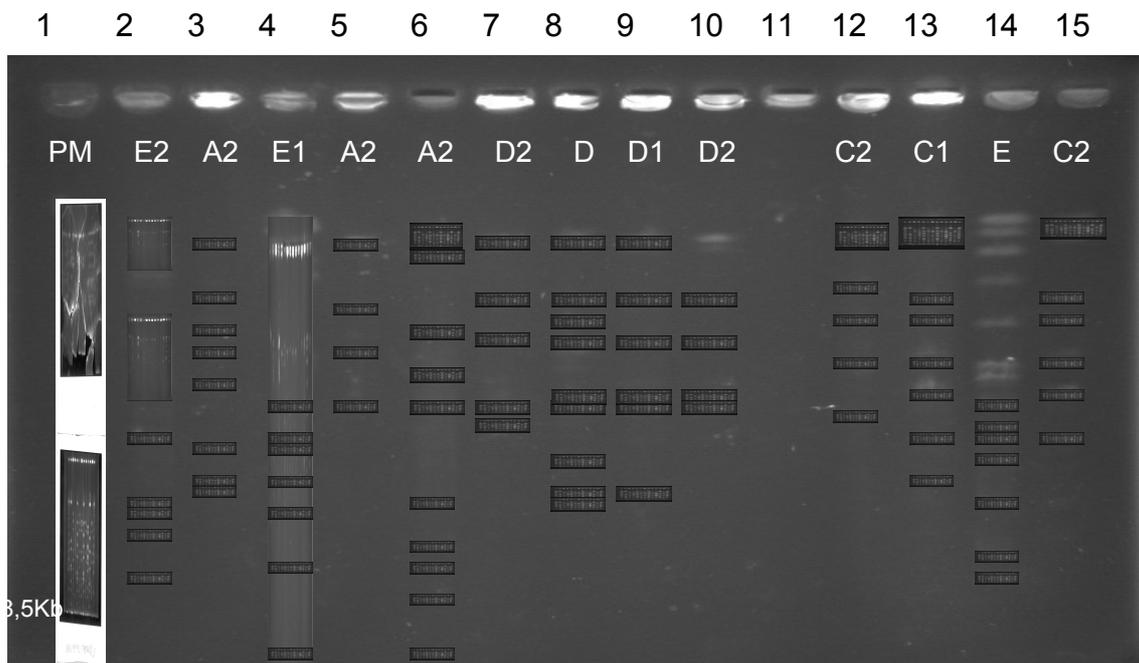


Figura 2 – Perfis de DNA genômico A, C, D e E após digestão com enzima *Sma*I por PFGE de cepas de MRSA isoladas de hemocultura no aparelho CHEF-DRII da Bio Rad, e suas categorias relacionadas de três hospitais públicos e um privado no período de maio de 2006 a junho de 2007, em São Luis-MA.

Canaleta 1: marcador de peso molecular Size Range: 50-1000Kb
(Ladder-New England- Biolabs)

Canaletas 2, 4 : (E2 e E1) PR e IR respectivamente com perfil (E) – CM e UTIN (H5-público)

Canaletas 12 e15: (C2) PR com perfil C - CC(H3 – público),UTI- (H4- público)

Canaleta 13: (C1) IR com perfil C – UTI (H4- público)

Canaletas 7 e 10 : (D2) PR com perfil D- CC (H1- privado), UTI (H3 - público)-

Canaleta 8: perfil D - CM – (H1-privado)

Canaleta 9: (D1) IR com perfil D- CM (H3- público)

Canaletas 3,5 e 6: A2 PR com perfil A – Ped (H5- público), UTI (H1- privado).

Padrão de dimensão molecular: 48,5Kb

Considerando os tipos e subtipos clonais encontrados neste estudo destacam-se: **A** 3 (6%), **B** 1(2%), **A1** 8(16%), **A2** 9(18%), **B1** 7(14%), **B2** 11(22%), **C** 1(2%), **C1** 1(2%), **C2** 2(4%), **D** 1(2%), **D1** 1(2%), **D2** 2(4%), **E** 1(2%), **E1** 1(2%), **E2** 1(2%).

Dentre as unidades hospitalares, observou-se que o Hospital 5 apresentou uma maior diversificação de clones (**A1, A2, B2, C, E2**) (Tabela 3).

Os hospitais da rede pública (H3, H4 e H5) apresentaram perfis genômicos comuns quando comparados com os da rede privada (H1 e H2), sendo que, o padrão clonal **C** foi encontrado somente nos hospitais da rede pública (Tabela 3).

Um dendrograma construído a partir de todos os perfis encontrados revelou a presença de 04 *clusters*, sendo que os dois primeiros estão mais correlacionados entre si e distantes do terceiro e quarto *cluster* (Figura 3). No primeiro e segundo *cluster* houve predomínio dos padrões **A** e **B** juntamente com os seus subtipos. No primeiro *cluster* encontramos 8(50%) amostras do perfil A e 5(31,25%) amostras do perfil **B** e no segundo *cluster* encontramos um total de 13(%) amostras, sendo que 6(46,15%) pertencem ao perfil **A** e 4 (30,8%) ao perfil **B**.

Evidenciou-se que o primeiro *cluster* apresentou amostras de MRSA provenientes de todos os hospitais estudados. No segundo *cluster* encontramos amostras isoladas do H4 e H5 ambos de rede pública. No terceiro *cluster* observamos 8 amostras do H5 (público) e 1 amostra do H3 (público). Com exceção do hospital H3, os demais hospitais também são observados no quarto *cluster*.

Os clones **A** e **B** estão disseminados em todos os *clusters*. O clone **C** encontra-se no segundo e terceiro *cluster*, enquanto o D no primeiro e quarto *cluster* e o perfil E observado no primeiro, terceiro e quarto *cluster* (Figura 3).

Tabela 3: Perfis genômicos de MRSA provenientes de hemoculturas identificados de dois hospitais privados e três públicos em São Luis-MA no período de maio de 2006 a junho de 2007.

	<i>H 1</i>	<i>H 2</i>	<i>H 3</i>	<i>H 4</i>	H 5
SETORES					
ClinicaCirúrgica	D2			C2	A1, B1, B2
Clinica Médica	D	A2	B1, D1	B1, B2	A1, A2, B2, C, E2
UTI geral	A, B, B1, A2, E, E2	B1, B2	A, E	B1, C1, D	A, A2, B1
UTIneonatal					A1, B1, B2, E1
UTIpediátrica					A
UTIcardio					A1
Pediatria					A2

H1 e H2 (Hospitais privados); H3, H4 e H5 (Hospitais públicos); A1, B1, C1, D1, E1(IR); A2, B2, C2, D2, E2 (PR);
IR= Intimamente relacionado(diferença de 2 a 3 bandas; PR= possivelmente relacionados (diferença de 4 a 6 bandas)
A, B, C, D, E = padrões genômicos distintos.

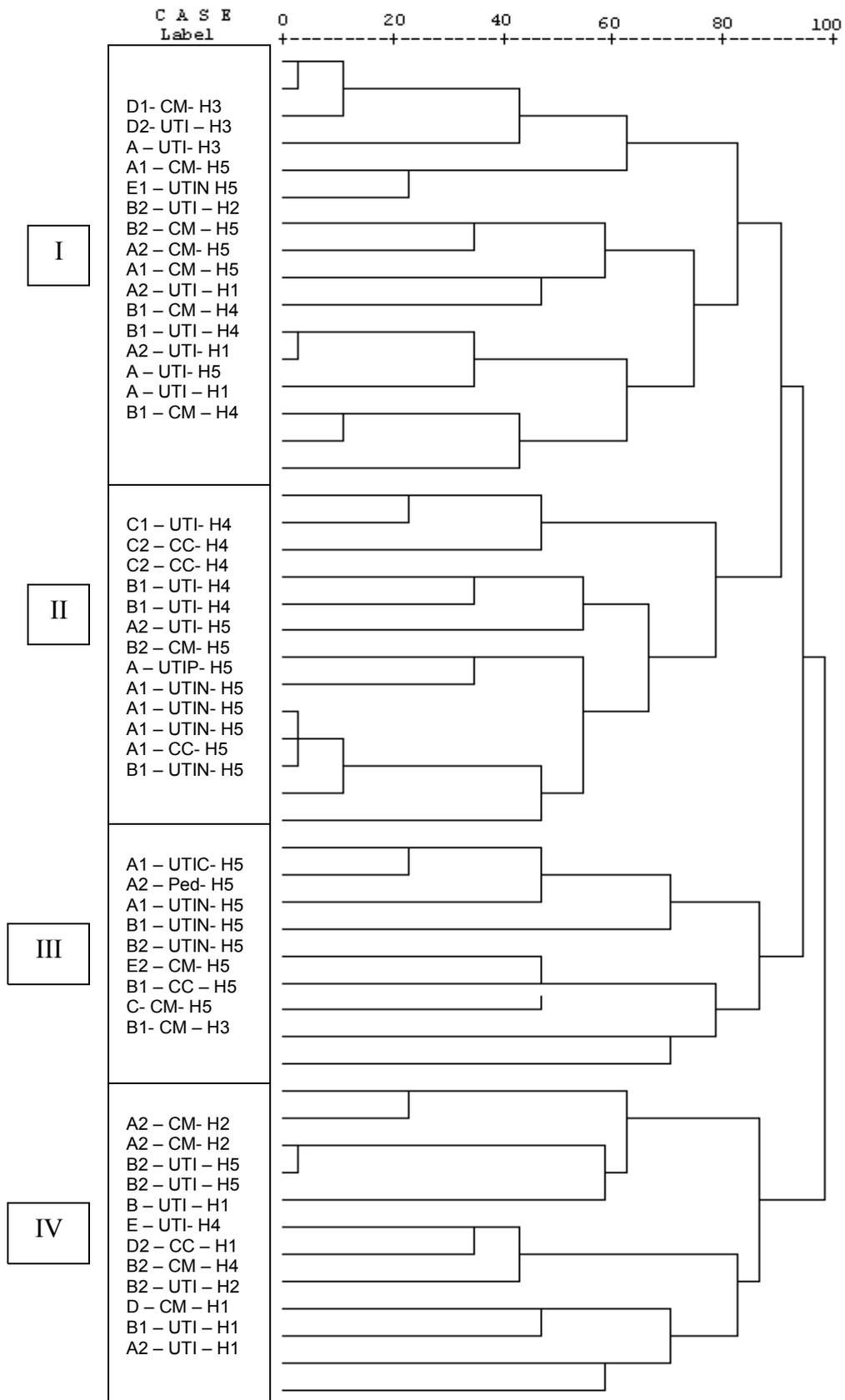


Figura 3: Dendrograma construído com base no coeficiente de similaridade de Dice ilustrando a relação das cepas de MRSA isoladas de hemocultura por PFGE em dois hospitais privados e três públicos no período de maio de 2006 a junho de 2007, em São Luis-MA.

Analisando-se a Tabela 4, verifica-se que 36 (72%) de isolados de MRSA apresentam o mesmo perfil de sensibilidade com padrões genéticos distintos. Por outro lado, alguns subtipos (A1, A2, B1, B2, C2, D e D2) apresentaram 2 a 4 perfis diferentes de sensibilidade para os seguintes antibióticos: rifampicina, tetraciclina, Sulfametoxazol/Trimetoprim e ciprofloxacina.

Tabela 4 : Relação de perfis de resistência aos antimicrobianos e tipagem molecular por PFGE de 50 amostras de MRSA isolados de hemoculturas de dois hospitais privados e três públicos no período de maio 2006 a junho de 2007, em São Luis-MA.

HOSPITAIS	PERFIL DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS									PFGE
	CIP	CLI	ERI	RIF	OXA	PEN	STX	VAN	TET	
H1	R	R	R	R	R	R	R	S	R	B
	R	R	R	R	R	R	R	S	R	A
	R	R	R	R	R	R	R	S	R	B1
	R	R	R	R	R	R	R	S	R	A2
	R	R	R	R	R	R	R	S	R	A2
	R	R	R	S	R	R	R	S	S	A2
	R	R	R	S	R	R	R	S	R	D2
	R	R	R	S	R	R	S	S	S	D
H2	R	R	R	R	R	R	R	S	R	B2
	R	R	R	R	R	R	R	S	R	B2
	R	R	R	S	R	R	R	S	S	A2
	R	R	R	R	R	R	R	S	S	A2
H3	R	R	R	S	R	R	R	S	R	B1
	R	R	R	R	R	R	R	S	R	A
	R	R	R	R	R	R	R	S	R	D1
	R	R	R	S	R	R	R	S	S	D2
H4	R	R	R	R	R	R	R	S	R	B1
	R	R	R	R	R	R	R	S	R	B1
	R	R	R	R	R	R	R	S	R	B1
	R	R	R	S	R	R	R	S	R	B1
	R	R	R	R	R	R	R	S	R	B1
	R	R	R	S	R	R	R	S	R	B2
	R	R	R	R	R	R	R	S	R	C2
	R	R	R	R	R	R	R	S	R	C1
	R	R	R	R	R	R	R	S	R	E
R	R	R	S	R	R	R	S	R	C2	

HOSPITAIS	PERFIL DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS									PFGE
	CIP	CLI	ERI	RIF	OXA	PEN	STX	VAN	TET	
	R	R	R	R	R	R	R	S	R	A
	R	R	R	R	R	R	R	S	R	B2
	R	R	R	R	R	R	R	S	R	C
	R	R	R	S	R	R	R	S	R	A2
	R	R	R	R	R	R	R	S	R	B1
	S	R	R	R	R	R	R	S	R	A1
	R	R	R	R	R	R	R	S	R	A1
	R	R	R	R	R	R	R	S	R	B2
	R	R	R	R	R	R	R	S	R	B2
	R	R	R	R	R	R	R	S	R	A1

H5	R	R	R	R	R	R	R	S	R	A1
	R	R	R	R	R	R	R	S	R	A1
	R	R	R	R	R	R	R	S	S	A1
	R	R	R	R	R	R	R	S	R	B1
	R	R	R	R	R	R	R	S	R	A
	R	R	R	R	R	R	R	S	R	B2
	R	R	R	R	R	R	R	S	S	B2
	R	R	R	R	R	R	R	S	R	A1
	R	R	R	R	R	R	R	S	S	A2
	R	R	R	R	R	R	R	S	R	A1
	R	R	R	R	R	R	R	S	R	B2
	R	R	R	R	R	R	R	S	R	E2
	R	R	R	R	R	R	R	S	R	A2
	R	R	R	R	R	R	R	S	R	E1

TOTAL

50

CIP = ciprofloxacina; CLI = clindamicina; ERI = eritromicina; RIF = rifampicina; OXA = oxacilina; PEN = penicilina; STX = Sulfametoxazol + Trimetoprim; VAN = vancomicina; TET = tetraciclina; R = resistente; S= sensível.

5 DISCUSSÃO

O MRSA representa atualmente um dos agentes multirresistentes de maior importância em vários países do mundo, incluindo o Brasil. São importantes agentes causadores de infecção da corrente sanguínea, sendo responsável por elevada morbidade e mortalidade, constituindo um problema constante para as instituições de saúde, principalmente em UTIs (MOREIRA,1998).

Neste trabalho, foram avaliadas 50 amostras de MRSA isoladas de hemoculturas. Os nossos dados mostram que o setor hospitalar com maior incidência de MRSA encontra-se na UTI geral com 21 (42%) e UTIN com 8 (16%) casos (Tabela 1). Em um estudo realizado no Hospital Universitário de Minas Gerais foi observado que 66 (11,4%) dos pacientes adquiriram infecção por bactérias multirresistentes entre elas, o MRSA nas UTIs (OLIVEIRA, et al,2006). Emilio Bouza (2004) verificou que 40% das infecções por MRSA ocorreram no setor de cuidados intensivos do Hospital Gregório Marañon,

Espanha. Dados apresentados em 2004 pelo *National Nosocomial Infection Surveillance System* (NNISS), mostraram que mais de 50% das infecções causadas por *S. aureus* em UTIs são por MRSA.

Este setor é considerado como um núcleo de emergência e disseminação de bactérias multirresistentes, devido a algumas características peculiares, tais como: unidade restrita/fechada, com alta frequência de contato profissional-paciente; maior possibilidade de transmissão cruzada de patógenos; alta pressão seletiva por antibióticos de largo espectro; maior possibilidade de contaminação do meio-ambiente (MURTHY,2001).

Os pacientes hospitalizados em UTIs são submetidos frequentemente a processos invasivos (quebra da barreira tecidual), incluindo cirurgias, utilização de medicamentos que debilitam a barreira química natural do indivíduo como antiácidos ou alteram a resposta imune como os corticóides e ainda a inserção de tubos, sondas e cateteres impedindo a eliminação de microrganismos pelo mecanismos fisiológicos (FRIDKIN,1999).

Evidenciamos um número considerável de isolados de MRSA na UTIN nesta pesquisa (Tabela 1). Rossi e colaboradores (2005), em uma revisão de literatura sobre o perfil das infecções estafilocócicas nas UTINs, relataram que as taxas gerais de infecção variam de 6 a 25%, sendo maior nos recém-nascidos (RN) pré-termos com peso menor que 1500g, principalmente nos menores que 1000g. Estes pacientes têm suas funções imunes celulares e humorais diminuídas, bem como a barreira física constituída pela pele ainda imatura, tornando as bactérias colonizadoras potencialmente invasoras. Pessoa e colaboradores (2004) realizaram uma pesquisa em três cidades do Brasil com sete Unidades Neonatais em 4.878 recém-nascidos, e verificaram que 22% desses pacientes adquiriram um episódio de infecção, sendo os RN de baixo peso mais acometidos.

Outros fatores de risco também estão associados à aquisição de IH em recém-nascidos como: antibioticoterapia de largo espectro, quebra da barreira anatômica à infecções: cateter intravenoso, sondas urinárias, intubação endotraqueal (BOUSSO et al,1995).

Verificamos que a Clínica Médica também apresentou um número significativo de casos de MRSA em alguns dos hospitais estudados 15 (30%)

(Tabela 1). As investigações relacionadas à ocorrência de IH muitas vezes se restringem a unidades de cuidados intensivos, fazendo com que o conhecimento do problema em outras unidades, como a de internação clínica seja desconhecida. Oliveira e colaboradores no ano de 2006, verificaram que 94,7% dos pacientes estudados foram admitidos para tratamento clínico, a maioria dos mesmos (71,1%) procederam da unidade de pronto-atendimento da própria instituição. Os autores destacaram a importância no contexto da vigilância epidemiológica de estudos relacionados ao diagnóstico das IH em unidades clínicas, onde observaram uma elevada ocorrência de IH em unidade considerada não-crítica inicialmente, com risco ainda mais elevado para pacientes cuja internação foi superior a dez dias.

O Hospital 5, instituição de ensino de grande porte e da rede pública apresentou os maiores índices de MRSA 24 (48%). Para alguns pesquisadores as taxas de IH variam de acordo com o tipo de vigilância empregada, bem como, com o porte e categoria de cada hospital. São, geralmente, mais altas nos hospitais de grande porte e nos de ensino. Estes hospitais normalmente internam pacientes mais graves, são geralmente hospitais de referência na região onde se localizam e o tempo de permanência dos pacientes é mais prolongado tendo o risco de adquirir IH (GREENE,1983; HALEY,1985). É importante ressaltar que nos hospitais de ensino, há um número elevado de pessoas, exercendo diversas atividades, desde funcionários da instituição, até estudantes de diferentes níveis e cursos, gerando crescimento de fluxo de entrada e permanência de pessoas no hospital (PEREIRA,1996).

Existem ainda alguns fatores que relacionam os hospitais de ensino a serem mais vulneráveis à IH. O tipo de clientela que procura esses hospitais são pacientes de classe econômica mais baixa, que além da doença específica, traz ainda deficiências decorrente do seu estado nutricional e higiênico (PEREIRA,1996). Convém lembrar que este hospital apresenta maior número de leitos quando comparado com os demais hospitais estudados, assim como, é o único de referência no estado do Maranhão e recebe pacientes tanto do interior como de outros hospitais da capital.

Com relação ao teste de sensibilidade aos antimicrobianos, nosso estudo apresentou índices elevados de resistência a diversas drogas testadas e 100% de sensibilidade para vancomicina, confirmando que este antimicrobiano ainda constitui a opção de escolha para o tratamento de MRSA. Vários autores são unânimes em apontar a vancomicina como a alternativa mais adequada para o tratamento de MRSA. Este antibiótico é especificamente indicado para o tratamento de infecções estafilocócicas sistêmicas em pacientes alérgicos às penicilinas e com MRSA. (HIRAMATSU, 1998; ALBANESE,2000; WOODE,1996). Conforme já foi observado, a resistência à oxacilina vem sempre acompanhada da resistência por diversos outros antibióticos (LEE et al., 1996; JORGENSEN et al., 1996).

A resistência de estirpes *S. aureus* hospitalares aos antimicrobianos é um problema antigo especialmente em relação à oxacilina. Nos dias correntes a quase totalidade das cepas hospitalares são resistente à oxacilina ou meticilina (MRSA ou ORSA). O uso excessivo de agentes antimicrobianos e a baixa conformidade com os protocolos/medidas de controle de infecção têm sido identificados como principais fatores para emergência de resistência bacteriana (OLIVEIRA,2006).

O conhecimento dos microrganismos, com os seus respectivos padrões de susceptibilidade, é importante instrumento de orientação para a terapêutica antimicrobiana empírica inicial. Diagnóstico tardio e tratamento inicial inadequados já foram associados ao pior prognóstico (GUILARDE, et al, 2007).

A presença de alguns genes de resistência que estas bactérias podem ter talvez explicasse o elevado percentual de resistência às drogas testadas. A aquisição de certos tipos de *SCCmec*, além de introduzir o determinante de resistência a meticilina/oxacilina, também introduz outros determinantes de resistência presente em plasmídios, seqüência de inserção e transposons no genoma do *S. aureus*, permitindo assim a disseminação de clones mais bem adaptados à pressão seletiva exercida por antimicrobianos no ambiente hospitalar (ITO et al, 2003; TRINDADE et al, 2004).

A caracterização molecular das amostras isoladas de hemoculturas, nos permitiu identificar a distribuição clonal de 5 padrões

genômicos distintos (**A**, **B**, **C**, **D**, **E**) em vários setores dentro dos hospitais analisados. Optamos pelo método de PFGE, tendo em vista o mesmo ser considerado em diversos estudos descritos na literatura como um método confiável para a tipagem de MRSA. Além disto, esta técnica tem se mostrado capaz de produzir fragmentos distintos para cepas não correlacionadas epidemiologicamente (MONTESINOS et al, 2002).

Observamos que os clones **A** 20 (40%) e **B** 19 (38%) e suas categorias geneticamente relacionadas estiveram presente em todos os hospitais (Tabela 3). É provável que vários fatores tenham contribuído para que estes clones de MRSA estejam circulando nestes hospitais. Entre eles, podemos mencionar a capacidade de colonização, multiplicação e invasão da bactéria na mucosa do hospedeiro, assim como, a capacidade de sobrevivência em ambientes hospitalares podem levar a disseminação dos mesmos. Da mesma maneira, outros procedimentos podem facilitar a distribuição destes clones, tais como: a superlotação nos hospitais, transferência de pacientes entre os hospitais e algumas vezes em diferentes cidades, a falta de controle no uso abusivo de antibióticos de largo espectro (PANNUTI et al,1995; WEY,1995; SADER et al,1993).

Identificamos a presença de perfis de sensibilidade diferentes pertencendo ao mesmo padrão genômico (Tabela 4). Isto pode ser explicado pelo fato de que o *Staphylococcus aureus* desenvolve mecanismos de resistência por mutações ou pela aquisição de genes de resistência de bactérias da mesma espécie ou de espécies diferentes. A aquisição de genes de resistência frequentemente envolve a inativação ou a destruição da droga, sendo transmitida por plasmídios e transposons (BERNARD,2004; SANTOS, 2007).

O Hospital 5 (H5), apresentou uma maior diversificação de perfis genômicos, especialmente na Clínica Médica e UTIN. Pereira (1996) e Moreira (1998), relatam que o tempo de permanência em hospitais de ensino costumam ser maior que em outras instituições, por serem centros de referências e receberem pacientes com maior gravidade, o que aumenta a chance de adquirir IH e que as maiores taxas de infecção hospitalar são observadas em pacientes nos serviços de oncologia, cirurgia e UTIs.

Vários estudos mostram a disseminação clonal de cepas SARO inter hospitalar e relatam que quando uma cepa endêmica é introduzida no hospital, torna-se difícil de ser erradicada, resultando no aumento da incidência de infecções nosocomiais por SARO (BOYCE, 1996; SALMENLINA et al., 2001; WANG et al., 2002; SAMY et al., 2003; MCDUGAL et al., 2003; HUANG et al., 2004). É importante a definição do comportamento epidemiológico dos microrganismos de transmissão hospitalar no que se refere à disseminação de um mesmo clone, sendo que essa informação pode direcionar medidas de controle da disseminação destes microrganismos nas diferentes unidades de um hospital.

De acordo com critérios estabelecidos por Tenover et al (1995) para interpretação dos perfis genômicos e determinação da relação genética das cepas bacterianas, os nossos resultados sugerem que os perfis **IR** e **PR** provavelmente sejam parte dos mesmos clones que se disseminaram não só entre os setores de cada hospital como também entre os hospitais.

Este é o primeiro trabalho no nosso estado que identifica os perfis genômicos de MRSA que circulam em alguns hospitais públicos e da rede privada. Esta pesquisa evidencia a importância das técnicas de tipagem molecular em surtos hospitalares.

O encontro de isolados de MRSA com perfis idênticos e semelhantes entre os setores hospitalares e nos diversos hospitais nos sugere que esteja ocorrendo uma transmissão destas cepas entre os pacientes, apontando a necessidade enérgica de implantação de medidas de controle (SADER et al, 1995).

Os resultados obtidos nesta pesquisa nos indicam que o estudo genético exerce um papel importante no delineamento das infecções por *S. aureus*, considerando que só o antibiograma não forneceria parâmetros suficientes para uma precisa relação epidemiológica entre as amostras dos portadores de MRSA.

6 CONCLUSÃO

- a) A caracterização molecular por PFGE das amostras de MRSA isoladas de hemoculturas, nos permitiu identificar cinco perfis genômicos distintos (A, B, C, D, E)
- b) O perfil genômico C, está presente somente nos hospitais de rede pública;
- c) Considerando os setores hospitalares estudados, a Unidade de Terapia Intensiva apresentou maior número de casos de MRSA, com predomínio dos perfis genômicos A e B;
- d) O dendrograma constituído a partir dos perfis genômicos identificados revelou a existência de quatro clusters, sendo os dois primeiros geneticamente mais próximos entre si quando comparados com o terceiro e quarto.

- e) Detectamos altos índices de resistência aos antimicrobianos para todas as amostras de MRSA isoladas do sangue, no entanto, alguns isolados mostraram-se sensíveis para ciprofloxacina, sulfametoxazol/trimetoprima, rifampicina e tetraciclina. Todas as amostras foram sensíveis para vancomicina.
- f) O estudo genético exerce um papel importante no delineamento das infecções por *S. aureus*, considerando que só o antibiograma não forneceria parâmetros suficientes para uma precisa relação epidemiológica entre as amostras dos portadores de MRSA.

REFERÊNCIAS

ALBANESE, J. Cerebrospinal fluid penetration and pharmacokinetics of vancomycin administered by continuous infusion to mechanically ventilated patients in an intensive care unit. **Antimicrob. Agents Chemother**, v.44, p.1356-1358, 2000.

ASENSIO, A. et al., Colonization and infection with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Associated factors and eradication. **Rev. Infect Control Hosp Epidemiol** 1996; 17:20-8.

BANNERMAN, T.L. et al., Pulsed-field gel electrophoresis as a replacement for bacteriophage typing of *Staphylococcus aureus*. **J. Clin. Microbiol.** v.33, p.551-555, 1995.

BERNARD, L. et al., Comparative analysis and validation of different assays for glycopeptide susceptibility among methicillin-resistant *S. aureus* strains. **J Microbiol Meth**, v.57, p.231-9, 2004.

BIRREN, B.; LAI, E. Rapid pulsed separation of DNA molecules up to 250kb. *Nucleic Acid Research*. **Oxford J**. Cambridge, v.22, n.24, p.5366-70, 1994.

BOUSSO, A. et al., Infecção Hospitalar em Recém Nascidos. **Rev. Pediatria** São Paulo, 17(1): 10-37,1995.

BOYCE, J.M. MRSA patients: proven methods to treat colonization and infection. **Journal Hosp. Infect**; 48: S9-S14, 2001.

BOYCE, J M. Update on resistant *Staphylococcus aureus* infections. **Rev. Clin Upt Infec Dis**; 6(2): 1-4, 2003.

BOYCE, J.M. Methicillin – resistant *Staphylococcus aureus* in Hospitals and long-term care facilities microbiology, epidemiology and preventive measures. **Infection Control and Hospital Epidemiology**. v. 13, p. 725-737, 1992.

CAVALCANTI, S. M.de M. et al., Estudo comparativo da prevalência de *Staphylococcus aureus* importado para as unidades de terapia intensiva de hospital universitário, Pernambuco, Brasil. **Rev Bras Epidemiol**, 9(4): 436-46, 2006.

CDC: ***Staphylococcus aureus* resistant to vacomycin-** United States. *MMWR* 51:565-7, 2002.

CHAMBERS, H. F. Methicillin- resistance in Staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. **Clin. Microbiol. Rev.**, 10:781-91, 1997.

CHAMBERS, H. F. Evaluation of cefbiprole in a rabbit modelo f aortic valve endocarditis due to methicillin-resistant and vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. **Antimicr Agents Chemother**, 49: 884-88, 2005.

CHANG, H. R. et al., Use of pulsed-field gel electrophoresis in the analysis of recurrent *Staphylococcus aureus* infections in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. **Am J. Nephrol** v. 20, p. 463-467, 2000.

CONTERNO, L.O; WEY, S.B; CASTELO, A. Risk factors for mortality in *Staphylococcus aureus* bacteremia. **Rev. Infect Control Hosp Epidemiol.**, 19:32-7, 1998.

CRISANTO, P.T. **Comparação do Linezolid com a Vancomicina no tratamento de Infecções Nosocomiais por SAMR**. A.P.F.H. – Boletim informativo n. 67, p. 15, maio, 2003.

DANTAS, T.; NOUÉR, S. Emergência de transmissão hospitalar de *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (MRSA) associado com infecção comunitária. **Revista de Prática Hospitalar**, ano IX, n. 51, p. 41-43, Curitiba, mai/jun, 2007.

DRESSER, L.D. et al., The pharmacologic and bacteriologic properties of oxazolidinones a new class of synthetic antimicrobials. **Ann Pharmacotherapy**. USA, v.18, p. 456-62, may/june,1998.

FRIDKIN, S.K; GAYNE, R.P. Antimicrobial resistance in intensive care units. **Clin Chest Med Rev.**, 20(2), p. 303-14, jun, 1999.

FRIDKIN, S.K; HAGEMAN,J.C. et al., Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease in three communities. **N Engl J Med**. 352:1436-44, 2005.

GRAHAM P. L. Staphylococcal and enterococcal infections in the neonatal intensive care unit. **Semin Perinatol**, 26: 322-31, 2002.

GREENE, W.H. Recent development in nosocomial infections and their control. **J. Med**, Westbury, v.14, p.253-70,1983.

GUILARDE, A. O. et al., Bacteremias em pacientes internados em Hospital Universitário. **Rev. Assoc Med Bras**, 53(1): 34-8, 2007.

HALEY, R.W. et al., Identifying patients at high risk of surgical wound infection. **Am. J. Epidemiol**, Baltimore, v.121, n. 2, p.206-15, 1985.

HEO, S.T. et al., Analysis of Methicillin Resistance among *Staphylococcus aureus* Blood Isolates in an Emergency Department. **J. Korean Med Sci**, 22:682-6, 2007

HIRAMATSU, K. et al., The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Trends. Microbiol**. v.9, p.486-493, 2001.

HIRAMATSU, K. Vancomycin resistance in Staphylococci Drug Resistance. **Updates**, v. 1, p. 135-50, 1998.

HITOSHI, K. et al., Increased glycan chain length distribution and decreased susceptibility to moenomycin in a vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* mutant. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.46, n.1, p. 75-81, January, 2002.

HUANG, Y.C. et al., Molecular Epidemiology of Clinical Isolates of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Taiwan. **J. Clin. Microbiol**. v. 42(1), p. 307-310, jan,2004.

ITO, T. et al., Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. **Drug Resist Updates**, 6:41-52, 2003.

JOLLY, J.; GOLDBERG, M. Methicillin resistance in Staphylococci: an evaluation of conditions for detection. **Med. Lab. Sci**. v. 46, p.2-5, 1989.

JORGENSEN, M. et al., Typing multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* : conflicting epidemiological data produced by genotypic and phenotypic methods

clarified by phylogenetic analysis. **J. Clin. Microbiol.** v. 34(2), p.398-403, February, 1996.

KONEMAN, M.D. et al., **Diagnostico Microbiológico** – texto y atlas color, 5. ed. Ed. Panamericana, Buenos Aires- Argentina 2003.

KREISWIRTH, B. et al., Evidence for a clonal origin of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Science Rev.** v. 259, p.227-230, 1993.

LEE, Y. L.; GUPTA, G.; CESARIO, T.; LEE, R.; NOTHVOGEL, S.; NASSAR, J.; FLIONIS, L. et al. - Colonization by *Staphylococcus aureus* resistant to Methicillin and Ciprofloxacin during 20 month's surveillance in a private skilled nursing facility. **Infect. Control Hosp Epidemiol**, v.17(10), p.649-653, 1996.

LOPES, H.V. CA-MRSA: um novo problema para o infectologista. **Rev. Panam Infectol.**, v.7(3), p. 34-36, 2005.

LOPES, H.V. Tigeciclina: nova arma antibacteriana. **Rev. Panam Infectol.** v.8(1), p. 45-46, 2006.

LOUREIRO, M.M. et al., Molecular Epidemiology of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* Isolated from Newborns in a Hospital in Rio de Janeiro, Brazil. **Mem.Inst Oswaldo Cruz.** v.95(6), p. 777-782. Rio de Janeiro, 2000.

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

McDOUGAL, L. K. Pulsed-Field Gel Electrophoresis Typing of Oxacillin Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from the United States: Establishing a National Database. **J Clin Microbiol**, v. 41 p.5113-5120; 2003.

MACFADDIN, J.F. Biochemical tests for identification of medical bacteria. 3^a ed. Philadelphia: Lawrence McGraw, Lippincott Williams e Wilkins, USA, 2000, 901p.

MACHADO, A. R.L. Novidades em Antimicrobianos. **Rev. Práticas Hospitalares**, anoVII, n.38, mar/abr 2005.

MAMIZUKA, E.M.; OLIVEIRA, G. Isolamento de cepas de *Staphylococcus aureus* com sensibilidade reduzida a vancomicina em hospitais brasileiros. **Pharm. Bras**, v.6, p.7-8, 2000.

MATHEWS, P.R. et al., The cloning of chromosomal DNA associated with methicillin and other resistances in *Staphylococcus aureus*. **J. Gen. Microbiol.** v. 133, n.7, p.1919-29, jul,1987.

MOREIRA, M. et al., Efeito da infecção hospitalar da corrente sanguínea por *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina sobre a letalidade e o tempo de hospitalização. **Rev. Assoc Med Bras.** São Paulo, 44(4):263-8, 1998.

MONTESINOS, I. Epidemiologic genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by Pulsed-Field gel Electrophoresis at a University Hospital and Comparison with Antibiotyping and Protein A and coagulase gene Polymorphisms. **J. Clin. Microbiol.** v. 4, n.6, p. 2119-2125, June, 2002.

MURRAY, P.R. et al., **Microbiologia Prática: Roteiro e Manual.** Atheneu. São Paulo, 2002.

MURTHY, R. **Implementation of strategies to control Antimicrobial resistance.** Ches. 119 suppl 2: 405-11, Feb, 2001.

NAIMI, T. S. et al., Comparison of community and health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. **JAMA**, 290, 2976-84, 2003.

OLIVEIRA, A. C. et al., Infecções hospitalares em unidade de internação de um hospital universitário. **Rev. Enferm UFPE.** Recife, Pernambuco, 1 (2): 187-91, 2007.

OLIVEIRA, A.C. et al., Infecções hospitalares microbiana em Unidade de Cuidado Intensivos de um hospital universitário. **Rev. Braz Nurs.** Niterói, v.5 , n.2, abr, 2006.

OLIVEIRA, G.A. et al., Avaliação da tolerância à vancomicina em 365 cepas hospitalares de *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina. **J Bras Patol.** São Paulo, v.37, n.4, p.239-46, 2001.

O'NEILL, G.L.; GIL, S.A. Identification and Characterization of Phage variants of a strain of Epidemic Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (EMRSA-15). **J. Clin. Microbiol.** v.39, n.4, p.1540-1548, April, 2001.

PANNUTI, C.S.; GRINBAUM, R.S. An overview of nosocomial infection control in Brazil. **Infect Control Hosp Epidemiol. Rev.**, 16: 170-74, 1995.

PEREIRA, M.S.; MORIYA, T.M.; GIR, E. Infecção hospitalar nos hospitais escola: uma análise sobre seu controle. **Rev. Latino am enferm.** Minas Gerais, 4(1): 45-62, 1996.

PLOUFFE, J.F. Emerging therapies for serious gram-positive bacterial infections: a focus on Linezolid. **Clin. Infect. Dis.** v. 31, p. 144-149, 2000.

PESSOA, S.C.L. et al., Healthcare Associated infections among neonates in Brazil. **Infect Control Hosp Epidemiol Rev**, 25: 772-7, 2004.

ROSSI, F.; ANDREAZZI, D.B. **Resistência Bacteriana: Interpretando o Antibiograma.** Editora Atheneu. São Paulo, 2005.

ROSSI, F. de S.; CECCON, M. E. J.R.; JORNADA, V. L. Infecções estafilocócicas adquiridas nas unidades de terapia intensiva neonatais. **Rev. Pediatria.** São Paulo, 27(1), 38-47, 2005.

SADER, H.S. et al., Oxacillin and quinolone-resistant *Staphylococcus aureus* in São Paulo, Brazil: a multicenter molecular epidemiology study. **Infect. Control Hosp. Epidemiol. Rev.** São Paulo, 14:260-64,1993.

SADER, H. S. et al., Evaluation of Interhospital Spread of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in São Paulo, Brasil, using Pulsed-Field Gel electrophoresis of Chromosomal DNA. **Infect Control Hosp Epidemiol. Rev.** São Paulo, 15(5):320-323, 1995.

SADER, H.S. et al., Four-year evaluation of frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility patterns of bacteria from bloodstream infections in Latin American medical centers. **Diagn Microbiol infect Dis.J.** 44:273-80, 2002.

SADER, H.S. Novas Perspectivas na Terapia Antimicrobiana. **Rev Prática Hospitalar.** São Paulo, ano VII, n.41, set/out, 2005.

SAFDAR, N.; MARKI, D.G. The Commonality of Risk factors for Nosocomial colonization and infection with Antimicrobial- Resistant *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus*, gram-negativo bacilli, *Clostridium difficile* and *Candida*. **Ann. Intern. Med.** USA, v.136, p.834-844, june,2002.

SALMENLINNA, S.; VUOPIO-VARKILA, J.; JONES, R.N. - Recognition of Two Groups of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains Based on Epidemiology, Antimicrobial Susceptibility, Hypervariable-Region Type, and Ribotype in Finland. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, p. 2243-2247, 2001.

SAMY, A., et al., Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: A Problem in the Burns Unit. **Egyptian of Journal Plastic and Reconstructive Surgery**, 27:1-10, 2003.

SALOMÃO, R. et al., Nosocomial and community acquired bacteremia: variables associated with outcomes. **Rev. Paul Med.** São Paulo, 111: 456-61, 1983.

SANTOS, A. L. et al., *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Rev. Patol. Lab.** Rio de Janeiro, v.43, n.6, dezembro, 2007.

SANTOS, F.L. et al., Analysis of the clonal diversity of *Staphylococcus aureus* methicillin-resistant strains isolated at João Pessoa, State of Paraíba, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** João Pessoa, 5:101-5, 1996.

SATTLER, C. A, MASON, E. O; KAPLAN, S.L. Prospective comparison of risk factors and demographic and clinical characteristics of community-acquired, methicillin-resistant versus methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* infection in children. **Pediatr Infect Dis J.**, 21:910-7, 2002.

SHIOMORI. T. et al., Evaluation of bedmaking-related airborne and surface methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* contamination. **J. Hosp. Infect.** 50, 30-35, 2002.

SOUZA, M.V.; REIS, C.; PIMENTA, F.C. Revisão sobre a aquisição gradual de resistência de *Staphylococcus aureus* aos antimicrobianos. **Rev. Patol. Trop.** v. 34, p.27-36, jan/abr, 2005.

STRUELLENS, M.J. et al., Epidemiologic typing and delineation genetic relatedness of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by macrorestriction analysis of genomic DNA by using pulsed-field gel electrophoresis. **J. Clin. Microbiol.** v. 30, p. 2599-2605, 1992.

TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococos, do enterococos e do pneumococo aos antimicrobianos. **Rev. Soc. Brasil Med. Trop.**, Uberaba, v. 33, n. 3, maio/jun, 2000.

TAVARES, W. **Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Antiinfeciosos.** 3. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2001. v. 1. 1216 p.

TEIXEIRA, L. A. et al., Geographic spread of epidemic multiresistant *Staphylococcus aureus* clone in Brazil. **J. Clin. Microbiol.** v. 33, p.2400-2404, sept, 1995.

TENOVER, F.C. et al., Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **J. Clin. Microbiol.** 33: 2233-9, 1995.

TRINDADE, P. A. et al., Molecular techniques for MRSA typing: Current issues and perspectives. **Braz. J. Infect. Dis.** São Paulo, v. 7,n. 1, 2003.

VELÁSQUEZ, J. et al., Vigilancia de la resistencia de *Staphylococcus aureus* a la oxacilina-vancomicina y patrones de coresistencia. **Rev. Per. Soc Med Intern.** , Lima, v.15, n.4, 2002.

WANG, J. T. et al., - Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in Taiwan. **Diag Microbiol and Infec. Dis.**, 42: 199-203, 2002.

WATANAKUNAKORN. et al., *Staphylococcus aureus* bacteremia: significance of hyperbilirubinemia. **Scand. J. Infect. Dis.** 19:195-203, 1987.

WEINSTEIN M.P. et al., The clinical significance of positive blood cultures in the 1990s: a prospective comprehensive evaluation of the microbiology, epidemiology, and outcome of bacteremia and fungemia in adults. **Clin. Infect. Dis. Rev.** 24,584-602, 1997.

WEY, S.B. Infection control in a country with annual inflation of 3,600%. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.** v.16, p. 175-8, 1995.

WILSON, P. Atualização em MRSA : ameaças presentes e futuras. Anais **16^a European Congress of Clinical and Microbioly.** Nice, França,2006.

WOODFORD, N. Epidemiology of the genetic elements responsible for acquired glycopeptide resistance in enterococci. **Microb. J. Dry. Resist.** v.7, p.229-36, 2001.

WOODE, M.J. The comparative efficacy and safety of teicoplanin and vancomycin. **J. Antimicrob. Chemother.** v.37, p. 209-222, 1996.

ANEXO I

(Meios de cultura, soluções e reagentes)

Os meios de cultura, obtidos sob forma desidratada foram preparados de acordo com as recomendações dos fabricantes.

REAGENTES PARA PFGE:

Soluções estoques:

- A) EDTA 0,5 M, pH 7,0
186,12g de EDTA para 1 L de água Milli-Q. Acertar pH 7,0. Autoclavar
- B) EDTA 0,5 M, pH8,0
186,12g de EDTA para 1L de água Milli-Q . Acertar o pH para 8,0. Autoclavar.
- C) EDTA 625 mM, pH 9,3
232,65g de EDTA para 1L de água Milli-Q. Acertar o pH para 9,3. Autoclavar.
- D) EDTA 50 mM, pH8,0
18,61g de EDTA para 1L de água Milli-Q. Acertat o pH para 8,0. Autoclavar.
- E) Tris base 1M, pH7,0
121,14g de trisma base para 1L de água Milli-Q. Acertar pH para 7,0. Autoclavar.

F) Tris base 1M, pH 8,0

121,14g de trisma base para 1L de água Milli-Q. Acertar pH para 8,0. Autoclavar.

G) Cloreto de magnésio 1M

9,25g de cloreto de magnésio para 100mL de água deionizada. Autoclavar.

H) N-lauril sarcosil 5%

5g de N-lauril sarcosil para 100mL de água deionizada. Não autoclavar.

Soluções de uso:

1) Agarose 2%

<u>Reagente</u>	<u>V/massa</u>
Agarose low melting	5g
Água destilada	250mL

2) Tampão TBE 10x

Pesar os reagentes e dissolver-los em 2000mL de água destilada.

<u>Reagente</u>	<u>massa</u>
EDTA	14,8g
Trisma base	484,4g
Ácido Bórico	247,2g
Água destilada	qsp 4L

3) Tampão TBE 0,5x

<u>Reagente</u>	<u>volume</u>
TBE 10x	2,5mL
Água destilada	47,5mL

4) Tampão DNS

Adicionar os volumes em balão volumétrico, completar o volume para 250mL. Autoclavar e armazenar a temperatura ambiente.

<u>Reagente</u>	<u>volume</u>
Trisma base 1M, pH8,0	5,0mL
Cloreto de magnésio 1M	250uL
Água destilada	qsp 250mL

5) Tampão EC

Pesar os reagentes sólidos, dissolver com 200mL de água destilada.

Deixar a solução em repouso para que ocorra dissolução total dos reagentes. Em balão volumétrico adicionar os reagentes dissolvidos aos volumes de soluções estoque e completar o volume para 500mL. Filtrar membrana filtrante.

<u>Reagente</u>	<u>volume</u>
EDTA 0,5M, pH7,0	5,0mL
EDTA 0,5M, pH8,0	5,0mL
Trisma base 1M, pH 7,0	1,5mL
Trisma base 1M pH 8,0	1,5mL
NaCl	29,22g
N-lauril sarcosil	2,5mL
Brij 58	2,5mL
Deoxicolato de sódio	1g
Água destilada	qsq 500ml

6) Tampão ES

Adicionar os volumes em frasco de vidro e filtrar membrana filtrante.

<u>Reagente</u>	<u>volume</u>
EDTA 625mM, pH 9,3	40mL
N-lauril sarcosil 5%	10mL

7) Tampão CHEF TE 1x

Adicionar em balão volumétrico e autoclavar.

<u>Reagente</u>	<u>volume</u>
EDTA 0,5 M, pH7,0	5,0 mL
EDTA 0,5M, pH 8,0	5,0mL
Trisma base 1M, pH 7,0	2,5mL
Trisma base 1M, pH 8,0	2,5mL
Água destilada	qsp 50mL

8) Proteinase K 20mg/mL

100mg dissolver com 10mM Tris HCl pH7,5, 20mM de CaCl e 50% de glicerol

9) Lisostafina

Adicionar 1mL de água Milli-Q estéril ao pó de lisostafina.

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](#)