

ALINNE GUIMARÃES DE SOUZA

Caracterização fenotípica e molecular de amostras de *Staphylococcus* coagulase negativo isoladas de infecções da corrente sanguínea de pacientes de dois hospitais gerais da cidade de São Paulo

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo

2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

ALINNE GUIMARÃES DE SOUZA

Caracterização fenotípica e molecular de amostras de *Staphylococcus* coagulase negativo isoladas de infecções da corrente sanguínea de pacientes de dois hospitais gerais da cidade de São Paulo

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Campos Pignatari

Co-orientadora: Dr^a. Marinês Dalla Valle Martino

Este trabalho foi realizado com auxílio financeiro fornecido pelo Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

São Paulo

2009

DE SOUZA, Alinne Guimarães

Caracterização fenotípica e molecular de amostras de *Staphylococcus* coagulase negativo isoladas de infecções da corrente sanguínea de pacientes de dois hospitais gerais da cidade de São Paulo. Alinne Guimarães de Souza - São Paulo, 2009. xi, 88f.

Tese (Mestrado) - Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Infectologia.

Título em inglês: Genetic and phenotypic characterization of coagulase negative staphylococci isolated from bloodstream infections in two São Paulo city hospitals.

Key-words: *Staphylococcus* coagulase negativo, infecção hospitalar, hemocultura, antimicrobianos, resistência bacteriana, biologia molecular.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA

DISCIPLINA DE INFECTOLOGIA

Chefe do Departamento:

Prof. Dr. Angelo Amato Vincenzo de Paola

Coordenador do curso de Pós-graduação:

Prof. Dr. Ricardo Sobhie Diaz

São Paulo

2009

*"A ciência serve para nos dar uma idéia
de quão extensa é a nossa ignorância."
(Félicité Robert de Lamennais)*

*Dedico esta tese aos meus pais Helena e
Oswaldo, pelo apoio, encorajamento, amor,
pelos ensinamentos que formaram os
alicerces da minha vida e pela compreensão
dos momentos em que fiquei ausente.*

Amo vocês, sem tanto!

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Antonio Carlos Campos Pignatari, que acreditou no meu trabalho, deu-me liberdade necessária dividindo comigo as expectativas, conduziu-me a maiores reflexões e desta forma enriqueceu-o. Minha especial admiração e gratidão.

À minha co-orientadora, Prof^a Dr^a. Marinês Dalla Valle Martino, pela sua contribuição e interesse carinhoso, do início ao final do estudo, estabelecendo comigo uma aliança que se traduziu numa co-orientação amigável. Meu respeito, admiração e carinho. É com emoção que lhe agradeço.

Àqueles que ao longo destes anos demonstraram uma amizade sólida e verdadeira, sempre dispostos a ajudar e encorajar, além do companheirismo e emoções vividas, meu eterno carinho, amizade e agradecimento 'ímpar'. Ainda os levarei para Goiás, rs...

Aos meus colegas pelos momentos de convívio, risos, trocas e afeto.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para este trabalho.

Muito obrigado!!!

SUMÁRIO

ÍNDICE DE TABELAS	XII
ÍNDICE DE FIGURAS	XIII
1 - INTRODUÇÃO	1
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 – <i>Staphylococcus</i> coagulase negativo (SCoN)	3
2.2 – Identificação dos SCoN	4
2.3 – Patogenicidade dos SCoN.....	6
2.4 – Importâncias das infecções causadas pelos SCoN	8
2.5 – Epidemiologia relacionada aos SCoN.....	10
2.6 - Mecanismos de resistência dos SCoN	12
2.7 – Métodos de detecção de resistência à meticilina.....	15
2.8 – <i>Staphylococcal chromossome cassette mec</i> (SCC <i>mec</i>).....	16
3 - OBJETIVOS	26
4 - CASUÍSTICA E MÉTODOS	27
4.1 – Local de estudo	27
4.2 – Seleção das amostras	27
4.2.1 – Critérios de inclusão	27
4.2.2 – Critérios de exclusão	28
4.3 – Métodos de identificação	28
4.4 – Métodos de determinação da suscetibilidade aos antimicrobianos	29
4.4.1 – Disco difusão	29
4.4.2 – Etest [®] (AB Biodisk, Estocolmo, Suécia).....	30
4.4.3 – Sistema automatizado Vitek [®] (bioMérieux).....	31

4.5 – PCR multiplex para detecção do gene <i>mecA</i> e determinação do tipo de SCC <i>mec</i>	31
4.5.1 – PCR multiplex	34
4.5.2 – Extração do DNA genômico.....	34
4.5.3 – Reação de amplificação.....	34
4.5.4 – Eletroforese	35
4.5.5 – Cepas de <i>S. aureus</i> utilizadas para controle na reação de PCR Multiplex utilizadas na determinação do tipo de SCC <i>mec</i>	35
4.6 – Análise de concordância Kappa (K).....	36
5 - RESULTADOS.....	37
5.1 – Identificação dos SCoN	37
5.2 – Perfil de suscetibilidade dos SCoN.....	38
5.3 – Detecção do gene <i>mecA</i> e caracterização dos tipos de SCC <i>mec</i>	45
6 - DISCUSSÃO	52
7 - CONCLUSÕES	60
8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
9 - RESUMO	84
10 - ABSTRACT	85
11 - ANEXO.....	86

ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ATCC - *American Type Culture Collection*
- CCIH - Comissão de Controle de Infecção Hospitalar
- ccr* - *Cassette Chromosome Recombinase*
- CDC - *Centers for Disease Control and Prevention*
- CIM - Concentração Inibitória Mínima
- CLSI - Clinical Laboratory Standards Institute
- GPI - *Gram-Positive Identification Card*
- GPS - *Gram-Positive Susceptibility Card*
- HIAE – Hospital Israelita Albert Einstein
- HNJ – Hospital Nove de Julho
- ICS - Infecção da corrente sanguínea
- IrAS - Infecção Relacionada à Assistência à Saúde
- M β L - Metalo- β -Lactamase
- MDR - Multi-Drug-Resistance
- mecA* - Gene que codifica resistência à meticilina/oxacilina
- MR - Multiresistente
- MRSA - *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*
- NNIS - *National Nosocomial Infections Surveillance System*
- PBP - *Penicillin-Binding Protein*
- PCR - *Polymerase Chain Reaction*
- PFGE - *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*
- SCC*mec* - *Staphylococcal Cassette Chromosome mec*
- SCoN - *Staphylococcus coagulase negativo*

SCOPE - *Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiological Importance*

SENTRY - *Antimicrobial Surveillance Program*

STAAUR - *Staphylococcus auricularis*

STACAP - *Staphylococcus capitis*

STAEPI - *Staphylococcus epidermidis*

STAHAE - *Staphylococcus haemolyticus*

STAHOM - *Staphylococcus hominis*

STASIM - *Staphylococcus simulans*

STAWAR - *Staphylococcus warneri*

VRE – *Vancomycin-resistant Enterococci*

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Perfil de suscetibilidade dos isolados de SCoN definidos pela técnica de disco difusão, utilizando oxacilia, cefoxitina, teicoplanina, vancomicina e linezolida.....	40
Tabela 2 - Perfil de suscetibilidade de alguns isolados de SCoN confirmados pelo Etest®	46
Tabela 3 – Relação da presença ou ausência do gene <i>mecA</i> , <i>SCCmec</i> e OXA sensível ou resistente.....	47
Tabela 4 – Relação das espécies de SCoN de acordo com o tipo de <i>SCCmec</i> encontrado.....	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Espécies de SCoN isoladas em ambos hospitais (HIAE e HNJ) no período de agosto/2005 à agosto/2007.....	38
Figura 2 - Distribuição das espécies de SCoN por hospital estudado (HIAE e HNJ).....	39
Figura 3 – Teste de suscetibilidade nos isolados de SCoN por disco difusão em ambos hospitais (HIAE e HNJ).....	40
Figura 4 - Teste de suscetibilidade nos isolados de SCoN por disco difusão somente do HIAE.....	41
Figura 5 - Teste de suscetibilidade nos isolados de SCoN por disco difusão somente do HNJ.....	42
Figura 6 - Perfil de suscetibilidade dos isolados de SCoN definidos pelo sistema automatizado, Vitek [®] system e Vitek [®] 2 - HIAE/HNJ.....	43
Figura 7 - Distribuição do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos testados no Vitek [®] system nos isolados de SCoN do HIAE.....	44
Figura 8 -. Distribuição do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos testados no Vitek [®] 2 nos isolados de SCoN do HNJ.....	45
Figura 9 - Distribuição dos tipos de SCCmec encontrados nos isolados de SCoN.....	48

Figura 10 - Porcentagem de <i>SCCmec</i> encontrados nas diferentes espécies de SCoN.....	48
Figura 11 - Distribuição dos tipos de <i>SCCmec</i> nas amostras de STA/EPI.....	49
Figura 12 - Distribuição dos tipos de <i>SCCmec</i> nas outras espécies de SCoN.....	50
Figura 13 - Fluxograma geral dos resultados em relação à espécie, à oxacilina, <i>mecA</i> e tipo de <i>SCCmec</i>	51
Figura 14 - Fluxograma dos resultados em relação à espécie, à oxacilina, <i>mecA</i> e tipo de <i>SCCmec</i> separando os dois hospitais estudados.....	47

1 - INTRODUÇÃO

Os *Staphylococcus* coagulase negativos (SCoN) são bactérias importantes na composição da microbiota normal da pele e mucosa do ser humano. São frequentemente considerados contaminantes de material clínico. Têm se destacado como importante agente de infecções relacionadas à assistência à saúde, isolados com maior frequência em infecções da corrente sanguínea estando associados à importante morbidade e mortalidade, principalmente quando os SCoN são resistentes aos antibióticos betalactâmicos.

O método manual mais utilizado para identificação das espécies de SCoN é o esquema de Kloss e Bannerman (1994) modificado por Bannerman (2003). Sua identificação é trabalhosa devido à quantidade de testes bioquímicos necessários para sua realização em um laboratório de rotina.

A resistência dos SCoN à oxacilina (análogo mais estável da metilina) tem aumentado muito nos últimos anos. Esta resistência é determinada pela alteração da enzima alvo dos antibióticos betalactâmicos. A alteração produz uma nova enzima com baixa afinidade pelo antibiótico, codificada pelo gene *mecA*.

Na determinação da suscetibilidade aos antimicrobianos, os testes quantitativos de referência (diluição em caldo ou ágar) são mais precisos que o método de disco difusão, porém mais trabalhosos e de difícil implementação na rotina de microbiologia clínica. Embora não seja padronizado pelo CLSI, a metodologia Etest[®] (AB Biodisk, Solna, Suécia) tem se mostrado bastante útil

na avaliação da suscetibilidade com determinação das concentrações inibitórias mínimas por teste de difusão.

Katayama e colaboradores (2000) demonstraram que o gene *mecA* faz parte de um elemento genético móvel que serve como veículo de troca de genes de resistência entre as espécies de SCoN e *S. aureus*, este elemento é denominado *Staphylococcal chromossome cassette mec* (SCC*mec*).

A distribuição e a estrutura dos tipos de SCC*mec* em *S. aureus* é amplamente estudada, porém para os SCoN os dados são apenas comparativos e observados em estudos que visam determinar se houve ou não transmissão entre as espécies. Atualmente são conhecidos oito tipos de SCC*mec*, os quais podem apresentar alguns subtipos. Quatro tipos de SCC*mec* (I, II, III e VI) são associados a infecções nosocomiais. Os tipos IV e V são amplamente disseminados entre cepas comunitárias. Recentemente foi encontrado SCC*mec* tipo VII em cepas comunitárias isolados na Suécia e uma tentativa de designar o SCC*mec* tipo VIII isolado no Canadá. Os SCC*mec* tem importância fundamental na transmissão e disseminação da resistência à oxacilina.

Estudos que avaliam a distribuição das espécies de SCoN e seus perfis de suscetibilidade aos antimicrobianos associados ao padrão genotípico nas IrAS de corrente sanguínea são de grande interesse.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – *Staphylococcus* coagulase negativo (SCon)

Staphylococcus spp. são membros da família *Micrococcaceae*, classificados como cocos Gram-positivos, imóveis, anaeróbios facultativos, não formadores de esporos e produtores de catalase. Apresentam-se aos pares, tétrades ou cadeias curtas, ou mesmo aglomerados irregulares em cachos (KLOSS & BANNERMAN, 1994). Algumas espécies produzem enzimas e toxinas tais como: coagulase, hialuronidase, enterotoxinas, toxinas, hemolisinas e leucocidinas. Estes fatores de virulência são indicativos de potencial capacidade de produzir doenças e alguns são marcadores de espécie (BANNERMAN, 2003).

A parede celular das bactérias Gram-positivas tem como principal função a proteção contra lise osmótica. Pela sua natureza confere forma, rigidez e funciona como uma barreira em relação ao meio externo. O principal componente da estrutura química da parede celular dos estafilococos é formado pelo peptidoglicano, um polímero que consiste em longas cadeias de glicídios com ligações cruzadas flexíveis de peptídeos que forma uma estrutura forte, mas elástica. Desta maneira, o peptidoglicano forma uma rede covalentemente fechada ao redor da bactéria (SCHEFFERS *et al.*, 2005; HÖLTJE, 2001)

Atualmente, o gênero *Staphylococcus* compreende 40 espécies. (CUNHA *et al.*, 2004) Entre seus representantes, *Staphylococcus aureus* é considerado o patógeno mais virulento e importante, mas a incidência de

infecções causadas por *Staphylococcus* coagulase negativo (SCoN) vem aumentando em todo o mundo (SAKAI, 2004).

2.2 – Identificação dos SCoN

O método manual mais utilizado para identificação das espécies de SCoN é o esquema de Kloos e Bannerman (1994) modificado por Bannerman (2003). É um método trabalhoso devido a várias provas bioquímicas necessárias para sua realização, dificultando sua implementação em laboratórios de rotina.

A identificação é feita através de suas características fenotípicas como pigmentação da colônia, produção de coagulase, fator “clumping”, termonuclease, atividade de fosfatase, atividade de pirrolidonil arilamidase (PYR), ornitina decarboxilase, produção de urease, β -galactosidase, produção de acetoína, resistência a novobiocina, resistência a polimixina B, produção de ácido a partir de uma variedade de carboidratos, tais como trealose, manitol, manose, turanose, xilose, celobiose, maltose e sacarose (BANNERMAN, 2003).

Esta metodologia de Bannerman (2003), foi modificada por d’Azevedo e colaboradores (CAIERÃO *et al.*, 2004), através das seguintes provas convencionais: catalase, teste da coagulase livre e ligada, pirrolidonil arilamidase (PYR), resistência à bacitracina, novobiocina, polimixina B, urease, fosfatase alcalina, desferroxamina, e carboidratos como trealose, manitol, manose, maltose, sacarose, celobiose, lactose, xilose, dentre outros.

Foram criados sistemas comerciais de identificação para as espécies de *Staphylococcus*, tais como API STAPH – IDENT (bioMérieux Vitek®), API

STAPH-IDENT, STAPH Trac System e ID 32 STAPH (bioMérieux Vitek®), Gram Positive Identification Card (bioMérieux Vitek®), painel MicroScan Pos ID, painel MicroScan Rapid Pos ID e Pos Combo tipo 6 e Rapid Pos Combo tipo 1 (Dade MicroScan, Inc., West Sacramento, Califórnia), Minitek Gram-Positive Set e Crystal rapid Gram-Positive Identification System (Becton Dickinson Bioscience). Estes testes apresentam uma acurácia de aproximadamente 70 a 90% (BANNERMAN, 2003). Em geral, os sistemas automatizados não são capazes de fazer uma distinção consistente entre as espécies de SCoN devido a expressão variável de algumas características fenotípicas. (CAIERÃO *et al.*, 2006) Há problemas em relação ao custo e tempo de incubação (De PAULIS, 2003).

Mulder (1995) descreveu uma metodologia com o objetivo de diferenciar *S. epidermidis* e *S. hominis* de outros SCoN, utilizando nesta identificação a suscetibilidade à desferroxamina e fermentação da trealose, sacarose e manitol. Pela metodologia de Mulder, modificada por d’Azevedo e colaboradores (ANTUNES *et al.*, 2008), foram utilizados somente discos de desferroxamina e fosfomicina. Dentre todas as espécies de SCoN, somente *S. epidermidis* e *S. hominis* são suscetíveis à desferroxamina. Como *S. epidermidis* é a espécie mais frequentemente isolada (75%), este esquema é capaz de identificar mais da metade de espécies envolvidas em infecções relacionadas à assistência à saúde, sendo considerada uma metodologia de fácil execução, baixo custo e boa qualidade. A distinção entre *S. epidermidis* e *S. hominis* é feita através da suscetibilidade à fosfomicina. *S. epidermidis* é suscetível e *S. hominis* é resistente (ANTUNES *et al.*, 2008).

Os métodos convencionais de identificação são ainda considerados métodos de referência, embora sejam lentos, trabalhosos e, muitas vezes, com interpretações subjetivas. Já os métodos automatizados diminuem o tempo para a identificação bacteriana e o trabalho manual, padronizam os resultados inter e intra-laboratorial, permitem o armazenamento de resultados e a emissão de relatórios epidemiológicos, identificam e avaliam a sensibilidade a drogas antimicrobianas. Atualmente encontram-se disponíveis vários sistemas de identificação automatizados (KONEMAN *et al.*, 2001).

O Vitek[®] (bioMérieux) foi o primeiro sistema automatizado a ser desenvolvido. Possui cartões de identificação de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas fermentadoras e não-fermentadoras de glicose, leveduras e bactérias anaeróbias. Os cartões para a avaliação da sensibilidade às drogas antimicrobianas são separados dos cartões de identificação. Tanto a identificação bacteriana como a leitura do teste de suscetibilidade antimicrobiana são obtidas após 2 a 15 horas. Nestes cartões, as provas bioquímicas são miniaturizadas e utilizam o princípio colorimétrico para leitura. Em algumas ocasiões, o sistema de identificação não permite a separação entre algumas espécies de estafilococos. Nestas eventualidades, o próprio sistema informa que testes adicionais, em bancada, devem ser realizados. Caso não seja possível esta avaliação adicional, a identificação chega somente até o gênero (Gram-Positive Identification (GPI), 1997).

2.3 – Patogenicidade dos SCoN

O principal fator de virulência dos SCoN está associado à formação do biofilme, o qual propicia a adesão às superfícies plásticas (biomateriais) a

corpos estranhos. O desenvolvimento do biofilme ocorre em duas etapas, a primeira etapa envolve uma rápida adesão da bactéria à superfície e a segunda etapa é de acumulação, sendo mais prolongada, envolvendo a proliferação e adesão intercelular formando várias camadas de bactérias (HUEBNER *et al.*, 1999).

O biofilme, completamente formado, é constituído por várias camadas de bactéria em um material extracelular amorfo (*slime*) que consiste da complexa mistura de vários açúcares, constituintes da parede celular e proteínas extracelulares, tendo como principal componente o ácido teicóico. Este confere proteção aos microorganismos contra os mecanismos de defesa imune do hospedeiro e de agentes antimicrobianos, atuando diretamente pelo bloqueio da penetração dos antimicrobianos na célula bacteriana ou indiretamente por mantê-la em um inativo estado de repouso (CAFISO *et al.*, 2004; MICHELIM *et al.*, 2005). A quantidade de biofilme produzida pode estar relacionada com a habilidade dos SCoN em causar infecções (de SILVA *et al.*, 2002)

A alta taxa de resistência aos antimicrobianos apresentada por estes microorganismos, principalmente à meticilina também é considerado importante fator de virulência (WISPLINGHOFF *et al.*, 2004).

O aumento no uso de materiais implantados como cateteres intravasculares e próteses têm favorecido o surgimento de infecções causadas por SCoN. Pacientes internados em unidades de terapia intensiva, oncologia e transplante são mais vulneráveis (devido à imunossupressão e ao uso de antimicrobianos de amplo espectro) a adquirir este tipo de infecção, pois na maioria das vezes são submetidos a tais procedimentos (AGVALD-ÖHMAN *et al.*, 2004).

Em recém-nascidos, o baixo peso e a prematuridade, associados à imaturidade do sistema imune e habilidade prejudicada em combater as infecções, a necessidade de acessos vasculares e o uso de cateteres intravasculares são considerados importantes fatores de risco em infecções causadas por SCoN (RAIMUNDO *et al.*, 2002).

Dentre os SCoN, o principal patógeno oportunista recuperado com maior frequência nos isolados clínicos é *Staphylococcus epidermidis*. A segunda espécie mais isolada em hemocultura é *Staphylococcus haemolyticus*, apresentando maior resistência aos antimicrobianos, com predisposição a resistência aos glicopeptídeos (TABE *et al.*, 1998; SADER *et al.*, 1999).

2.4 – Importâncias das infecções causadas pelos SCoN

Atualmente, as infecções hospitalares passaram a ser denominadas de infecções relacionadas à assistência à saúde ou ainda complicações infecciosas hospitalares. Estas representam um importante desafio na medicina moderna, sendo responsáveis por uma das principais causas de morbimortalidade de populações que são internadas em hospitais (ZANON, 2003).

A infecção da corrente sanguínea (ICS) é uma das maiores causas de infecções nosocomiais no mundo atualmente, sendo que, este tipo de infecção está estritamente relacionado ao uso de CVC e o emprego e desenvolvimento de protocolos para a prevenção de ICS relacionada à CVC devem ser transformados em ações constituindo atitudes capazes de diminuir a incidência deste tipo de infecção tendo impacto direto na morbimortalidade dos pacientes (LOBO *et al.*, 2005).

Ao longo das duas últimas décadas, o papel das espécies de SCoN como agentes etiológicos de infecções nosocomiais tem sido reconhecido e bem documentado, especialmente para a espécie *S. epidermidis* que é o principal SCoN encontrado em amostras clínicas (BANNERMAN, 2003).

Dados nacionais (SADER *et al.*, 1999) reportam *S. epidermidis* como terceiro agente mais isolado de infecções de corrente sanguínea e como segundo agente mais isolado na América Latina, apresentando taxas da ordem de 80% de resistência a oxacilina nestes estudos (SADER *et al.*, 2001; CHANG *et al.*, 2003).

Bacteremias relacionadas a cateter e endocardites estão entre os tipos de infecções mais graves associadas aos SCoN apresentando alta morbidade e mortalidade. O aumento da utilização de dispositivos implantados, a maior sobrevivência de pacientes imunocomprometidos (recém-nascidos prematuros e com baixo peso, pacientes com neoplasias, em especial os neutropênicos em uso de quimioterapia, etc.), o uso indiscriminado de drogas antimicrobianas, especialmente aquelas de amplo espectro, e a maior valorização dos resultados de culturas de espécimes biológicos estão entre os principais motivos da crescente participação dos SCoN como agentes etiológicos nas infecções nosocomiais (KLOOS & BANNERMAN, 1994; BANNERMAN, 2003).

Os microrganismos mais frequentemente isolados de culturas de cateteres são os SCoN. Por esta razão, são também a causa mais comum de infecções relacionadas a cateter, entre elas a infecção da corrente sanguínea. Porém, alguns destes isolados podem ser contaminantes, a contaminação ocorre no momento da coleta da hemocultura com estafilococos da microbiota

normal da pele. Mesmo considerando o papel relevante da contaminação os SCoN tornaram-se importantes patógenos nosocomiais (MACK *et al.*, 2002).

A hemocultura é considerada um dos mais importantes testes laboratoriais realizados para o diagnóstico de bacteremias, embora ainda apresente muitos problemas com relação às suas técnicas e resultados (LARGURA *et al.*, 2004). A esterilização e a escolha do sítio de punção, o volume do inóculo e o meio utilizado para a cultura são fatores que interferem na sensibilidade e especificidade das hemoculturas (THYLEFORS *et al.*, 1998).

Um fator importante é que os SCoN associados às complicações infecciosas hospitalares são resistentes a múltiplos antibióticos, dificultando muitas vezes a indicação de um melhor tratamento para o paciente. Esta múltipla resistência está, certamente, relacionada à pressão seletiva exercida pela difusão de uso de drogas antimicrobianas no hospital (ARCHER, 2000).

2.5 – Epidemiologia relacionada aos SCoN

O “Programa de Vigilância Antimicrobiana – SENTRY” monitora a prevalência dos patógenos e os padrões de resistência aos antimicrobianos realizados nos Estados Unidos, Canadá, América Latina e Europa. Estudos desse programa relata que os SCoN são a terceira causa em infecções sistêmicas nosocomiais e comunitárias e que são a segunda causa de infecções nosocomiais (DIEKEMA *et al.*, 2001; PFALLER *et al.*, 1998; PFALLER *et al.*, 1999).

Durante as últimas décadas houve uma mudança na distribuição das bacteremias. Um estudo realizado por Wisplinghoff e colaboradores analisou 24.179 casos de infecções nosocomiais da corrente sanguínea nos Estados

Unidos, sendo SCoN o isolado mais comum (31%) (WISPLINGHOFF *et al.*, 2004).

Nas espécies de *Staphylococcus* a resistência à meticilina é um fenômeno mundial com marcadas variações geográficas, e com prevalências crescentes apesar dos esforços para conter o aumento da disseminação de cepas resistentes. Em algumas áreas da Europa a prevalência da resistência a meticilina já era descrita em 2002 como 60 a 70% para os SCoN (STEFANI *et al.*, 2003). Na Noruega apenas 2% dos *Staphylococcus aureus* apresentaram resistência à meticilina, porém os MR-SCoN são prevalentes. Nos isolados de hemoculturas, 80% dos SCoN são resistentes à meticilina e esta prevalência é similar à relatada na Escandinávia (HANSSEN *et al.*, 2004).

Um estudo feito para avaliação da resistência à meticilina para os SCoN na Espanha relatou um aumento de 32,5% em 1986 para 61,3% em 2002 (CUEVAS *et al.*, 2004). Neste mesmo país, em 2006, um estudo denominado “Vigilância de resistências aos antimicrobianos: VIRA” relata uma prevalência de resistência à meticilina de 70,6% (PICAZO *et al.*, 2006).

Em hemoculturas, a prevalência da resistência à meticilina, segundo o programa de vigilância SENTRY, encontrou uma taxa de resistência para os SCoN de 77% na América Latina, 77% no Japão, 74% nos Estados Unidos, 73% no Canadá e 73% na Europa (DIEKEMA *et al.*, 2001).

Em um estudo feito na Europa entre 2002 e 2004, Sader e colaboradores encontraram taxas de resistência para meticilina bastante variadas. A maior resistência foi encontrada em Israel (94,7%) e a menor na Suécia (63%). Taxas intermediárias foram encontradas na França (77%), Espanha (76%) e Alemanha (69%) (SADER *et al.*, 2004).

Segundo levantamento do SENTRY feito em hospitais brasileiros e da América Latina entre 1997 e 2001 a resistência à meticilina dos SCoN em hemoculturas é de 80,8% e 76,2% respectivamente (SADER *et al.*, 2004).

2.6 - Mecanismos de resistência dos SCoN

Os antibióticos betalactâmicos produzem um efeito bactericida pela inibição das enzimas responsáveis por catalisar um estágio vital da biossíntese do peptidoglicano, principal componente da parede celular das bactérias Gram-positivas (GIESBRECHT *et al.*, 1998).

A resistência apresentada pelos estafilococos aos antibióticos betalactâmicos deve-se principalmente a dois mecanismos distintos, porém não dissociados, pois ambos podem interagir. O primeiro mecanismo desenvolvido pela bactéria foi à produção da enzima betalactamase que hidrolisa o antibiótico. O segundo mecanismo está associado à alteração do sítio de ação do antibiótico betalactâmico pela produção de uma proteína ligadora de penicilina adicional, a PBP2a (também denominada PBP2'), que está ausente nos *Staphylococcus* spp. sensíveis à meticilina (HACKBARTH *et al.*, 1989).

Outros mecanismos de resistência dos estafilococos aos betalactâmicos já foram descritos, porém com menor importância clínica. São alguns fatores cromossômicos, cuja atividade afeta o nível da resistência, muitos destes genes estão envolvidos na biossíntese da parede celular (GIESBRECHT *et al.*, 1998; GUSTAFSON *et al.*, 1992).

Alguns genes independentes do locus *mec* contribuem para expressão da resistência aos betalactâmicos. Estes genes designados *fem* (fatores

essenciais para expressão da resistência) estão presentes no cromossomo de MRSA e MRS (HENZE *et al.*, 1993).

Dois destes genes, *femA* e *femB*, não tem envolvimento na síntese da PBP2a, mas estão envolvidos na formação da ligação cruzada dos precursores da cadeia do peptideoglicano-pentaglicina. A disfunção do *femA* ou *femB* diminui o conteúdo de glicina nos precursores do peptideoglicano e confere suscetibilidade à meticilina. A presença do *femA* é também necessária para o aumento da atividade autolítica observada nas cepas contendo *mecA* (BERGER-BACHI *et al.*, 2002; HENZE *et al.*, 1993).

A resistência a oxacilina em *Staphylococcus* spp é heterogênea, conferida principalmente pelo gene *mecA*, correlacionado a baixa afinidade deste antimicrobiano à proteína PBP2a. Um segundo mecanismo de resistência, independente do gene *mecA*, é o fenótipo denominado “borderline” promovido pela hiperprodução de β -lactamases (MARTINEAU *et al.*, 2000). Um terceiro mecanismo de resistência descrito é a alteração de outras PBPs (PETERSSON *et al.*, 1999; PETINAKI *et al.*, 2001).

As principais causas da resistência à oxacilina parecem ser a expressão do gene *mecA* e a hiperprodução de betalactamase, embora esta última seja menos frequente. Tanto o gene da betalactamase (*bla*) como o da PBP2a (*mecA*) são geneticamente e bioquimicamente distintos, mas são regulados por um sistema indutor e repressor similar. Tanto o gene *bla* quanto o gene *mec* podem controlar a produção da PBP2a e da betalactamase devido à homologia dos dois sistemas regulatórios (KATAYAMA *et al.*, 2003).

Os primeiros relatos de suscetibilidade diminuída à vancomicina foram descritos em *S. haemolyticus* (SCHWALBE *et al.*, 1987) Em seguida houve

relatos para *S. aureus* (CDC – MMWR, 1997) e em *S. epidermidis* demonstrando resistência heterogênea (SIERADZKI *et al.*, 1999). O mecanismo de resistência envolvido foi o espessamento da parede celular, uma vez que estes isolados não apresentaram gene de resistência aos glicopeptídeos, porém todos estes isolados eram resistentes à oxacilina (TENOVER *et al.*, 2001).

Com o aumento da prevalência de SCoN de uma maneira geral em amostras clínicas e o seu elevado grau de resistência a antimicrobianos de escolha primária, se faz necessário o uso empírico de vancomicina para tratamento das diversas infecções causadas por estes microrganismos. Embora o seu uso seja muitas vezes necessário, o emprego deste antibiótico em larga escala pode acarretar o efeito da pressão seletiva levando ao aparecimento de isolados, principalmente SCoN, com sensibilidade diminuída ou mesmo com perfil de resistência a este grupo de drogas. Os SCoN podem ser considerados como reservatórios de genes de resistência a diversos antibióticos no ambiente hospitalar podendo, portanto, transferir esses fatores a outros patógenos hospitalares (CERCENADO *et al.*, 1996; SIERADZKI *et al.*, 1999).

A primeira oxazolidinona a ser autorizada para uso na prática clínica foi a linezolida (DRAGHI *et al.*, 2005). Têm sido utilizada principalmente para tratar de infecções complicadas associadas a pele e tecidos, e pneumonias nosocomiais (KOLEEF *et al.*, 2004; RUBINSTEIN *et al.*, 2001; WEIGELT *et al.*, 2005). Emergiu como opção de tratamento para infecções causadas por bactérias Gram-positivas que são resistentes por drogas convencionais como MRSA e VRE (Birmingham *et al.*, 2003; MYLONA *et al.*, 2007; STEVENS *et al.*,

2002). O mecanismo de resistência à linezolida está associada a uma mutação cromossomal que afeta o domínio da peptidil transferase da porção 23S do rRNA da subunidade ribossomal 50S. A resistência é mediada por um único polimorfismo de nucleotídeo, alterada pela substituição da base nitrogenada guanina pela uracila na posição 2576 do gene (G2576U) (Diekema e Jones, 2001).

2.7 – Métodos de detecção de resistência à meticilina

Os SCoN apresentam aproximadamente 75 % dos isolados resistentes a oxacilina. (YORK *et al.*, 1996). A resistência dos SCoN à oxacilina geralmente está acompanhada da resistência a diversos antimicrobianos tendo como consequência o aumento no uso de glicopeptídeos para terapia empírica e até mesmo para profilaxia. Contudo, a seleção de resistência aos glicopeptídeos e a potencial transmissão de tal resistência entre as espécies têm demonstrado a necessidade do uso restrito destes antimicrobianos (De GIUSTI, 1999). Com isso, há a necessidade de realizar testes de suscetibilidade aos antimicrobianos, identificando precocemente os SCoN resistentes à oxacilina, pois quando estes apresentarem suscetibilidade poderá ser utilizado os antimicrobianos betalactâmicos diminuindo assim, o uso desnecessário aos glicopeptídeos (HUSSAIN, 2002).

A expressão da proteína PBP2a, muitas vezes, é heterogênea devido a complexidade dos mecanismos de expressão, dificultando sua expressão por métodos fenotípicos nos SCoN resistentes à meticilina. A detecção do gene *mecA* por PCR é considerada padrão ouro. Nos casos de infecções severas, é clinicamente útil detectar rapidamente a suscetibilidade e identificação da

bactéria (BROWN, 2001; HUSSAIN *et al.*, 2000; MARTINEAU *et al.*, 2000). Entretanto poucos laboratórios têm a técnica e a capacidade econômica para aplicar testes de PCR em todos isolados de estafilococos, então o teste de difusão em disco permanece sendo o método de escolha para detectar a resistência à meticilina (CLSI, 2008). O ideal, para detecção rápida e acurada da sensibilidade ou resistência é que se combinem o método fenotípico e genotípico (SKOV *et al.*, 2003).

Para detecção da heteroresistência, a cefoxitina é considerada um melhor preditor do que a oxacilina porque é um forte indutor da PBP2a . No teste de disco difusão, a cefoxitina pode ser utilizada para prever a presença do gene *mecA* com alto grau de sensibilidade e especificidade quando comparada com a detecção do gene *mecA* pela técnica de PCR (FELTEN *et al.*, 2002)

2.8 – *Staphylococcal chromossome cassette mec (SCCmec)*

O estudo da resistência à meticilina mediada pelo gene *mecA* não pode mais estar dissociado da análise do tipo de elemento cromossômico móvel que contém este gene, o qual é denominado *Staphylococcal chromossome cassette mec (SCCmec)*. Atualmente são conhecidos oito tipos de *SCCmec*, os quais podem apresentar alguns subtipos. Os *SCCmec* tem importância fundamental na transmissão da resistência e na epidemiologia (ITO *et al.*, 2003; KONDO *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Inicialmente, este cassete cromossômico era denominado com uma ilha de resistência, porém não se pode limitar a função deste elemento cromossômico à transferência da resistência aos betalactâmicos. Parece que o *SCCmec* serve como veículo para trocas úteis a uma melhor sobrevivência dos

estafilococos em vários ambientes, além de conter também genes de resistência a outros antibióticos e outros genes e pseudogenes que codificam enzimas com diversas funções (HIRAMATSU *et al.*, 2004; ITO *et al.*, 2001).

Estudos de Ito e colaboradores descreveram todo elemento SCC*mec*, ainda conhecido como DNA *mec*, em uma cepa de MSSA a N315, nomeada como pré-MRSA. Esta cepa, apesar de apresentar o gene *mecA*, era sensível à meticilina. A explicação deste fato é que a expressão do gene *mecA* estava fortemente reprimida na cepa N315 pelo produto de um gene regulador denominado *mecl* (ITO *et al.*, 1998; ITO *et al.*, 1999).

Com a evolução das técnicas de clonagem e seqüenciamento toda região do cromossomo em torno do gene *mecA*, em poucos anos, foi analisada, descrita e classificada. Foram encontradas duas regiões essenciais e comuns a todos os estafilococos resistentes à meticilina. Estas regiões foram denominadas como complexo do gene *mec* e complexo do gene *ccr*. As sequências entre os complexos ou depois deles foram classificadas como regiões “junkyard” (sobras) ou região J (KATAYAMA *et al.*, 2001; KATAYAMA *et al.*, 2000).

Quatro classes principais do complexo do gene *mec* foram identificadas com o uso de primers específicos através da técnica de PCR utilizando o DNA cromossômico, de cepas de várias espécies de estafilococos meticilina resistente, como alvo. O complexo *mec* contém os genes reguladores da expressão do gene *mecA*, que são o *mecl* e *mecRI*. Estes genes reguladores também estão situados no elemento SCC*mec* do cromossomo bacteriano, logo após o promotor do gene *mecA*. Estes genes podem estar íntegros ou truncados (Δ *mecRI*) esta característica pode estar associada a alterações

estruturais do complexo *mec* que ocorreram pelo movimento ou inclusão de sequências de inserção (IS) (KATAYAMA *et al.*, 2001).

Alguns estudos demonstraram que em algumas cepas de *S. epidermidis*, com a sequência intacta do gene *mecI*, apresentava baixos níveis de resistência à meticilina. Experimentos também sugerem que a inativação por deleção (ou mutação *in vivo*) do gene *mecI* pode tornar a cepa capaz de expressar altos níveis de resistência à meticilina, indicando claramente o papel do gene *mecI* na repressão da resistência (DICKINSON *et al.*, 2000; SUZUKI *et al.*, 1993).

O gene *mecA* apresenta altos níveis de homologia entre as espécies de MRSA e de MR-SCoN. Sua origem ainda é desconhecida. Um gene *mecA* homólogo com 88% de similaridade entre os 37 aminoácidos com o gene *mecA* dos estafilococos meticilina resistentes foi identificado no *S. sciuri*. Um fato interessante é que este gene homólogo é ubíquo nesta espécie, mas seu fenótipo é sensível. Este e outros dados sustentam a hipótese de que o gene *mecA* é originário de espécies de SCoN, possivelmente uma espécie evolucionariamente próxima do *S. sciuri* (CHAMBERS *et al.*, 1997).

A outra região gênica que é comum a todos os SCC*mec* é o complexo do gene *ccr* (*cassette chromosome recombinase*) que codifica as enzimas recombinases (*ccrA* e *ccrB* ou *ccrC*). A função destas enzimas é garantir a mobilidade dos SCC*mec* excisando precisamente o elemento do cromossomo e integrando em um sítio específico de um cromossomo receptor. O SCC*mec* é integrado no genoma no sítio att_{B_{SCC}} localizado na *ofrX*, uma sequência aberta de leitura (OFR) com função desconhecida (HANSSEN *et al.*, 2004; ITO *et al.*, 2001; ITO *et al.*, 2004; KATAYAMA *et al.*, 2003).

O complexo do gene *ccr* é composto por quatro tipos de gene de cada enzima recombinase. A enzima *ccrA* do complexo apresenta os alótipos: *ccrA1*, *ccrA2*, *ccrA3* e *ccrA4*; e a enzima *ccrB* os alótipos *ccrB1*, *ccrB2*, *ccrB3* e *ccrB4*. Os tipos de *SCCmec* são classificados de acordo com a combinação entre o complexo do gene *mecA* e o complexo do gene *ccr*. Os principais tipos de *SCCmec* apresentam as seguintes combinações:

SCC <i>mec</i> tipo I	→	complexo do gene <i>mec</i> classe B	→	complexo do gene <i>ccr</i> 1 (<i>ccrAB1</i>)
SCC <i>mec</i> tipo II	→	complexo do gene <i>mec</i> classe A	→	complexo do gene <i>ccr</i> 2 (<i>ccrAB2</i>)
SCC <i>mec</i> tipo III	→	complexo do gene <i>mec</i> classe A	→	complexo do gene <i>ccr</i> 3 (<i>ccrAB3</i>)
SCC <i>mec</i> tipo IV	→	complexo do gene <i>mec</i> classe B	→	complexo do gene <i>ccr</i> 2 (<i>ccrAB2</i>)
SCC <i>mec</i> tipo V	→	complexo do gene <i>mec</i> classe C	→	complexo do gene <i>ccrC</i>
SCC <i>mec</i> tipo VI	→	complexo do gene <i>mec</i> classe B	→	complexo do gene <i>ccr</i> 4 (<i>ccrAB4</i>)

(ITO *et al.*, 2001; ITO *et al.*, 2004; KATAYAMA *et al.*, 2000; KONDO *et al.*, 2007; MA *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2006)

Finalmente cada *SCCmec* é classificado em subtipos baseado na constituição da sequência das regiões J que não pertence ao complexo do gene *mec* nem ao complexo do gene *ccr* (ITO *et al.*, 2001; ITO *et al.*, 2004; KATAYAMA *et al.*, 2000; MA *et al.*, 2002).

Experimentos demonstraram que os genes das recombinases codificados no elemento *SCCmec*, *ccrA* e *ccrB* são suficientes para transferir o elemento de um plasmídeo para um cromossomo em um sítio específico e com orientação específica. No entanto o mecanismo preciso da transferência do *SCCmec* na natureza ainda é desconhecido (ROBINSON *et al.*, 2003).

Até o momento oito principais tipos de *SCCmec* foram descritos. Os elementos *SCCmec* tipos I, II, III e VI estão mais associados a infecções causadas por estafilococos de origem nosocomial, enquanto que os tipos IV e V são encontrados com maior frequência em estafilococos de infecções comunitárias (HISATA *et al.*, 2005; KONDO *et al.*, 2007). Recentemente foi

encontrado SCC*mec* tipo VII em cepas comunitárias isolados na Suécia (HIGUCHI *et al.*, 2008) e uma tentativa de designar o SCC*mec* tipo VIII isolado no Canadá (ZHANG *et al.*, 2009).

Estudos de Ito e colaboradores elucidaram a estrutura completa dos três maiores tipos de SCC*mec*. O tipo I (34Kb) foi identificado na primeira cepa de MRSA isolado em 1961 no Reino Unido (cepa NCTC104442). O tipo II (52Kb) foi identificado em uma cepa PRÉ-MRSA isolada no Japão em 1982 (cepa N315), e o tipo III (66Kb) foi identificado em uma cepa MRSA isolada em 1985 na Nova Zelândia. Mais recentemente foi identificado um quarto elemento SCC*mec* tipo IV (20 a 24Kb), isolado do Clone Pediátrico de um MRSA adquirido da comunidade. O SCC*mec* tipo V (28Kb) foi isolado na Austrália da cepa WIS [WBG8318] de um MRSA comunitário (ITO *et al.*, 2004). Em todos os tipos de SCC*mec* estudados, a sequência do gene *mecA* é altamente conservada, sejam cepas de *S. aureus* ou de SCoN (MA *et al.*, 2002; WELLER, 1999). O SCC*mec* tipo VI, isolado de uma cepa de MRSA do Clone Pediátrico, a cepa HDE288 contém o complexo *ccrAB4* e o complexo *mec* classe B. Esta cepa é dominante nos hospitais de Portugal, porém ainda é pouco descrita (KONDO *et al.*, 2007, OLIVEIRA *et al.*, 2006).

A observação de que o elemento menor, SCC*mec* tipo IV pode ser adquirido mais frequentemente pode ser explicado porque a eficiência da transferência é maior quanto menor o DNA. Hiramatsu e colaboradores sugerem que o SCC*mec* tipo IV tem um baixo custo metabólico para transferência, pois carrega apenas as recombinases e os genes que regulam a expressão do *mecA*. A combinação entre o pequeno tamanho do DNA e o baixo custo metabólico torna o SCC*mec* tipo IV um elemento seletivamente

favorecido para transferência entre os *Staphylococcus* spp. (ITO *et al.*, 2001). Esta observação sugere que a prevalência de doenças causadas por clones que contém o SCCmec tipo IV tende a aumentar. Se considerarmos que o SCCmec tipo V apresenta as mesmas vantagens seletivas do SCCmec tipo IV, podemos inferir que a sua presença nas infecções comunitárias também se tornem cada vez mais freqüentes. Em contraste, os SCCmec tipos II e III podem carregar genes adicionais como os que codificam a resistência aos antibióticos não betalactâmicos e metais pesados (OKUMA *et al.*, 2002, ROBINSON *et al.*, 2003).

SCCmec	Cepa ^a	Origem ou Descrição	Tamanho	Complexo mec	Complexo ccr
Tipo I	MRSA NCTC 104442 ^b	Reino Unido, 1961	34Kb	Classe B	ccrAB1
Tipo II	Pré-MRSA N315 ^c	Japão, 1982	52Kb	Classe A	ccrAB2
Tipo III	MRSA 85/2082 ^d	Nova Zelândia, 1985	66Kb	Classe A	ccrAB3
Tipo IV	MRSA CA05 ^e	Estados Unidos, 2001	20-24Kb	Classe B	ccrAB2
Tipo V	WIS [WBG8318] ^f	Austrália, 2002	28Kb	Classe C	ccrC
Tipo VI	HDE288 ^g	Portugal, 1992	~25Kb	Classe B	ccrAB4

^a Cepas de referência de *S. aureus* metilina resistente (MRSA)

^b Número de acesso DDBJ/EMBL/Gene Bank AB033763 National Collection of Type Cultures (NTTC)

^c Número de acesso DDBJ/EMBL/Gene Bank D86934

^d Número de acesso DDBJ/EMBL/Gene Bank AB037671

^e Número de acesso DDBJ/EMBL/Gene Bank AB063172

^f Número de acesso DDBJ/EMBL/Gene Bank AB121219 C-MRSA (*S. aureus* metilina resistente comunitário)

^g Número de acesso DDBJ/EMBL/Gene Bank AF11935

O SCCmec tipo I não contém outra resistência a antimicrobianos além dos betalactâmicos. Porém uma ORF (*open reading frame*) codifica uma proteína de superfície plasmídeo-sensível que pode ser danosa às células hospedeiras porque interfere na propriedade de ligação da fibronectina e do fibrinogênio (VAUDAUX *et al.*, 1998).

Os dois maiores elementos SCCmec, tipo II e tipo III têm a estrutura mais variável, isto pode ser explicado pelo fato de que estes elementos contém

mais cópias das sequências de repetição IS431 e do transposomo Tn544. A atividade destes dois elementos pode ter um papel importante na remodelação da estrutura do SCC*mec* e levar a um maior número de variantes estruturais (ITO *et al.*, 2001; KATAYAMA *et al.*, 2001).

O SCC*mec* tipo II, o segundo maior elemento gênico tem codificado à esquerda do complexo *mec* uma cópia do transposom Tn554 onde está inserido o gene *spc* que codifica a resistência à espectinomicina, e o gene *ermA*, que codifica a resistência à macrolídeos, lincosaminas e estreptograminas (MLS). À direita do complexo *mec* está integrada uma cópia do plasmídeo pBU110 com os genes para resistência à kanamicina e tobramicina (*aadD*) e para bleomicina (*ble*) um anticarcinogênico. Shore e colaboradores identificaram seis variantes do SCC*mec* tipo II (ITO *et al.*, 1999; SHORE *et al.*, 2005).

Entre os elementos gênicos o maior, mais complexo e que codifica o maior número de genes de resistência e, portanto o mais virulento é o SCC*mec* tipo III. O SCC*mec* tipo III contém um plasmídeo pequeno, à direita do gene *mecA*, o pT181, e neste plasmídeo o gene *tetK* que codifica a proteína que promove o efluxo da tetraciclina. Ao lado deste plasmídeo, outro denominado pT258 que é pouco descrito (OLIVEIRA *et al.*, 2002). O SCC*mec* tipo III é subdividido em tipo IIIa e IIIb, o primeiro difere do tipo SCC*mec* III pela ausência do pT181 e seus elementos IS431. O SCC*mec* tipo IIIb não apresenta integradas cópias de Tn554, pT181 e do operon *mer* com suas sequências de inserção associadas (ITO *et al.*, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2002). O elemento SCC que carrega o operon de resistência ao mercúrio pode ser distinguido do SCC*mec* tipo III pelo complexo do gene *mec* classe A e do complexo do gene

ccr 3. Este elemento é designado *SCCmercury* (CHONGTRAKOOL *et al.*, 2006).

O *SCCmec* tipo IV tem uma nova combinação do complexo *mec* e do complexo *ccr 2*, muito menor que os *SCCmec* descritos anteriormente. Ambos *SCCmec* tipo I e IV têm o complexo *mec* com a sequência de inserção IS1272 inserida no mesmo ponto de junção, isto sugere que a recombinação ocorreu entre o *SCCmec* tipo I e outras sequências para gerar o *SCCmec* tipo IV, porém o complexo *ccr* tem maior identidade com o complexo *ccr 2* característico do *SCCmec* tipo II (MA *et al.*, 2002).

O *SCCmec* tipo V, não codifica outra resistência além do gene *mecA*, porém já foram descritos MRSA multirresistentes com este tipo de elemento genético (O'BRIEN *et al.*, 2005). O *SCCmec* tipo V codifica um gene de uma nova recombinase, responsável por sua mobilidade, a *ccrC*, mas com uma única cópia do gene, diferente dos outros tipos de *SCCmec* que têm duas recombinases. Entretanto, neste elemento novo, está codificado um sistema de restrição modificado que pode ter importância na estabilização do elemento no cromossomo (ITO *et al.*, 2004). O *SCCmec* tipo VI, recentemente descrito, é um elemento menor, porém identificado em cepas nosocomiais. Sua estrutura se resume ao complexo *ccrAB2* e ao complexo *mec* tipo B. A única resistência codificada neste tipo de *SCCmec* é aos antibióticos betalactâmicos (OLIVEIRA *et al.*, 2006). A ilustração dos tipos de *SCCmec* está demonstrada na figura 1.

Boyle-Vavra e colaboradores descreveram um novo subtipo de *SCCmec* tipo V designado como *SCCmec Vt*, contendo uma nova variante de *ccrC* (*ccrC2*), os mesmos autores também detectaram um novo *SCCmec* que

contém todas as características do SCC*mec* IV e também a *ccrC* (BOYLE-VAVRA *et al.*, 2005).

As cepas comunitárias têm vantagens seletivas como ter uma taxa de crescimento mais alta que as cepas nosocomiais e são mais aptas a colonizar humanos do que aquelas com fenótipo de multirresistência (MA *et al.*, 2002).

Os *Staphylococcus* spp. comunitários, principalmente os *S. aureus* comunitários resistentes à meticilina (C-MRSA) tornaram-se, nos últimos anos, de grande importância nos EUA, Austrália, países da Europa e América Latina (HISATA *et al.*, 2005; O'BRIEN *et al.*, 2005; PFALLER *et al.*, 1998; RIBEIRO *et al.*, 2005; WITTE *et al.*, 2004). Algumas cepas podem conter o gene de virulência *Panton-Valentine leucocidin* (PVL) que pode causar pneumonia necrotizante, sepse severa entre outras infecções graves (BOYLE-VAVRA *et al.*, 2005; TAKIZAWA *et al.*, 2005).

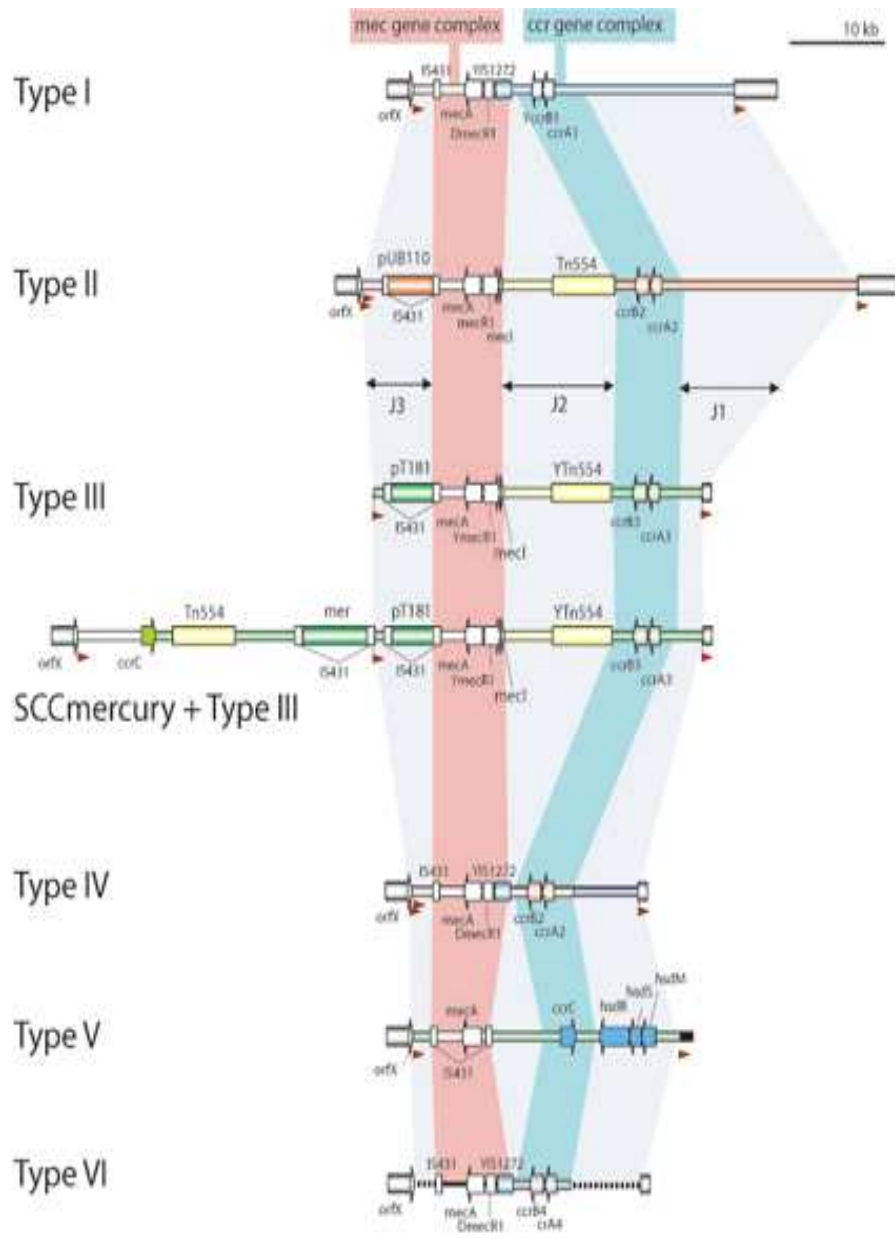


Figura 1: Ilustração dos tipos de SCCmec. Disponível em <http://www.staphylococcus.net/> Acesso em: 22 jan. 2009.

3 - OBJETIVOS

- Caracterizar as espécies de SCoN isoladas de IrAS em infecções da corrente sanguínea provenientes de dois hospitais gerais de São Paulo;

- Relacionar as espécies de SCoN encontradas com seu respectivo perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos;

- Determinar a concordância do teste de disco difusão com oxacilina e cefoxitina com detecção do gene *mecA* para avaliação do perfil de suscetibilidade à oxacilina;

- Determinar o tipo de SCC*mec* nos isolados de SCoN utilizando a técnica de PCR multiplex.

4 - CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 – Local de estudo

Todas as amostras de SCoN foram obtidas do banco de microrganismos do Hospital Israelita Albert Einstein (HIAE), com 500 leitos (sendo 53 de UTI), e do Hospital Nove de Julho, com 250 leitos (sendo 50 de UTI), ambos hospitais gerais de alta complexidade localizados na cidade de São Paulo/SP.

4.2 – Seleção das amostras

4.2.1 – Critérios de inclusão

A inclusão das amostras foi somente daqueles pacientes em que foram identificadas infecção da corrente sanguínea laboratorialmente confirmada a partir da vigilância epidemiológica realizada pelo Serviço de Controle de Infecção Hospitalar dos respectivos hospitais, por *Staphylococcus coagulase* negativo isolados de hemocultura, no período de agosto de 2005 a agosto de 2007, nos respectivos hospitais, constatando de que se tratavam apenas de infecções relacionadas à assistência à saúde (IrAS).

Os diagnósticos de IrAS foram baseados nos critérios do CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*), de acordo com a nomenclatura NNIS (*National Nosocomial Infection Surveillance Study*) As definições utilizadas foram:

Infecção Primária da Corrente Sanguínea

- Isolamento de SCoN em 2 ou mais frascos de hemocultura;

- Evidência clínica de infecção (pelo menos um dos seguintes): febre > 38°C, calafrios, hipotensão arterial sistêmica. Para crianças < 12 meses acrescentar: hipotermia, apnéia, bradicardia;
- Crescimento de SCoN em 48 horas ou menos após a coleta;
- Critério complementar: Paciente em uso de dispositivo intravascular.

Falsa-Bacteremia ou contaminante

- Crescimento microbiano em hemoculturas > 48h;
- Uma hemocultura negativa quando colhidas 2 amostras;
- Hemocultura positiva para SCoN sem evidência clínica de infecção.

(LARGURA *et al.*, 1997; MIURA, E. 2002; GARNER *et al.*, 1996)

4.2.2 – Critérios de exclusão

Foram excluídas as amostras de pacientes com falsa bacteremia ou contaminante por SCoN.

4.3 – Métodos de identificação

As amostras isoladas foram encaminhadas e armazenadas em caldo trípico de soja (TSB - Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) com glicerol 15% a -20°C no banco de microrganismos do Laboratório Especial de Microbiologia Clínica – LEMC, da Disciplina de Infectologia da UNIFESP para realização dos testes de suscetibilidade e análise molecular.

A identificação das amostras foi obtida pelo Vitek[®] system Legacy (GPI – *Gram-Positive Identification Card*) nas amostras do HIAE e Vitek[®] 2 (ID-GP)

nas amostras do HNJ. O sistema Vitek[®] automatiza todas as etapas necessárias para a realização dos testes de identificação. (Software bioLiaison[®] no Vitek[®] system e AES (Advanced Expert System) no Vitek[®] 2).

4.4 – Métodos de determinação da suscetibilidade aos antimicrobianos

Os testes de suscetibilidade foram realizados após o isolamento e o subcultivo das amostras em ágar sangue. Quando retiradas do banco de microrganismos estas amostras foram subcutivadas por duas vezes em ágar sangue, conforme recomendado pelo “Clinical Laboratory Standards Institute” (CLSI, 2008).

4.4.1 – Disco difusão

Após o crescimento bacteriano em placas de ágar sangue por 18 horas, para a garantia da viabilidade e da pureza das amostras, com o auxílio de alças descartáveis, 3 a 5 colônias isoladas de cada amostra de *Staphylococcus* coagulase negativo foram transferidas para tubos contendo 4ml de salina estéril. A suspensão bacteriana foi homogeneizada e a turvação medida em turbidímetro digital (Baxter[®], Sacramento, EUA), para a obtenção de uma concentração bacteriana em torno de $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias (UFC)/ml correspondente a 0,5 da escala de McFarland (CLSI, 2008).

Após o preparo do inóculo a semeadura das amostras de SCoN foram feitas em placa de ágar Müeller-Hinton (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) com auxílio de swab estéril. O perfil de suscetibilidade foi realizado utilizando discos

de cefoxitina (30µg), oxacilina (1µg), teicoplanina (30µg), vancomicina (30µg) e linezolidina (30µg) (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra).

As placas foram incubadas em aerobiose a 37°C por 18 a 24 horas. Após este período, foi feita a leitura e os halos de inibição interpretados de acordo com os critérios de sensibilidade para *Staphylococcus* spp. estabelecidos pelo CLSI (2008).

O controle de qualidade dos discos de antimicrobianos e do meio de cultura foi realizado através da cepa *Staphylococcus aureus* ATCC[®] 25923 e os diâmetros dos halos obtidos foram comparados aos descritos na tabela 2C, M100-S18, do CLSI (2008).

4.4.2 – Etest[®] (AB Biodisk, Estocolmo, Suécia)

É um teste comercial que apresenta alta acurácia e fácil realização. Trata-se de uma técnica simples e de fácil execução pela qual se obtém a CIM (concentração inibitória mínima).

A metodologia Etest[®] foi empregada seguindo-se rigorosamente as instruções do fabricante. Uma suspensão bacteriana ajustada a 0,5 da escala de McFarland foi uniformemente semeada na placa de ágar Müller-Hinton e, quinze minutos após, as fitas de Etest[®] contendo oxacilina ($\leq 0,25\mu\text{g/mL}$ (S) e $\geq 0,5\mu\text{g/mL}$ (R)), teicoplanina ($\leq 8\mu\text{g/mL}$ (S), $16\mu\text{g/mL}$ (I) e $\geq 32\mu\text{g/mL}$ (R)) e linezolidina ($\leq 4\mu\text{g/mL}$ (S)) foram dispensadas sobre as placas separadamente.

As placas foram incubadas em aerobiose a 37°C por 18 a 24 horas. A MIC foi determinada como sendo a concentração indicada na intersecção entre a fita de Etest[®] e a zona elíptica de inibição do crescimento bacteriano. As

amostras foram classificadas em sensíveis ou resistentes de acordo com os limites de sensibilidade estabelecidos pelo CLSI para métodos diluicionais. Como controle foi utilizado cepa *Staphylococcus aureus* ATCC[®] 29213 de acordo com o CLSI (2008).

4.4.3 – Sistema automatizado Vitek[®] (bioMérieux)

Os perfis de suscetibilidade foram obtidos pelo Vitek[®] system Legacy (GPS – *Gram-Positive Susceptibility Card*) nas amostras do HIAE e Vitek[®] 2 (AST-GP67) nas amostras do HNJ, onde foram comparados aos testes de suscetibilidade preconizados pelo CLSI (2008). (Software bioLiaison[®] no Vitek[®] system e AES (Advanced Expert System) no Vitek[®] 2).

4.5 – PCR multiplex para detecção do gene *mecA* e determinação do tipo de SCC*mec*

A determinação do tipo de SCC*mec* e do gene *mecA* foi realizada utilizando-se o método de PCR Multiplex, conforme o protocolo desenvolvido por Zhang e colaboradores (2005). O protocolo detecta os SCC*mec* tipos I a V, incluindo quatro subtipos de SCC*mec* tipo IV (IVa, IVb, IVc, e IVd), utilizando apenas 9 *loci*, selecionados com base em seqüências do SCC*mec* descritas previamente e disponíveis no banco de dados GenBank (“National Center for Biotechnology Information”; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index>) (Ito *et al.*, 1999; Ito *et al.*, 2001;). As respectivas regiões alvo, cepas e números de acesso do GenBank no qual este protocolo foi delineado estão na Tabela 1.

Tabela 1. Regiões alvo, cepas controles e número de acesso do GenBank

SCCmec	Região	Cepa	Número de acesso GenBank
Tipo I	ORF E008	NCTC 10442	AB033763
Tipo II	kdpE	N315	D86934
Tipo III	ORF CZ049	85/2082	AB37671
Tipo IVa	ORF CQ002	CA05	AB063172
Tipo IVb	ORF CM001	8/6-3P	AB063173
Tipo IVc	ORF CR002	MR108	AB096217
Tipo IVd	ORF CG001	JCSC4469	AB0967677
Tipo V	ORF V011	JCSC3624	AB12121

Para a detecção do gene *mecA*, foi utilizado a cepa NCTC8325 (número de acesso GenBank X52593). As sequências dos primers utilizados nas reações de PCR multiplex para a determinação dos tipos de SCCmec estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Sequência dos primers utilizados na PCR multiplex para determinação dos tipos de SCC*mec*, segundo Zhang e colaboradores (2005).

Primer⁽¹⁾	Seqüência de oligonucleotídeos	Tamanho do amplicon (pb)	Especificidade
Tipo I-F	GCTTTAAAGAGTGTCGTTACAGG	613	SCC <i>mec</i> I
Tipo I-R	GTTCTCTCATAGTATGACGTCC		
Tipo II-F	CGTTGAAGATGATGAAGCG	398	SCC <i>mec</i> II
Tipo II-R	CGAAATCAATGGTTAATGGACC		
Tipo III-F	CCATATTGTGTACGATGCG	280	SCC <i>mec</i> III
Tipo III-R	CCTTAGTTGTCGTAACAGATCG		
Tipo IVa-F	GCCTTATTCTGAAGAAACCG	776	SCC <i>mec</i> IVa
Tipo IVa-R	CTACTCTTCTGAAAAGCGTCG		
Tipo IVb-F	TCTGGAATTACTTCAGCTGC	493	SCC <i>mec</i> IVb
Tipo IVb-R	AAACAATATTGCTCTCCCTC		
Tipo IVc-F	ACAATATTTGTATTATCGGAGAGC	200	SCC <i>mec</i> IVc
Tipo IVc-R	TTGGTATGAGGTATTGCTGG		
Tipo IVd-F	CTCAAATACGGACCCCAATACA	881	SCC <i>mec</i> IVd
Tipo IVd-R	TGCTCCAGTAATTGCTAAAG		
Tipo V-F	GAACATTGTTACTTAAATGAGCG	325	SCC <i>mec</i> V
Tipo V-R	TGAAAGTTGTACCCTTGACACC		
MecA147-F	GTGAAGATATACCAAGTGATT	147	<i>mecA</i> (controle interno)
MecA147-R	ATGCGCTATAGATTGAAAGGAT		

¹ Adaptado de Zhang e colaboradores, 2005.

4.5.1 – PCR multiplex

A detecção do gene *mecA* e determinação do tipo de SCC*mec* foi realizada utilizando-se o método de PCR mutiplex, conforme o protocolo de Zhang e colaboradores (2005), descrito a seguir. Foram utilizados 9 *loci*, selecionados com base nas seqüências do elemento *mec* descritas previamente e disponíveis no banco de dados GenBank.

4.5.2 – Extração do DNA genômico

Para a extração do DNA genômico foi utilizado a metodologia de extração por fervura, segundo Zhang e colaboradores (2005). Para isso, de uma a cinco colônias bacterianas, crescidas em placa de ágar Columbia (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) acrescido de sangue de carneiro a 5%, foram suspensas em 50 µL de água destilada estéril contidos em tubo eppendorf. Os eppendorfs foram aquecidos a 99°C em “banho maria” durante cerca de 10 minutos. Após esta etapa, os tubos foram submetidos a centrifugação durante 3 minutos à 13000 rpm. Uma alíquota de 40uL do sobrenadante foi estocado em freezer e utilizado posteriormente 2µL desta para a reação de PCR (volume final de 25 µL).

4.5.3 – Reação de amplificação

Para a PCR foi utilizada as seguintes condições de reação: 12,5µL de Mastermix para multiplex (Qiagen, Valencia, CA, EUA), um total de 7,7µL de primers, 2,8µL de água estéril deionizada e 2µL do sobrenadante da extração de DNA. A reação de amplificação foi realizada no termociclador MasterCycler gradient (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), utilizando o seguinte programa: 5

min à 94°C, seguido por 10 ciclos de 45s à 94°C, 45s à 65°C e 1,5 min à 72°C e outros 25 ciclos de 45s a 94°C, 45s a 55°C e 1,5 min a 72°C. O programa termina com uma extensão adicional de 10 min à 72°C. Os tubos foram mantidos à 20°C até o momento da eletroforese (Zhang *et al.*, 2005).

4.5.4 – Eletroforese

Após a reação de amplificação, foi acrescentado 4µL de 'loading' em cada tubo e os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% (contendo brometo de etídio) em tampão TBE 0,5X por 40 minutos a 120V. Como padrão de peso molecular foi utilizado um marcador de peso molecular de 100bp (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA). Os fragmentos de DNA foram visualizados e fotografados sob transiluminação ultravioleta..

4.5.5 – Cepas de *S. aureus* utilizadas para controle na reação de PCR Multiplex utilizadas na determinação do tipo de SCCmec

Como controles positivos para os diferentes tipos de SCCmec foram utilizadas as seguintes cepas de MRSA:

NCTC 10422	SCCmec tipo I
N315	SCCmec tipo II
85/2082	SCCmec tipo III
JCSC 1968 / CA05	SCCmec tipo IVa
JCSC1978 / 8/6-3P	SCCmec tipo IVb
MR 108	SCCmec tipo IVc
JCSC 4469	SCCmec tipo IVd
JCSC 3624 / WIS [WBG8318]	SCCmec tipo V

(Ito *et al.*, 2001; Ito *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2002; Okuma *et al.*, 2002).

As cepas controles foram gentilmente cedidas pelo Prof Keiichi Hiramatsu e Prof^a Teruyo Ito, do Departamento de Bacteriologia, Universidade de Juntendo - Tóquio, Japão, e Prof. Robert S. Daum, Universidade de Chicago, Departamento de Pediatria, Chicago, Illinois. Como controle negativo, utilizou-se água destilada deionizada estéril.

4.6 – Análise de concordância – Kappa (K)

O grau de concordância entre os resultados de oxacilina, cefoxitina e a presença do gene *mecA* foram definidos pelo cálculo do coeficiente kappa (K). Considera-se valores de 0,8 - 1 (muito bom); 0,6 - 0,8 (bom); 0,4 - 0,6 (moderado); 0,2 - 0,4 (baixo); 0 - 0,2 (insignificante); < 0 (sem concordância) (Feinstein *et al.*, 1990).

5 - RESULTADOS

5.1 – Identificação dos SCoN

Foram isolados 93 SCoN nos dois hospitais gerais da cidade de São Paulo, no período de agosto/2005 à agosto/2007.

A figura 1 mostra que destes 93 isolados, 69 (76,0%) foram *Staphylococcus epidermidis*, 7 (8,0%) *Staphylococcus hominis*, 6 (6,0%) *Staphylococcus haemolyticus*, 4 (4,0%) *Staphylococcus simulans*, 3 (3,0%) *Staphylococcus warneri*, 3 (3,0%) *Staphylococcus capitis*, e 1 (1,0%) *Staphylococcus auricularis*.

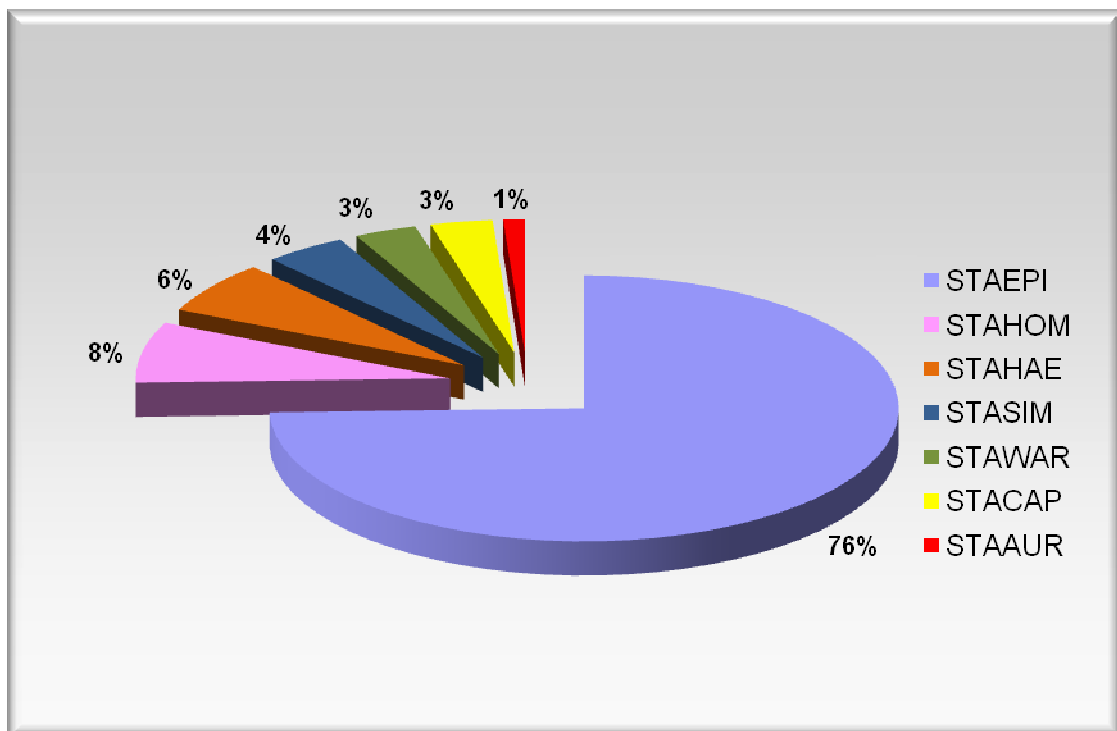


Figura 1: Espécies de SCoN isoladas em ambos hospitais (HIAE e HNJ) no período de agosto/2005 à agosto/2007

A distribuição dos SCoN entre os dois hospitais do referente estudo está demonstrada na figura 2, sendo que as espécies encontradas no HIAE foram

74,0% (54) *Staphylococcus epidermidis*, 5,5% (4) *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus haemolyticus* e *Staphylococcus simulans*, 4,1% (3) *Staphylococcus warneri* e *Staphylococcus capitis*, 1,3% (1) *Staphylococcus auricularis*. As espécies de SCoN encontradas no HNJ foram 75,0% (15) *Staphylococcus epidermidis*, 15,0% (3) *Staphylococcus hominis* e 10,0% (2) *Staphylococcus haemolyticus*.

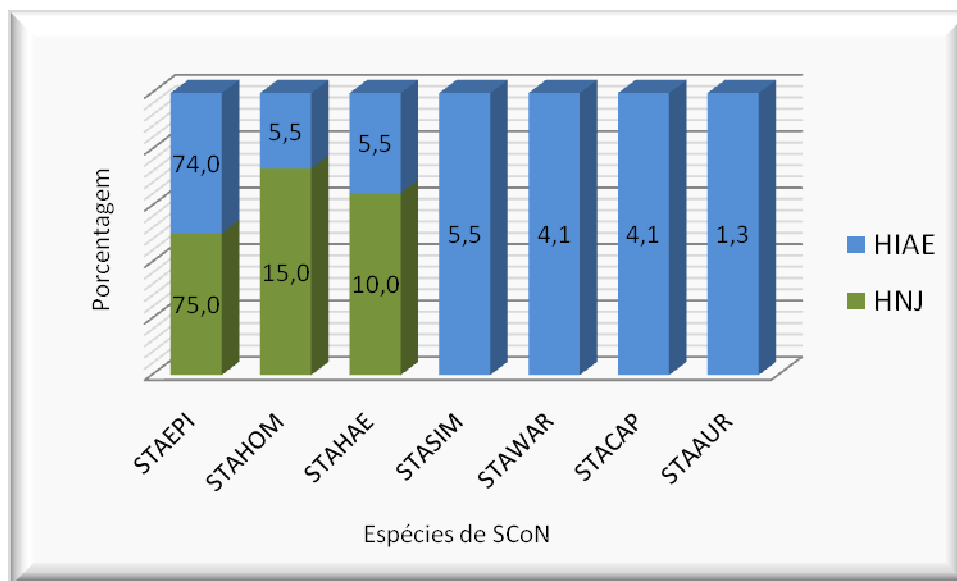


Figura 2: Distribuição das espécies de SCoN por hospital estudado (HIAE e HNJ)

5.2 – Perfil de suscetibilidade dos SCoN

Como observado na tabela 5, os antimicrobianos testados pela técnica de disco difusão nos isolados de SCoN, foram oxacilina, cefoxitina, teicoplanina, vancomicina e linezolida. A porcentagem destes está dividida por espécie. Uma alta taxa de resistência foi observada para oxacilina/cefotina nas diferentes espécies de SCoN. Uma amostra mostrou-se resistente à linezolida. Em relação à resistência à oxacilina e cefoxitina observou-se um grau de concordância muito bom ($k=1$)

Tabela 1: Perfil de suscetibilidade dos isolados de SCoN definidos pela técnica de disco difusão, utilizando oxacilina, cefoxitina, teicoplanina, vancomicina e linezolida

Antimicrobianos	STAEPI	STAHOM	STAHAE	STASIM	STAWAR	STACAP	STAAUR
Total de isolados	69	7	6	4	3	3	1
Oxacilina	11,8	14,3	0,0	0,0	33,4	33,4	100,0
Cefoxitina	11,8	14,3	0,0	0,0	33,4	33,4	100,0
Teicoplanina	100,0	100,0	66,6	85,0	100,0	100,0	100,0
Vancomicina	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Linezolida	98,6	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

A figura 3 mostra os antimicrobianos testados pela técnica de disco difusão em todos isolados de SCoN. Entre os antimicrobianos avaliados, uma alta taxa de resistência foi observada para oxacilina/cefcoxitina (88,2%), porém houve 100% de suscetibilidade à vancomicina e 98,9% à linezolida.

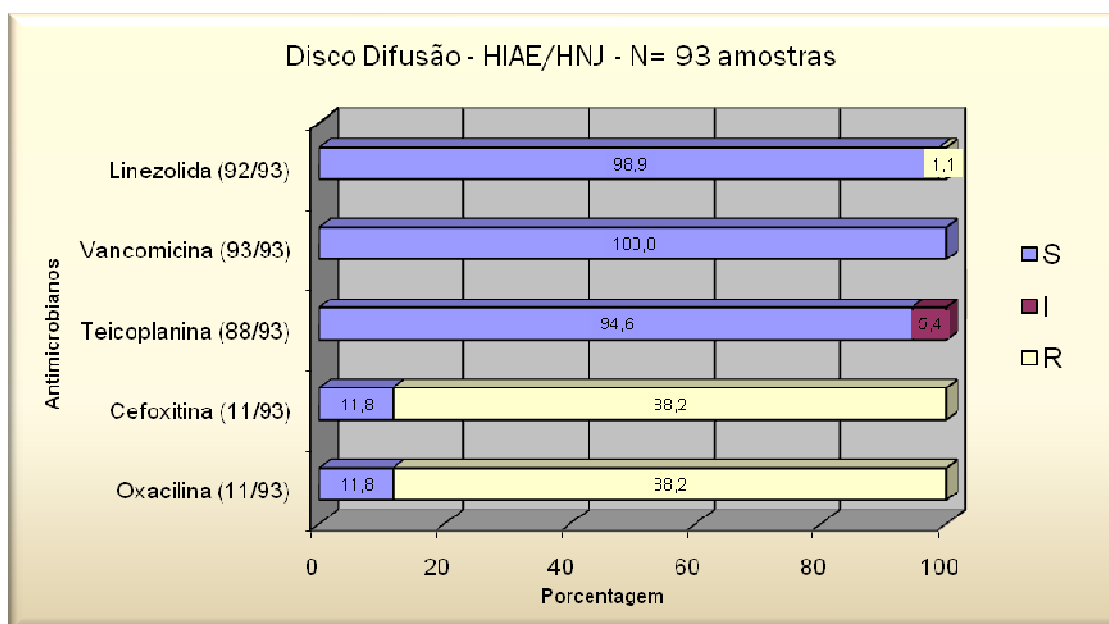


Figura 3: Teste de suscetibilidade nos isolados de SCoN por disco difusão em ambos hospitais (HIAE e HNJ) (n° amostras suscetíveis/n° amostras testadas)

Na figura 4 observa-se os antimicrobianos testados pela técnica de disco difusão nos isolados de SCoN provenientes somente do HIAE, totalizando 73

amostras. Entre os antimicrobianos avaliados, uma alta taxa de resistência foi observada para oxacilina/cefotitina (86,3%), e em relação à vancomicina houve 100% de suscetibilidade à vancomicina e 98,6% à linezolida.

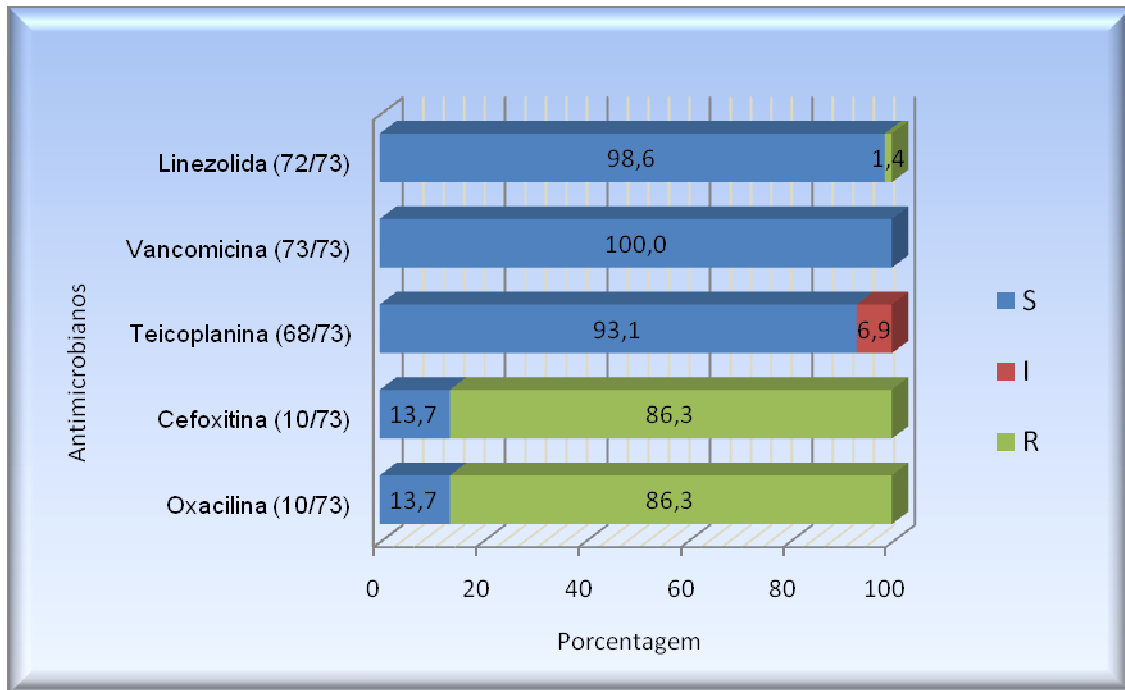


Figura 4: Teste de suscetibilidade nos isolados de SCoN por disco difusão somente do HIAE (n° amostras suscetíveis/n° amostras testadas)

Observa-se na figura 5 os antimicrobianos testados pela técnica de disco difusão nos isolados de SCoN provenientes somente do HNJ, totalizando 20 amostras. Entre os antimicrobianos avaliados, uma alta taxa de resistência foi observada para oxacilina/cefotitina (95,0%) e 100% mostraram-se suscetíveis à vancomicina e à linezolida.

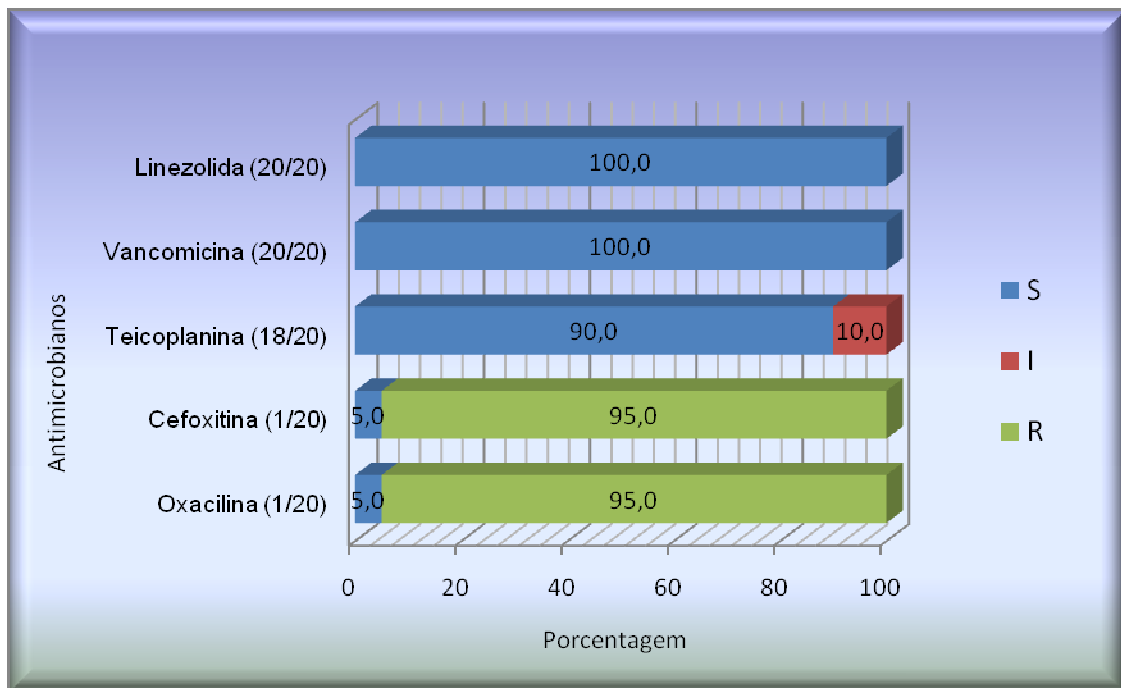


Figura 5: Teste de suscetibilidade nos isolados de SCoN por disco difusão somente do HNJ (n° amostras suscetíveis/n° amostras testadas)

A figura 6 mostra os antimicrobianos testados pelo sistema automatizado Vitek[®] system e Vitek[®] 2 nos isolados de SCoN provenientes dos dois hospitais gerais, totalizando 93 amostras. Entre os antimicrobianos avaliados, a oxacilina mostrou-se resistente em 89,9% dos isolados. Não foi testada teicoplanina, pois não está incluída nos cartões do Vitek[®].

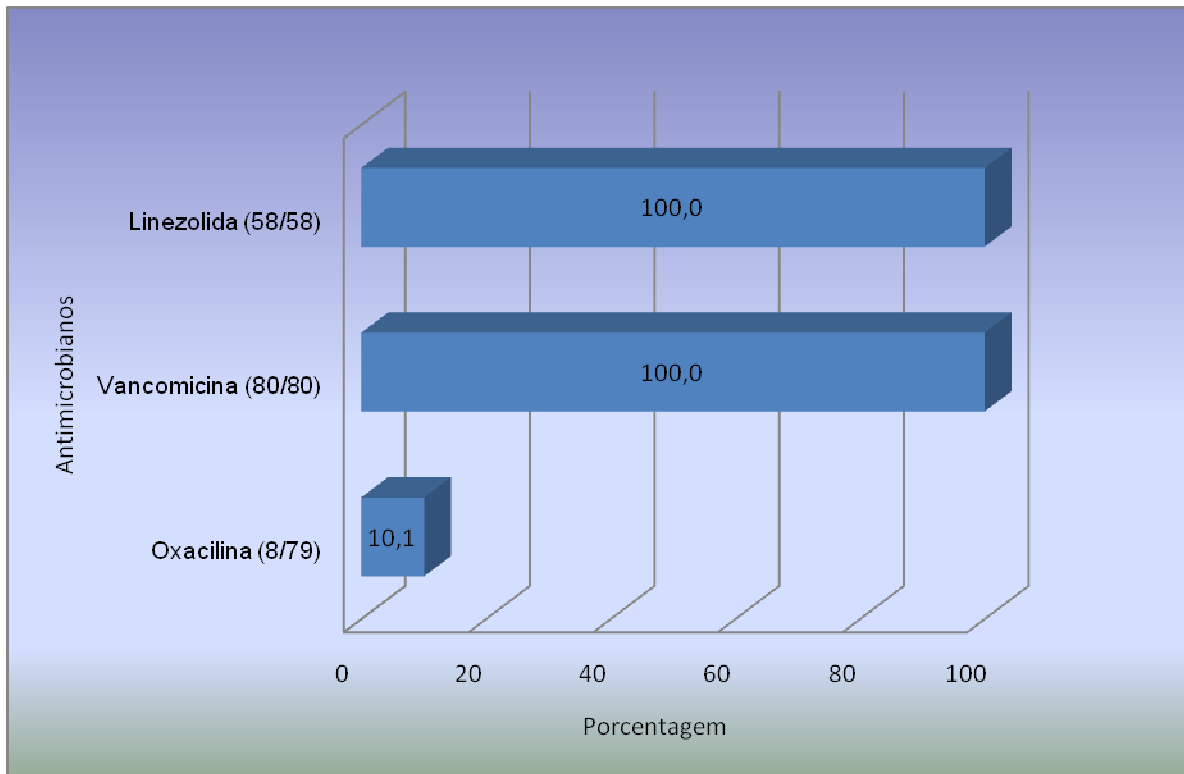


Figura 6: Perfil de suscetibilidade dos isolados de SCoN definidos pelo sistema automatizado, Vitek[®] system e Vitek[®] 2 - HIAE/HNJ – (n° amostras suscetíveis/n° amostras testadas)

A figura 7 mostra os antimicrobianos testados pelo sistema automatizado Vitek[®] system, somente nas amostras do HIAE. Entre os isolados testados, 90,0% foram resistentes à oxacilina. Houve 100% de suscetibilidade à vancomicina e à linezolida. Não foi possível detectar o isolado resistente à linezolida pelo Vitek[®] system, pois de 73 isolados, somente 38 foram testados.

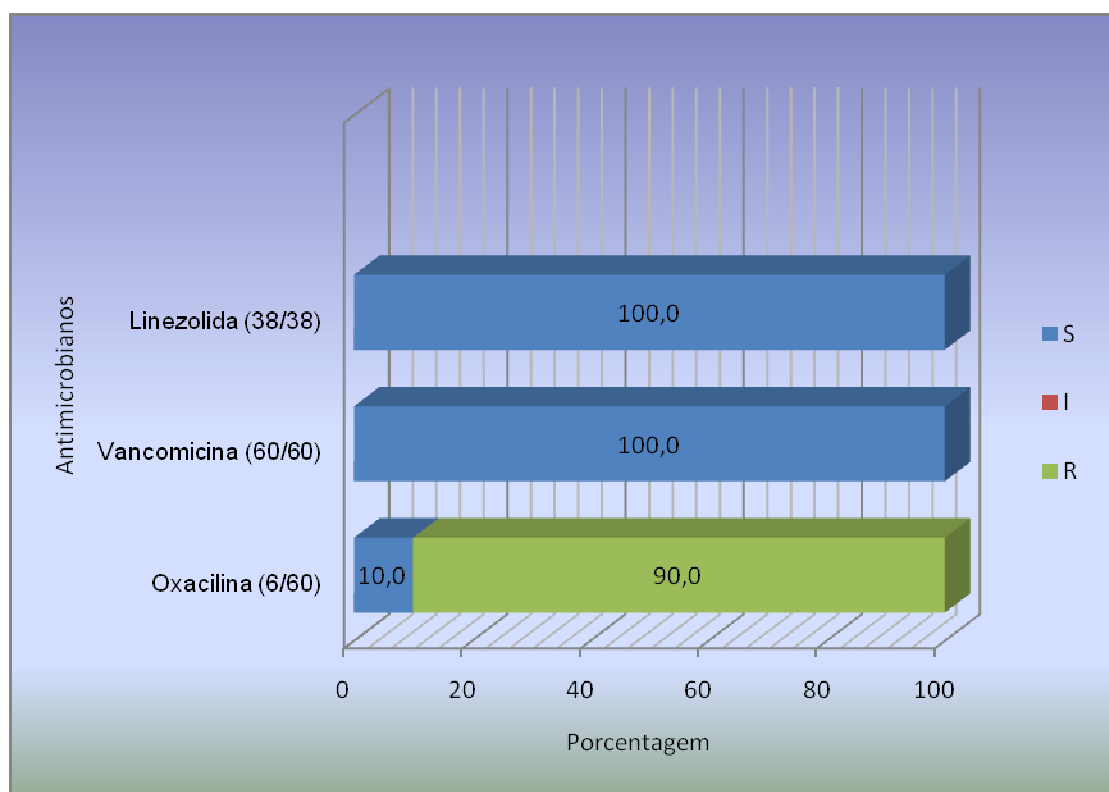


Figura 7: Distribuição do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos testados no Vitek® system nos isolados de SCoN do HIAE (n° amostras suscetíveis/n° amostras testadas)

A figura 8 mostra os antimicrobianos testados pelo sistema automatizado Vitek® 2, somente nas amostras do HNJ. Entre os isolados testados, 90,0% foram resistentes à oxacilina. Houve 100% de suscetibilidade à vancomicina e à linezolida, constatando o mesmo perfil nos dois hospitais pelo sistema automatizado Vitek®.

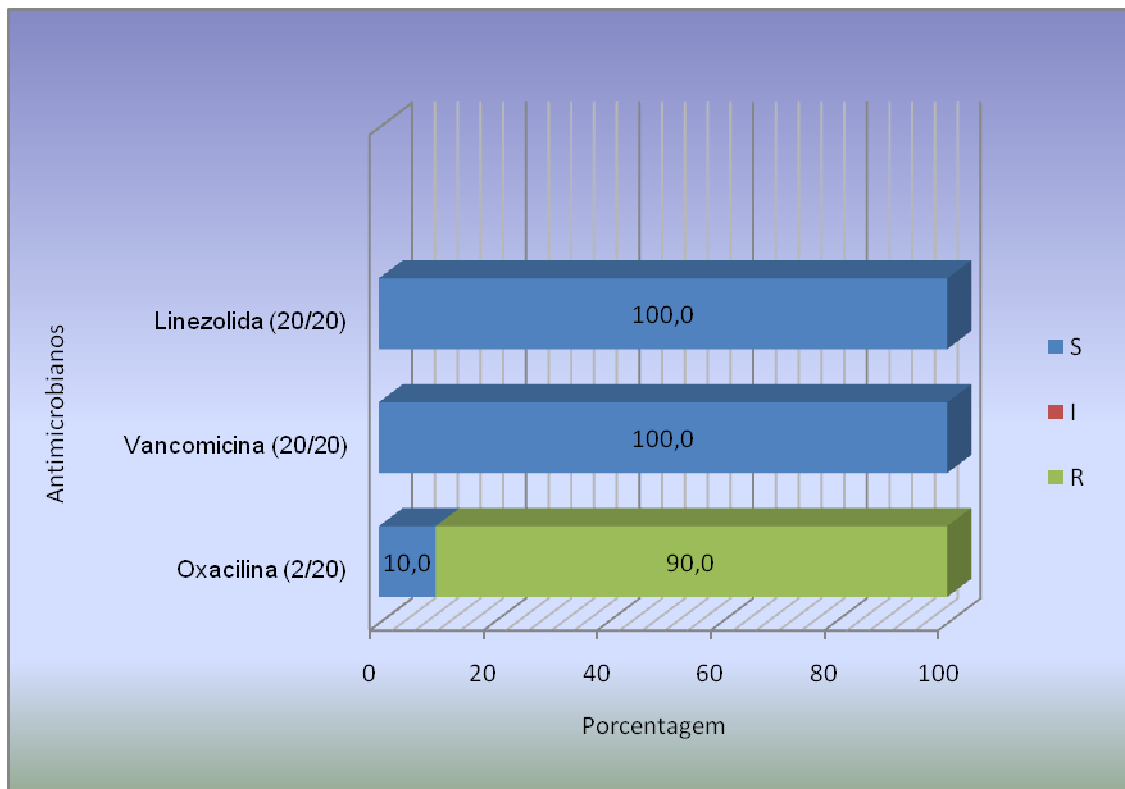


Figura 8: Distribuição do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos testados no Vitek® 2 nos isolados de SCoN do HNJ (n° amostras suscetíveis/n° amostras testadas)

O painel de todos os antimicrobianos testados no Vitek® system e Vitek® 2 estão em anexo.

A tabela 2 mostra os resultados do Etest® realizados em cinco isolados que mostraram resistência intermediária à teicoplanina e um isolado resistente à linezolida, ambos detectados anteriormente por disco difusão. Entre estes isolados estão *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* e *S. simulans*. Em quatro isolados houve persistência da resistência intermediária à teicoplanina e o outro isolado mostrou-se sensível pelo Etest®. Um isolado de *Staphylococcus epidermidis* mostrou-se resistente à linezolida em ambos os testes.

Tabela 2: Perfil de suscetibilidade de alguns isolados de SCoN pelo Etest®

Identificação	STAEPI	STAEPI	STAHAE	STAHAE	STASIM
Antimicrobiano					
<u>Teicoplanina</u>					
E-test®	16µg/mL (I)	8µg/mL(S)	16µg/mL (I)	12µg/mL (I)	24µg/mL (I)
Disco	13mm (I)	13mm (I)	11mm (I)	12mm (I)	13mm (I)
<u>Linezolida</u>					
E-test®	≥256µg/mL (R)				
Disco	18mm (R)				

Valores de referência: teicoplanina ≤8 (S), 16(I) e ≥32 (R); linezolida ≤4 (S) (CLSI, 2008).

5.3 – Detecção do gene *mecA* e caracterização dos tipos de SCC*mec*

Foi feita a comparação do perfil de suscetibilidade por disco difusão entre oxacilina e cefoxitina com a presença ou não do gene *mecA*, ambos antimicrobianos apresentaram a mesma porcentagem. 87,1% do total de isolados (N=93) foram oxacilina/cefexitina resistentes e apresentaram o gene *mecA*.

A tabela 3 mostra a relação entre oxacilina e a presença ou não do gene *mecA* juntamente com a presença ou não do SCC*mec*.

- 60,2% mostraram-se resistentes à oxacilina, *mecA* positivo e presença de SCC*mec*;
- 26,9% mostraram-se resistentes à oxacilina, *mecA* positivo, sem SCC*mec*;
- Apenas um isolado mostrou-se resistente à oxacilina, *mecA* negativo, presença de SCC*mec*.

- Dois isolados foram suscetíveis à oxacilina, *mecA* negativo, presença de *SCCmec*;

- Nove isolados de SCoN foram suscetíveis à oxacilina, *mecA* negativo, sem *SCCmec*.

Tabela 3: Relação da presença ou ausência do gene *mecA*, *SCCmec* e OXA sensível ou resistente

	<i>mecA</i> positivo		<i>mecA</i> negativo	
	<i>SCCmec</i> (+)	<i>SCCmec</i> (-)	<i>SCCmec</i> (+)	<i>SCCmec</i> (-)
OXA 'R'	56	25	1	0
OXA 'S'	0	0	2	9
Total	60,2%	26,9%	3,2%	9,7%

A relação entre os isolados resistentes à oxacilina e a presença do gene *mecA* mostrou um grau de concordância muito bom ($k=0,95$).

A tabela 8 mostra a relação entre as espécies de SCoN e os tipos de *SCCmec* encontrados. A espécie predominante foi *S. epidermidis* e o tipo de *SCCmec* predominante foi o *SCCmec* tipo III.

Tabela 4: Relação das espécies de SCoN de acordo com o tipo de *SCCmec* encontrado

Espécies de SCoN	Tipos de <i>SCCmec</i>								Total
	I	II	III	IVa	IVb	IVc	IVd	V	
STAEPi	3		30	12		2		1	48
STAHAE		1	1		1			1	4
STASIM			1	1		1			3
STAHOM									0
STAWAR		1							1
STACAP			2						2
STAAUR			1						1
Total	3	2	35	13	1	3	0	2	59

A figura 9 mostra a distribuição dos tipos de *SCCmec* encontrados nos isolados de SCoN. Observa-se o predomínio do *SCCmec* tipo III, seguido do *SCCmec* tipo IVa.

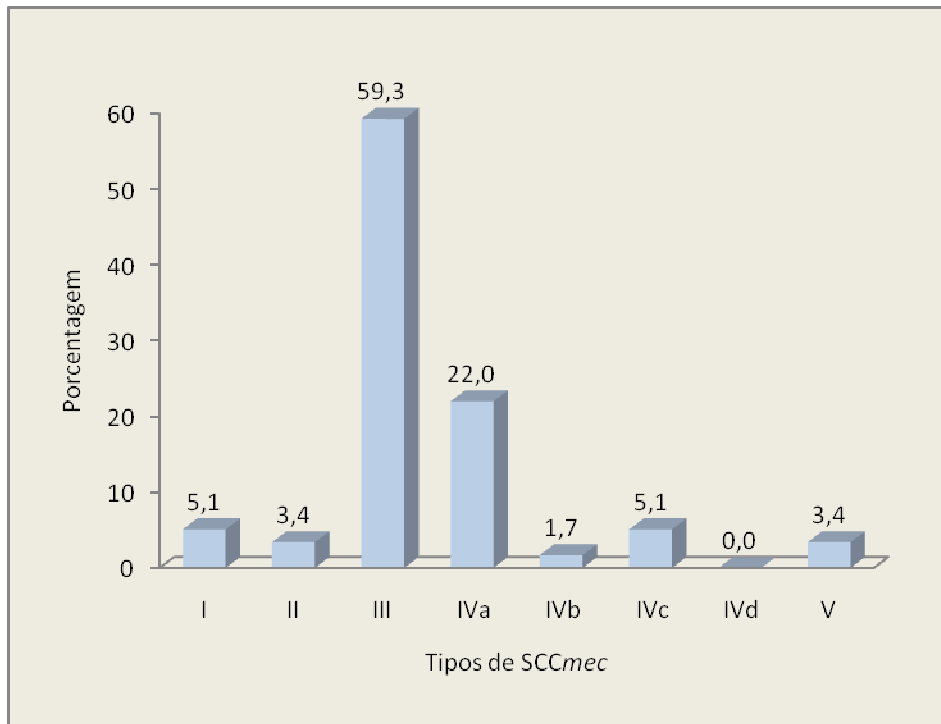


Figura 9: Distribuição dos tipos de SCCmec encontrados nos isolados de SCoN

Na figura 10 observa-se a presença de SCCmec nas espécies de SCoN. Não houve detecção de nenhum tipo de SCCmec nas amostras de *S. hominis*.

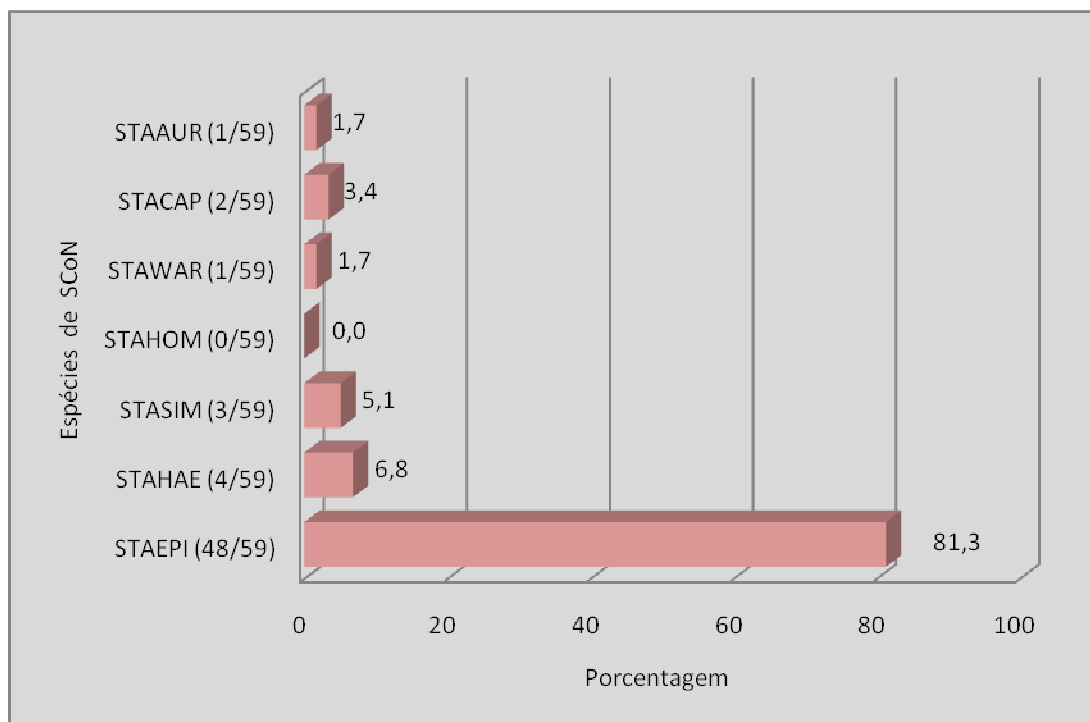


Figura 10: Porcentagem de SCCmec encontrados nas diferentes espécies de SCoN

A figura 11 mostra a distribuição dos tipos de SCCmec encontrados nos isolados de *S. epidermidis*. Não foram detectados SCCmec do tipo II, tipo IVb e tipo IVd.

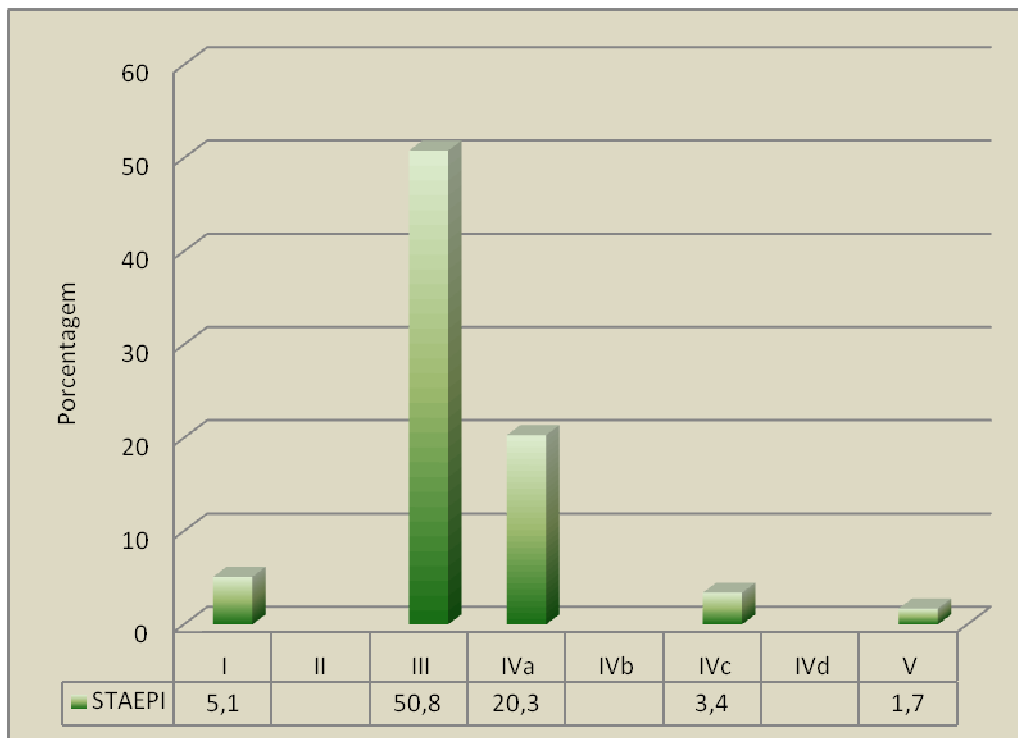


Figura 11: Distribuição dos tipos de SCCmec nas amostras de STAEPi

Na figura 12 pode ser observada a distribuição dos tipos de SCCmec nas espécies não-epidermidis de SCoN. Não foram detectados SCCmec do tipo I e tipo IVd. *S. auricularis* e *S. capitis* apresentaram SCCmec do tipo III. *S. warneri* apresentou SCCmec do tipo II. *S. simulans* apresentou SCCmec do tipo III, IVa e IVc. *S. haemolyticus* apresentou SCCmec do tipo II, III, IVb e V.

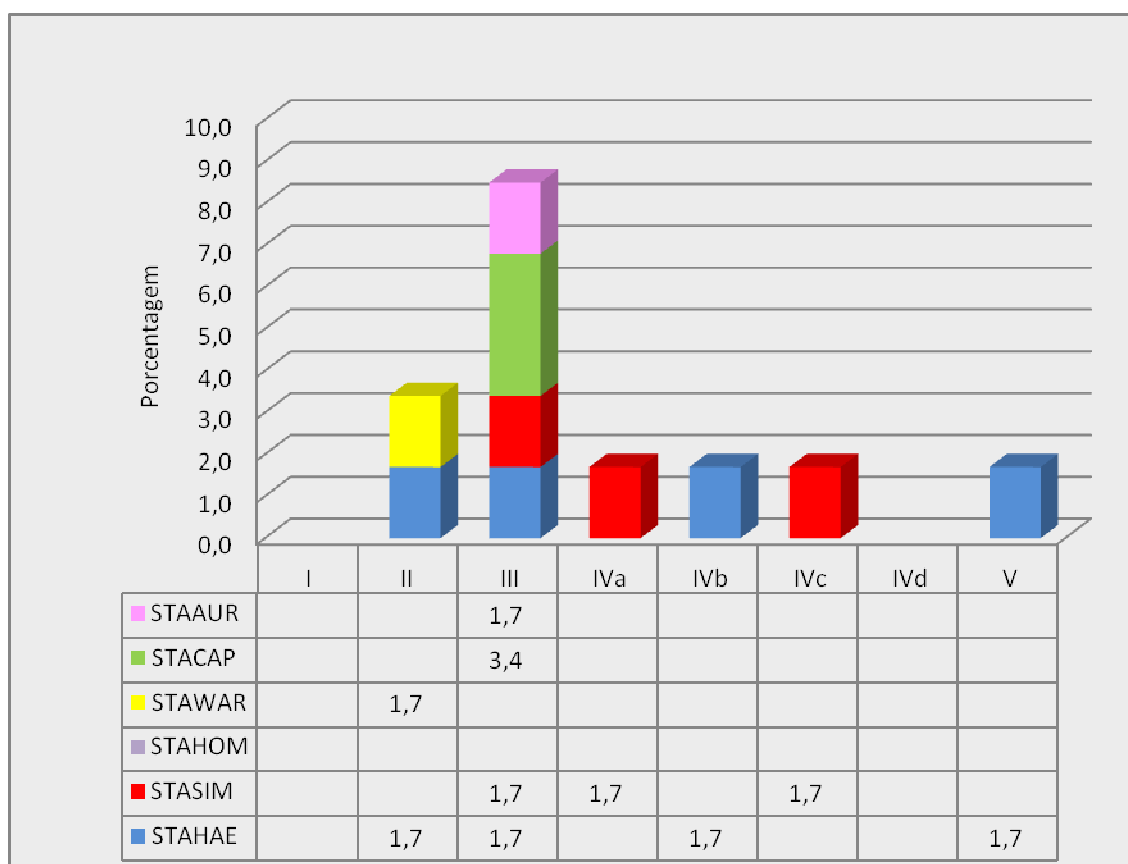


Figura 12: Distribuição dos tipos de SCCmec nas espécies não-epidermidis de SCoN

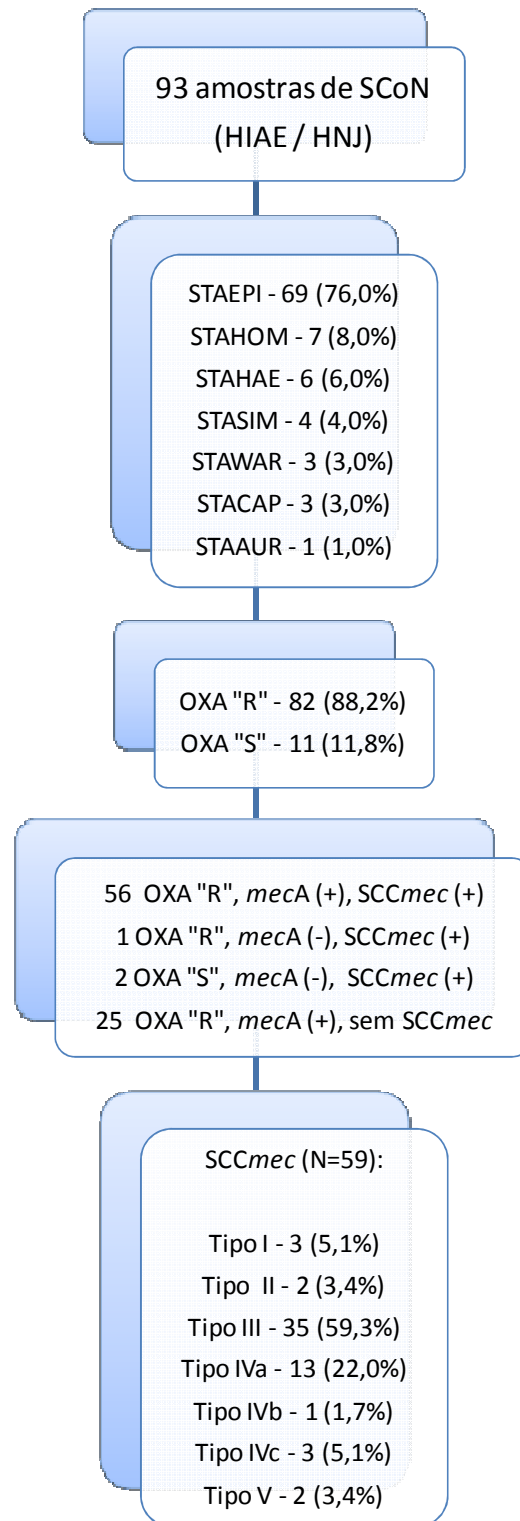


Figura 13: Fluxograma geral dos resultados em relação à espécie, à oxacilina, *mecA* e tipo de *SCCmec*

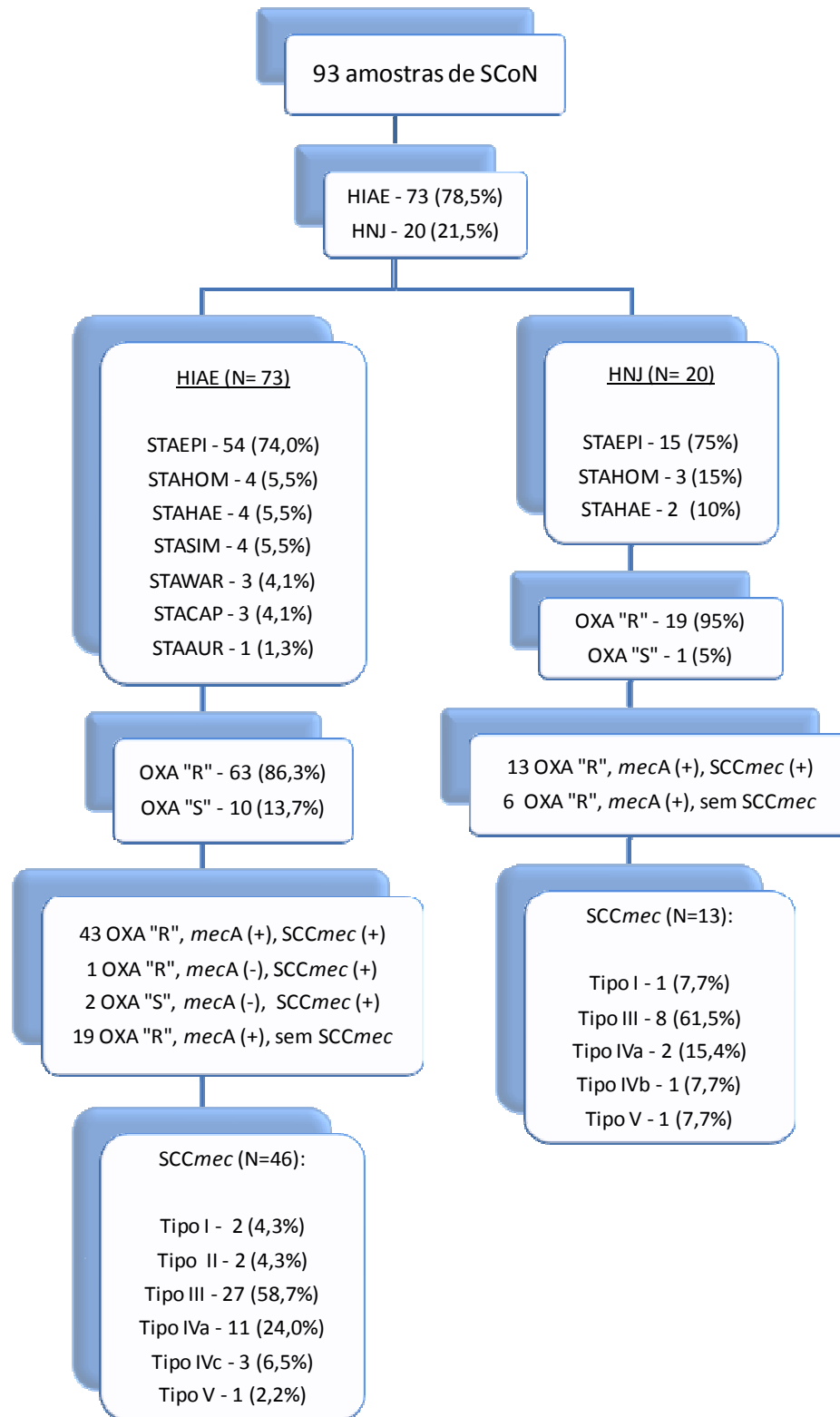


Figura 14: Fluxograma dos resultados em relação à espécie, à oxacilina, *mecA* e tipo de *SCCmec* separando os dois hospitais estudados

6 - DISCUSSÃO

Os SCoN são considerados a maior causa de bacteremias em pacientes hospitalizados. A resistência antimicrobiana dos SCoN aumenta a morbidade, mortalidade e os custos hospitalares dos pacientes (MARSHALL *et al.*, 1998)

Dentre os SCoN, *Staphylococcus epidermidis* é a espécie encontrada com maior frequência nas infecções relacionadas à assistência à saúde, em particular naquelas associadas com cateteres intravasculares. *S. haemolyticus* é a segunda espécie mais encontrada e também é conhecida como causa de infecções relacionadas a cateter, sepse, endocardite, entre outras (HEIKENS *et al.*, 2005).

Neste estudo, *Staphylococcus epidermidis* (76%) foi a principal espécie identificada dentre os 93 isolados de IrAS provenientes de infecções da corrente sanguínea. Em seguida foram encontrados *S. hominis* e *S. haemolyticus* representando 8% cada.

A identificação das espécies de SCoN, embora seja de difícil realização para a maioria dos laboratórios clínicos, é necessária para diferenciar o potencial patogênico e o perfil de resistência de cada espécie (De PAULIS *et al.*, 2003).

No mercado existem vários sistemas automatizados para identificação de espécies e para testes de suscetibilidade, dentre eles o Vitek[®] 2, o qual foi recentemente redesenhado para aumentar a acurácia na identificação de cocos Gram-positivos. Estudo de Layer e colaboradores (2006) mostrou que o Vitek[®] 2 identificou corretamente 86% das cepas dos SCoN por espécies, mas 10% delas foram discriminadas fracamente.

O método de disco difusão é amplamente utilizado pelos laboratórios de microbiologia clínica por ser de fácil execução e baixo custo. Para detecção de resistência à oxacilina, o CLSI padronizou o uso do disco de cefoxitina, por ser um forte indutor de sistema regulatório *mecA*. Baseado em um estudo brasileiro realizado no Hospital São Paulo, cinco isolados de SCoN mostraram-se resistentes à oxacilina e sensíveis à cefoxitina pelos discos, sendo estes gene *mecA* positivos, o presente estudo comparou os halos de inibição para os dois antimicrobianos (FRIGATTO *et al.*, 2005).

No teste de disco difusão foram avaliados a oxacilina, cefoxitina, teicoplanina, vancomicina e a linezolida em todas as amostras. A taxa de resistência em relação à oxacilina foi a mesma encontrada na cefoxitina, ambas com 88,2% de resistência dentre os 93 SCoN. A resistência à oxacilina foi semelhante nos dois hospitais, sendo 86,3% no HIAE e 95,0% no HNJ.

A cefoxitina é considerada um melhor preditor do que a oxacilina para detecção da heteroresistência porque é um indutor mais forte da PBP2a (FELTEN *et al.*, 2002). Os halos com o disco de cefoxitina apresentam melhor visibilidade do que os halos de oxacilina (CLSI, 2008). Sendo assim, no teste de disco difusão a cefoxitina pode ser utilizada para predizer a presença do gene *mecA* com alto grau de sensibilidade e especificidade quando comparada com a detecção do gene *mecA* pela técnica de PCR. A utilização do disco de cefoxitina juntamente com o disco de oxacilina para detecção de isolados resistentes à oxacilina deve ser encorajada, pois casos discrepantes não poderiam ser detectados com a utilização apenas do disco de cefoxitina e os isolados seriam erroneamente classificados como sensíveis. Além disso, a diferença de 1mm na leitura dos halos de ambos os antimicrobianos poderia

classificar um isolado sensível como resistente ou vice-versa e a análise em conjunto dos dois antimicrobianos pode sanar dúvidas no momento da interpretação do resultado (FRIGATTO *et al.*, 2005).

Foi demonstrado que os testes de disco difusão com cefoxitina e o sistema automatizado Vitek[®] são boas opções para a triagem da resistência à oxacilina em laboratórios de microbiologia clínica.

Os testes de suscetibilidade aos antimicrobianos para oxacilina apresentaram resultados concordantes, pois 82 isolados apresentaram resistência a este antimicrobiano, sendo um pouco acima do verificado na literatura internacional, os quais mostram 50 a 70% dos isolados resistentes (LIVERMORE, 2000; STEFANI *et al.*, 2003). Estudos nacionais relatam isolados de SCoN com resistência à oxacilina entre 66% e 68% (FERREIRA *et al.*, 2002; CHANG *et al.*, 2003).

No teste de disco difusão, os isolados de SCoN em relação à teicoplanina apresentaram 5,4% de resistência intermediária nos dois hospitais onde separadamente mostrou-se 6,9% no HIAE e 10,0% no HNJ. Ambos os hospitais mostraram 100% de suscetibilidade à vancomicina. Dados do SENTRY informam um total de 91,3% de suscetibilidade à teicoplanina em relação aos isolados de SCoN (SADER *et al.*, 2001).

Foram observados cinco isolados com suscetibilidade diminuída, ou seja, resistência intermediária, e um total de 88 isolados suscetíveis. Dados nacionais (NUNES *et al.*, 2002) também demonstram essas discordâncias no estudo de suscetibilidade à teicoplanina quando o teste de disco difusão e um método dilucional é empregado, onde aproximadamente 25% dos SCoN apresentam resistência intermediária a este antimicrobiano. Estes dados

demonstram que um método dilucional é necessário quando se estuda os glicopeptídeos, porque embora a teicoplanina e a vancomicina sejam análogos, apresentam diferente comportamento nos testes de suscetibilidade (TENOVER *et al.*, 1997; LIVERMORE, 2000, SLOOS, 2000b) e, “in vivo” durante a terapia antimicrobiana com teicoplanina, podem ocorrer isolados resistentes (CHAMBERS, 1997). Os isolados resistentes à teicoplanina têm em comum a característica de serem resistentes a uma grande variedade de outros antimicrobianos (TENOVER *et al.*, 1997; DEL’ALAMO *et al.*, 1999; LIVERMORE, 2000).

Neste estudo os cinco isolados intermediários à teicoplanina também foram resistentes à oxacilina, característica esta que estatisticamente parece estar relacionada à resistência aos glicopeptídeos (TENOVER *et al.*, 2001) ou seja, para que um isolado apresente resistência a um glicopeptídeo este, em primeiro lugar, deve ser resistente à oxacilina. Um isolado de *Staphylococcus epidermidis* mostrou-se resistente à linezolida. Esta resistência está associada com uma mutação no rRNA (PRYSTOWSKY *et al.*, 2001). Em um estudo realizado por Jones e colaboradores (2007) foram encontrados 808 isolados de SCoN, onde 13 destes isolados mostraram-se resistentes à linezolida, sendo onze *Staphylococcus epidermidis* e dois *Staphylococcus haemolyticus*. A introdução da linezolida tem facilitado a terapia antimicrobiana nas infecções causadas por bactérias Gram-positivas resistentes a outras classes de antimicrobianos (Diekema e Jones, 2001; Livermore, 2003; Moellering, 2003).

Juntamente com o teste de disco difusão foi utilizado o sistema automatizado Vitek[®] para identificar o perfil de suscetibilidade. Como este estudo foi retrospectivo, as amostras do HIAE já haviam sido identificadas no

Vitek[®] System. Já a identificação das amostras do HNJ foi realizada no Vitek[®] 2, por isso a diferença de alguns antimicrobianos nos cartões. Mesmo assim as amostras dos dois hospitais obtiveram resultados semelhantes.

Dos 93 isolados, 82 apresentaram resistência à oxacilina e 11 foram suscetíveis. Foi realizada a técnica de PCR Multiplex conforme Zhang e colaboradores (2005) em todos os isolados para identificação do gene *mecA* e da presença e tipo de *SCCmec*. Dos 82 isolados resistentes à oxacilina, 81 (87,1%) apresentaram *mecA* positivo. Desses 81 *mecA* positivos, 56 (60,2%) mostraram algum tipo de *SCCmec*. Outros 25 isolados resistentes à oxacilina e *mecA* positivos (26,9%) não apresentaram *SCCmec*. E outros nove isolados foram suscetíveis à oxacilina, não apresentaram *mecA* nem *SCCmec*.

Dois isolados, sendo um *S. auricularis* e outro *S. capitis* mostraram-se suscetíveis à oxacilina, sem *mecA* e com *SCCmec* tipo III. Um isolado de *S. warneri* mostrou-se resistente à oxacilina com CIM 0.38µg/ml, *mecA* negativo e *SCCmec* tipo II. Os resultados dessas amostras foram confirmados e não foi encontrado referência na literatura para tais achados. Estas amostras foram selecionadas para posteriores estudos moleculares

Neste estudo foi descrita a distribuição dos principais tipos de *SCCmec* em uma população de SCoN isolados de infecções da corrente sanguínea. Foram identificados 3 (5,1%) isolados para o *SCCmec* tipo I, 2 (3,4%) isolados para o *SCCmec* tipo II, 35 (59,3%) isolados para o *SCCmec* tipo III, 17 (28,8%) isolados para o *SCCmec* tipo IV e 2 (3,4%) isolados para o *SCCmec* tipo V. Como esperado, houve predomínio do *SCCmec* tipo III.

Os *SCCmec* do tipo I ao V já foram descritos em SCoN. Já foram encontrados *S. epidermidis* comunitários meticilina resistentes (C-MRSE) com

o SCCmec tipo IV (HISATA *et al.*, 2005; WISPLINGHOFF *et al.*, 2003) e o SCCmec tipo V já foi encontrado entre os SCoN, principalmente nos *S. haemolyticus* (ITO *et al.*, 2004).

A estrutura e distribuição dos tipos de SCCmec em *S. aureus* é amplamente estudada (CHONGTRAKOOL *et al.*, 2006; HISATA *et al.*, 2005; HIRAMATSU *et al.*, 2004; ITO *et al.*, 2001; KATAYAMA *et al.*, 2001), porém para os SCoN os dados são apenas comparativos e em estudos que visam determinar se houve ou não transmissão entre as espécies (HANSSEN *et al.*, 2004; HISATA *et al.*, 2005).

Estudo de Palazzo e colaboradores (2008) mostrou seis isolados de *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus* provenientes de infecção da corrente sanguínea, em dois hospitais brasileiros, sendo um destes o Hospital Nove de Julho (amostras isoladas após agosto de 2007). Cinco destes isolados mostraram-se multiresistentes com SCCmec tipo III. Somente um isolado foi suscetível à oxacilina e à vancomicina. Pelo menos cinco destas infecções de ambos hospitais foram causadas por um único clone.

Em um estudo realizado por Machado e colaboradores (2007) foi encontrado entre 15 isolados de *S. haemolyticus* SCCmec tipo I (7,8%) e tipo II (3,1%). Em 13 isolados de *S. hominis* apenas três foram identificados com SCCmec tipo III, já o restante não foi possível identificar o tipo de SCCmec. Entre os doze isolados de *S. capitis* identificou-se 0,8% de SCCmec tipo I e 7% de SCCmec tipo III.

Paschoal e colaboradores (2008) caracterizaram a diversidade genética de 15 amostras de MRSA detectados pelo Projeto SCOPE Brasil. Oito

amostras apresentaram SCC*mec* tipo II, três amostras com SCC*mec* tipo IVa e quatro amostras com SCC*mec* tipo III.

A hipótese de transferência do SCC*mec* entre *S. epidermidis* e *S. aureus* é fundamentada por várias evidências. Hanssen e colaboradores (2004) encontraram MRSA geneticamente únicos contendo variantes dos genes de *ccrAB* idênticos aos encontrados nos SCoN meticilina resistentes, mas diferentes dos MRSA isolados em outras regiões. Parece não haver dúvida de que o *S. aureus* e os SCoN tem o mesmo *pool* de genes contendo genes de resistência e recombinases, mas ainda é necessário definir os mecanismos e rotas de transferência da resistência entre os *Staphylococcus* spp. (HANSSEN *et al.*, 2004).

Os SCoN são reservatório de genes de resistência e provavelmente são capazes de transmitir genes para os *S. aureus*. A semelhança dos SCC*mec* entre os *S. aureus* e os SCoN sugere a transmissão horizontal entre as espécies de estafilococos. Além disto, o extensivo rearranjo observado nos complexos *ccr* e *mec* indicam uma troca frequente de material genético (HANSSEN *et al.*, 2006).

O SCC*mec* tipo IV foi identificado em *S. epidermidis* na década de 70 e somente cerca de dez anos depois foi descrito nos *S. aureus*. Estudos recentes em relação ao SCC*mec* tipo IV demonstraram que os SCoN são reservatórios de resistência e que a transmissão ocorreu dos SCoN para os *S. aureus* (WISPLINGHOFF *et al.*, 2003). Isolados identificados com SCC*mec* tipo IV são comumente relacionados a amostras provenientes da comunidade (Fey *et al.*, 2003). Apesar de o clone pediátrico possuir SCC*mec* tipo IV, é uma

exceção à regra, pois foi descrito primeiramente como uma linhagem hospitalar em Portugal (Sa-Leão *et al.*, 1999).

Estudo realizado por Inoue (2008) demonstrou que a maioria das bacteremias por MRSA continham SCC*mec* tipo III e eram relacionadas ao Clone Epidêmico Brasileiro (CEB) demonstrando ainda ser predominante no hospital estudado apesar da emergência de novas linhagens. Já as amostras que continham SCC*mec* tipo IV foram relacionadas ao clone pediátrico e aos clones USA300 e USA400.

O aspecto mais relevante é que o SCC*mec* tipo III codifica uma grande número de genes de resistência e esta informação é epidemiologicamente importante para o controle de infecção institucional. Tradicionalmente, os SCoN eram reconhecidos como bactérias de pouca importância clínica. Entretanto, com o conhecimento que se tem atualmente, sabe-se que eles podem ser o fator determinante que coordena a geração de novas cepas de MRSA.

Outros testes moleculares poderão ser úteis na melhor caracterização das amostras deste estudo incluindo as amostras *mecA* positivas em que não foram identificadas algum tipo de SCC*mec*. O encontro de uma amostra resistente à linezolida justifica uma vigilância de resistência a este antimicrobiano no nosso meio.

7 - CONCLUSÕES

- A espécie mais isolada de acordo com a metodologia automatizada foi *Staphylococcus epidermidis* seguido por *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus capitis* e *Staphylococcus auricularis*.
- O método de disco difusão para oxacilina e cefoxitina utilizado como triagem para isolados resistentes à oxacilina não detectou discrepâncias entre os resultados e os valores de suscetibilidade foram iguais para ambos.
- A resistência geral encontrada para a oxacilina pelo método de disco difusão e pelo sistema automatizado Vitek[®] foi concordante. Todos os isolados apresentaram suscetibilidade à vancomicina. Isolados de *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. warneri* e *S. simulans* apresentaram resistência intermediária à teicoplanina. Um isolado de *S. epidermidis* apresentou-se resistente à linezolida.
- O SCCmec predominante foi o tipo III seguido do SCCmec tipo IV, semelhante ao relatado para *Staphylococcus aureus* sugerindo transmissão horizontal entre as espécies.

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agvald-Öhman C.; Lund B.; Edlund C. Multiresistant coagulase-negative staphylococci disseminate frequently between intubated patients in a multidisciplinary intensive care unit. *Crit Care*. 2004; 8(1):R42-7.

Antunes ALS, Secchi C, Reiter KC, Perez LRR, de Freitas ALP, d'Azevedo PA. Feasible identification of *Staphylococcus epidermidis* using desferrioxamine and fosfomicin disks. *APMIS*. 2008;116:16–20.

Archer LG. *Staphylococcus epidermidis* and other coagulase-negative staphylococci. In: Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE, Dolin R editors. *Principles and practice of infectious diseases*. 5th ed. New York: Churchill Livingstone. 2000. p. 2092-100.

BANNERMAN, TL. *Staphylococcus, Micrococcus* and other catalase-positive cocci that grow aerobically. In: Murray PR, Jorgensen EJ, Tenover FC, Tenover MC, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. ASM, Washington. 2003.

Berger-Bächli B, Rohrer S. Factors influencing methicillin resistance in staphylococci. *Arch Microbiol*. 2002; 178(3): 165-71.

Birmingham MC, Rayner CR, Meagher AK, Flavin SM, Batts DH, Schentag JJ. Linezolid for the treatment of multidrug-resistant, gram-positive infections: experience from a compassionate-use program. *Clin Infect Dis*. 2003; 36(2):159-68.

Boyle-Vavra S, Ereshefsky B, Wang CC, Daum RS. 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. 2005; 43(9):4719-30.

Brown DFJ. Detection of methicillin/oxacillin resistance in staphylococci. Journal Antimicrobial Chemotherapy. 2001; v.48, p.65-70.

Cafiso V, Bertuccio T, Santagati M, Campanile F, Amicosante G, Perilli MG, Selan L, Artini M, Nicoletti G, Stefani S. Presence of the *ica* operon in clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* and its role in biofilm production. Clin Microbiol Infect. 2004; 10(12):1081-8.

Caierão J, Superti S, Dias CA, d'Azevedo PA. Automated systems in the identification and determination of methicillin resistance among coagulase negative staphylococci. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2006; 101(3):277-80.

Caierão J, Musskopf M, Superti S, Roesch E, Dias CG, d'Azevedo PA. Evaluation of phenotypic methods for methicillin resistance characterization in coagulase-negative staphylococci (CNS). J Med Microbiol. 2004; 53(Pt 12):1195-9.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Interim guidelines for prevention and control of Staphylococcal infection associated with reduced

susceptibility to vancomycin. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 1997; 46(27):626-8, 635.

Cercenado E, García-Leoni ME, Díaz MD, Sánchez-Carrillo C, Catalán P, De Quirós JC, Bouza E. Emergence of teicoplanin-resistant coagulase negative staphylococci. J Clin Microbiol. 1996; 34: 1765–8.

Chambers HF. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. Clin Microbiol Rev. 1997; 10(4): 781–791.

Chang S, Sievert DM, Hageman JC, Boulton ML, Tenover FC, Downes FP, Shah S, Rudrik JT, Pupp GR, Brown WJ, Cardo D, Fridkin SK. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the *vanA* resistance gene. N Engl J Med. 2003; 348(14):1342-7.

Chongtrakool P, Ito T, Ma XX, Kondo Y, Trakulsomboon S, Tiensasitorn C, Jamklang M, Chavalit T, Song JH, Hiramatsu K. 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. 2006; 50(3): 1001–1012.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth Informational Supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Approved Standard M100-S18. (2008).

Cuevas O, Cercenado E, Vindel A, Guinea J, Sánchez-Conde M, Sánchez-Somolinos M, Bouza E. Evolution of the antimicrobial resistance of *Staphylococcus* spp. in Spain: five nationwide prevalence studies, 1986 to 2002. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48(11):4240-5.

Cunha Mde L, Sinzato YK, Silveira LV. Comparison of methods for the identification of coagulase-negative staphylococci. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2004; 99(8):855-60.

Del'Alamo L, Cerada RF, Tosin I, Miranda EA, Sader HS. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci and characterization of isolates with reduced susceptibility to glycopeptides. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1999; 34(3):185-91.

De Giusti M, Pacifico L, Tufi D, Panero A, Boccia A, Chiesa C. Phenotypic detection of nosocomial *mecA*-positive coagulase-negative staphylococci from neonates. *J Antimicrob Chemother.* 1999; 44(3):351-8.

De Paulis AN, Predari SC, Chazarreta CD, Santoianni JE. Five-test simple scheme for species-level identification of clinically significant coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol.* 2003; 41(3):1219-24.

Diekema DJ, Pfaller MA, Schmitz FJ et al. 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.* 2001; 32 (suppl 2): S114–S132.

Diekema DJ, Jones RN. Oxazolidinone antibiotics. *Lancet.* 2001; 358(9297):1975-82.

Dickinson TM, Archer GL. Phenotypic expression of oxacillin resistance in *Staphylococcus epidermidis*: roles of *mecA* transcriptional regulation and resistant-subpopulation selection. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44 (6):1616–23.

Draghi DC, Sheehan DJ, Hogan P, Sahm DF. In vitro activity of linezolid against key gram-positive organisms isolated in the united states: results of the LEADER 2004 surveillance program. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49(12):5024-32.

Feinstein AR, Cicchetti DV. High agreement but low kappa: I. The problems of two paradoxes. *J Clin Epidemiol.* 1990; 43(6):543-9.

Felten A, Grandry B, Lagrange PH, Casin I. Evaluation of three techniques for detection of low-level methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a disk diffusion method with cefoxitin and moxalactam, the Vitek 2 system, and the MRSA-screen latex agglutination test. *J Clin Microbiol.* 2002; 40(8):2766-71.

Ferreira RB, Nunes AP, Kokis VM, Krepsky N, Fonseca Lde S, Bastos Mdo C, Giambiagi-deMarval M, Santos KR. Simultaneous detection of the *mecA* and *ileS-2* genes in coagulase-negative staphylococci isolated from Brazilian hospitals by multiplex PCR. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2002; 42(3):205-12.

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

Frigatto EA, Machado AM, Pignatari AC, Gales AC. Is the cefoxitin disk test reliable enough to detect oxacillin resistance in coagulase-negative staphylococci? *J Clin Microbiol.* 2005; 43(4):2028-9.

Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, Horan TC, Hughes JM. CDC definitions for nosocomial infections. In: Olmsted RN, editor. *APIC infection control and*

applied epidemiology: principles and practice. St. Louis: Mosby. 1996; p. A1-A20.

Giesbrecht P, Kersten T, Maidhof H, Wecke J. Staphylococcal cell wall: morphogenesis and fatal variations in the presence of penicillin. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998; 62(4):1371-414.

Gram-Positive Identification (GPI); Test Kit. Hazelwood: BioMérieux Vitek; 1997. (Technical Bulletin 007171-12 Rev. 0498).

Gustafson JE, Berger-Bächli B, Strässle A, Wilkinson BJ. Autolysis of methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1992; 36(3):566-72.

Hackbarth CJ, Chambers HF. Methicillin-resistant staphylococci: detection methods and treatment of infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 1989; 33(7):995-9.

Hanssen AM, Kjeldsen G, Sollid JU. Local variants of staphylococcal cassette chromosome *mec* in sporadic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci: evidence of horizontal gene transfer? *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48(1):285-96.

Hanssen AM, Ericson Sollid JU. SCC*mec* in staphylococci: genes on the move. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2006; 46(1):8-20.

Heikens E, Fleer A, Paauw A, Florijn A, Fluit AC. Comparison of genotypic and phenotypic methods for species-level identification of clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(5):2286-90.

Henze U, Sidow T, Wecke J, Labischinski H, Berger-Bächi B. Influence of *femB* on methicillin resistance and peptidoglycan metabolism in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 1993; 175(6):1612-20.

Higuchi W, Takano T, Teng LJ, Yamamoto T. Structure and specific detection of staphylococcal cassette chromosome *mec* type VII. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008; 19;377(3):752-6.

Hiramatsu K, Watanabe S, Takeuchi F, Ito T, Baba T. Genetic characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Vaccine.* 2004; 6;22 Suppl 1:S5-8.

Hisata K, Kuwahara-Arai K, Yamanoto M, Ito T, Nakatomi Y, Cui L, Baba T, Terasawa M, Sotozono C, Kinoshita S, Yamashiro Y, Hiramatsu K. Dissemination of methicillin-resistant staphylococci among healthy Japanese children. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(7):3364-72.

Höltje JV. The alternative to penicillins. *Nat Med.* 2001; 7(10):1100-1.

Huebner J, Goldmann DA. Coagulase-negative staphylococci: role as pathogens. *Annu Rev Med.* 1999; 50:223-36.

Hussain Z, Stoakes L, John MA, Garrow S, Fitzgerald V. Detection of methicillin resistance in primary blood culture isolates of coagulase-negative staphylococci by PCR, slide agglutination, disk diffusion, and a commercial method. *J Clin Microbiol.* 2002; 40(6):2251-3.

Illustrations of SCC mec elements. Disponível em <http://www.staphylococcus.net/> Acesso em: 22 jan. 2009.

Inoue FM. Infecções da corrente sanguínea por *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina no Hospital São Paulo (2002-2005): fatores de risco e diversidade genética. Tese de Mestrado. UNIFESP. 2008; 79p.

Ito T, Hiramatsu K. Acquisition of methicillin resistance and progression of multiantibiotic resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Yonsei Med J.* 1998; 39(6):526-33.

Ito T, Katayama Y, Hiramatsu K. Cloning and nucleotide sequence determination of the entire *mec* DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; 43(6):1449-58.

Ito T, Katayama Y, Asada K, Mori N, Tsutsumimoto K, Tiensasitorn C, Hiramatsu K. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45(5):1323-36.

Ito T, Okuma K, Ma XX, Yuzawa H, Hiramatsu K. Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. *Drug Resist Updat*. 2003; 6(1):41-52.

Ito T, Ma XX, Takeuchi F, Okuma K, Yuzawa H, Hiramatsu K. Novel type V staphylococcal cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccrC*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004; 48(7):2637-51.

Jones RN, Fritsche TR, Sader HS, Ross JE. LEADER surveillance program results for 2006: an activity and spectrum analysis of linezolid using clinical isolates from the United States (50 medical centers). *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2007; 59(3):309-17.

Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000; 44(6):1549-55.

Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. Genetic organization of the chromosome region surrounding *mecA* in clinical staphylococcal strains: role of *IS431*-mediated *mecI* deletion in expression of resistance in *mecA*-carrying, low-level methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001; 45(7):1955-63.

Katayama Y, Takeuchi F, Ito T, Ma XX, Ui-Mizutani Y, Kobayashi I, Hiramatsu K. Identification in methicillin-susceptible *Staphylococcus hominis* of an active primordial mobile genetic element for the staphylococcal cassette chromosome *mec* of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol. 2003;185(9):2711-22.

Kloos WE, Bannerman TL. Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. Clin Microbiol Rev. 1994; 7(1):117-40.

Kollef MH, Rello J, Cammarata SK, Croos-Dabrera RV, Wunderink RG. Clinical cure and survival in Gram-positive ventilator-associated pneumonia: retrospective analysis of two double-blind studies comparing linezolid with vancomycin. Intensive Care Med. 2004; 30(3):388-94.

Kondo Y, Ito T, Ma XX, Watanabe S, Kreiswirth BN, Etienne J, Hiramatsu K. Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome *mec* type assignment: rapid identification system for *mec*, *ccr*, and major differences in junkyard regions. Antimicrob Agents Chemother. 2007; 51(1):264-74.

Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn Jr WC. Cocos Gram-Positivos: Estafilococos e microrganismos relacionados. In: Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn Jr WC. Diagnóstico Microbiológico. Texto e atlas colorido. 5. ed. Rio de Janeiro: Medsi. 2001; p. 551-88.

Largura A, Passadore L.F, Rodrigues AC, Sousa MG, Saladino RS, Carbone PH, Marassi A, Sannazzaro CAC, Hirata MH. Análise crítica da pseudosepticemia e falso negativo: valor diagnóstico das hemoculturas. In: XXXI Congresso Brasileiro de Análises Clínicas, 2004, Salvador. Revista Brasileira de Análises Clínicas. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Análises Clínicas. 2004; v. 36.

Layer F, Ghebremedhin B, Moder KA, König W, König B. Comparative study using various methods for identification of *Staphylococcus species* in clinical specimens. J Clin Microbiol. 2006; 44(8):2824-30.

Livermore DM. Antibiotic resistance in staphylococci. Int J Antimicrob Agents. 2000; 16 Suppl 1:S3-10.

Livermore DM. Linezolid in vitro: mechanism and antibacterial spectrum. J Antimicrob Chemother. 2003; 51 Suppl 2:ii9-16.

Lobo RD, Levin AS, Gomes LM, Cursino R, Park M, Figueiredo VB, Taniguchi L, Polido CG, Costa SF. Impact of an educational program and policy changes on decreasing catheter-associated bloodstream infections in a medical intensive care unit in Brazil. Eur J Endocrinol. 2005; 152(3):389-94.

Ma XX, Ito T, Tiensasitorn C, Jamklang M, Chongtrakool P, Boyle-Vavra S, Daum RS, Hiramatsu K. Novel type of staphylococcal cassette chromosome

mec identified in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. Antimicrob Agents Chemother. 2002r; 46(4):1147-52.

Mack D, Sabottke A, Dobinsky S, Rohde H, Horstkotte MA, Knobloch JK. Differential expression of methicillin resistance by different biofilm-negative *Staphylococcus epidermidis* transposon mutant classes. Antimicrob Agents Chemother. 2002; 46(1):178-83.

Marshall SA, Wilke WW, Pfaller MA, Jones RN. *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci from blood stream infections: frequency of occurrence, antimicrobial susceptibility, and molecular (*mecA*) characterization in the SCOPE program. Diagn Microbiol Infect Dis. 1998; 30(3):205-14.

Marshall, SH, Donskey, CJ, Hutton-Thomas, R, Salata, RA, Rice, LB. Gene Dosage and Linezolid Resistance in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. Antimicrob. Agents Chemother. 2002; 46(10):3334-3336.

Martineau F, Picard FJ, Lansac N, Ménard C, Roy PH, Ouellette M, Bergeron MG. Correlation between the resistance genotype determined by multiplex PCR assays and the antibiotic susceptibility patterns of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. Antimicrob Agents Chemother. 2000; 44(2):231-8.

Michelin L, Lahude M, Araújo PR, Giovanaz DSH, Müller G, Delamare APL, Da Costa SOP, Echeverrigaray S. Pathogenicity factors and antimicrobial resistance of *Staphylococcus epidermidis* associated with nosocomial infections

occurring in intensive care units. Brazilian Journal of Microbiology. 2005; 36:17-23.

Miura E. Coagulase-negative *staphylococcus* infection in newborns: myth or reality? J Pediatr (Rio J). 2002; 78(4):255-6.

Moellering RC. Linezolid: the first oxazolidinone antimicrobial. Ann Intern Med. 2003; 21;138(2):135-42.

Mulder JG. A simple and inexpensive method for the identification of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus hominis*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1995; 14(12):1052-6.

Mylona E, Fanourgiakis P, Vryonis E, Golfinopoulou S, Skoutelis A, Platsouka E, Chatzis N. Linezolid-based therapy in *Staphylococcus epidermidis* endocarditis. Int J Antimicrob Agents. 2007; 29(5):597-8.

Nunes APF, Teixeira LM, Bastos CCR, Fonseca LS, Santos KRN. Susceptibility of Brazilian staphylococcal strains to glycopeptides evaluated by different testing methods. Curr Microbiol. 2002; 44(6):385-90.

O'Brien FG, Coombs GW, Pearson JC, Christiansen KJ, Grubb WB. Type V staphylococcal cassette chromosome *mec* in community staphylococci from Australia. Antimicrob Agents Chemother. 2005; 49(12):5129-32.

Okuma K, Iwakawa K, Turnidge JD, Grubb WB, Bell JM, O'Brien FG, Coombs GW, Pearman JW, Tenover FC, Kapi M, Tiensasitorn C, Ito T, Hiramatsu K. Dissemination of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in the community. J Clin Microbiol. 2002; 40(11):4289-94.

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

Oliveira DC, Milheiriço C, de Lencastre H. Redefining a structural variant of staphylococcal cassette chromosome *mec*, SCC*mec* type VI. Antimicrob Agents Chemother. 2006; 50(10):3457-9.

Palazzo IC, d'Azevedo PA, Secchi C, Pignatari AC, Darini AL. *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus* strains causing nosocomial bloodstream infection in Brazil. J Antimicrob Chemother. 2008; 62(6):1222-6.

Paschoal L, Carmo-Rodrigues MS, Inoue FM, Andrade SS, Marra A, Pignatari ACC. *Staphylococcus aureus* SCC*mec* diversity in São Paulo (Brazil): Results from the Brazillian SCOPE Surveillance Program. In: ICAAC, 2008, Washington. 48th ICAAC. v.1.

Petersson AC, Kamme C, Miörner H. Disk with high oxacillin content discriminates between methicillin-resistant and borderline methicillin-susceptible

Staphylococcus aureus strains in disk diffusion assays using a low salt concentration. J Clin Microbiol. 1999; 37(6):2047-50.

Petinaki E, Dimitracopoulos G, Spiliopoulou I. Decreased affinity of PBP3 to methicillin in a clinical isolate of *Staphylococcus epidermidis* with borderline resistance to methicillin and free of the *mecA* gene. Microb Drug Resist. 2001; 7(3):297-300.

Picazo JJ, Betriu C, Rodríguez-Avial I, Culebras E, Gómez M, López F; Grupo VIRA. [Antimicrobial resistance surveillance: VIRA STUDY 2006]. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2006; 24(10):617-28. Spanish.

Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, Kugler K. Bacterial pathogens isolated from patients with bloodstream infection: frequencies of occurrence and antimicrobial susceptibility patterns from the SENTRY antimicrobial surveillance program (United States and Canada, 1997). Antimicrob Agents Chemother. 1998; 42(7):1762-70.

Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, Sader HS, Kugler KC, Beach ML. Survey of blood stream infections attributable to gram-positive cocci: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in 1997 in the United States, Canada, and Latin America from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. SENTRY Participants Group. Diagn Microbiol Infect Dis. 1999; 33(4):283-97.

Prystowsky J, Siddiqui F, Chosay J, Shinabarger DL, Millichap J, Peterson LR, Noskin GA. Resistance to linezolid: characterization of mutations in rRNA and comparison of their occurrences in vancomycin-resistant enterococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001; 45: 2154-2156.

Raimundo O, Heussler H, Bruhn JB, Suntrarachun S, Kelly N, Deighton MA, Garland SM. Molecular epidemiology of coagulase-negative staphylococcal bacteremia in a newborn intensive care unit. *J Hosp Infect.* 2002; 51(1):33-42.

Ribeiro A, Dias C, Silva-Carvalho MC, Berquó L, Ferreira FA, Santos RN, Ferreira-Carvalho BT, Figueiredo AM. First report of infection with communityacquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in South America. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(4):1985-8.

Robinson DA, Enright MC. Evolutionary models of the emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47(12):3926-34.

Sader HS, Sampaio JL, Zoccoli C, Jones RN. Results of the 1997 SENTRY Antimicrobial Surveillance Program in Three Brazilian Medical Centers. *Braz J Infect Dis.* 1999; 3(2):63-79.

Rubinstein E, Cammarata S, Oliphant T, Wunderink R; Linezolid Nosocomial Pneumonia Study Group. Linezolid (PNU-100766) versus vancomycin in the

treatment of hospitalized patients with nosocomial pneumonia: a randomized, double-blind, multicenter study. *Clin Infect Dis.* 2001; 32(3):402-12.

Sader HS, Gales AC, Pfaller MA, Mendes RE, Zoccoli C, Barth A, Jones RN. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Braz J Infect Dis.* 2001; 5(4):200-14.

Sader HS, Jones RN, Gales AC, Silva JB, Pignatari AC; SENTRY Participants Group (Latin America). SENTRY antimicrobial surveillance program report: Latin American and Brazilian results for 1997 through 2001. *Braz J Infect Dis.* 2004; 8(1):25-79.

Sakai H, Procop GW, Kobayashi N, Togawa D, Wilson DA, Borden L, Krebs V, Bauer TW. Simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and coagulase negative staphylococci in positive blood cultures by real-time PCR with two fluorescence resonance energy transfer probe sets. *J Clin Microbiol.* 2004; 42(12):5739-44.

Sa-Leao R, Santos S, I, Dias D, Peres I, Barros RM, De Lencastre H. 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.* 1999; 37:1913-1920.

Scheffers DJ, Pinho MG. Bacterial cell wall synthesis: new insights from localization studies. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2005; 69 (4): 585-607.

Schwalbe RS, Stapleton JT, Gilligan PH. Emergence of vancomycin resistance in coagulase-negative staphylococci. *N Engl J Med.* 1987; 316(15):927-31.

Shore A, Rossney AS, Keane CT, Enright MC, Coleman DC. Seven novel variants of the staphylococcal chromosomal cassette *mec* in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Ireland. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49(5):2070-83.

Sieradzki K, Wu SW, Tomasz A. Inactivation of the methicillin resistance gene *mecA* in vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microb Drug Resist.* 1999; 5(4):253-7.

Sieradzki K, Roberts RB, Serur D, Hargrave J, Tomasz A. Heterogeneously vancomycin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain causing recurrent peritonitis in a dialysis patient during vancomycin therapy. *J Clin Microbiol.* 1999; 37(1):39-44.

de Silva GD, Kantzanou M, Justice A, Massey RC, Wilkinson AR, Day NP, Peacock SJ. The *ica* operon and biofilm production in coagulase-negative staphylococci associated with carriage and disease in a neonatal intensive care unit. *J Clin Microbiol.* 2002; 40(2):382-8.

Skov R, Smyth R, Clausen M, Larsen AR, Frimodt-Møller N, Olsson-Liljequist B, Kahlmeter G. Evaluation of a cefoxitin 30 microg disc on Iso-Sensitest agar for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Antimicrob Chemother. 2003; 52(2):204-7.

Sloos JH, Dijkshoorn L, Vogel L, van Boven CP. Performance of phenotypic and genotypic methods to determine the clinical relevance of serial blood isolates of *Staphylococcus epidermidis* in patients with septicemia. J Clin Microbiol. 2000; 38(7):2488-93.

Stefani S, Varaldo PE. Epidemiology of methicillin-resistant staphylococci in Europe. Clin Microbiol Infect. 2003; 9: 1179–1186.

Stevens DL, Herr D, Lampiris H, Hunt JL, Batts DH, Hafkin B. Linezolid versus vancomycin for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. Clin Infect Dis. 2002; 34(11):1481-90.

Suzuki E, Kuwahara-Arai K, Richardson JF, Hiramatsu K. Distribution of *mec* regulator genes in methicillin-resistant *Staphylococcus* clinical strains. Antimicrob Agents Chemother. 1993; 37(6):1219-26.

Tabé Y, Nakamura A, Oguri T, Igari J. Molecular characterization of epidemic multiresistant *Staphylococcus haemolyticus* isolates. Diagn Microbiol Infect Dis. 1998; 32(3):177-83.

Takizawa Y, Taneike I, Nakagawa S, Oishi T, Nitahara Y, Iwakura N, Ozaki K, Takano M, Nakayama T, Yamamoto T. A Panton-Valentine leucocidin (PVL)-positive community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strain, another such strain carrying a multiple-drug resistance plasmid, and other more-typical PVL-negative MRSA strains found in Japan. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(7):3356-63.

Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1997; 18(6):426-39.

Tenover FC, Biddle JW, Lancaster MV. Increasing resistance to vancomycin and other glycopeptides in *Staphylococcus aureus*. *Emerg Infect Dis.* 2001; 7(2):327-32.

Thylefors JD, Harbarth S, Pittet D. Increasing bacteremia due to coagulase-negative staphylococci: fiction or reality? *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1998; 19(8):581-9.

Vaudaux PE, Monzillo V, Francois P, Lew DP, Foster TJ, Berger-Bächi B. Introduction of the *mec* element (methicillin resistance) into *Staphylococcus aureus* alters in vitro functional activities of fibrinogen and fibronectin adhesins. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998; 42(3):564-70.

Weigelt J, Itani K, Stevens D, Lau W, Dryden M, Knirsch C; Linezolid CSSTI Study Group. Linezolid versus vancomycin in treatment of complicated skin and soft tissue infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49(6):2260-6.

Weller, TM. The distribution of *mecA*, *mecR1* and *mecI* and sequence analysis of *mecI* and the *mec* promoter region in staphylococci expressing resistance to methicillin. *J Antimicrob Chemother.* 1999; 43(1):15-22.

Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis.* 2004; 39(3):309-17.

Witte W, Cuny C, Strommenger B, Bräulke C, Heuck D. Emergence of a new community acquired MRSA strain in Germany. *Euro Surveill.* 2004; 9(1):16 8.

York MK, Gibbs L, Chehab F, Brooks GF. Comparison of PCR detection of *mecA* with standard susceptibility testing methods to determine methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol.* 1996; 34(2):249-53.

Zhang K, McClure JA, Elsayed S, Louie T, Conly JM. Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of *staphylococcal cassette chromosome mec* types I to V in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 5026–5033.

Zhang K, McClure JA, Elsayed S, Conly JM. Novel Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Type, Tentatively Designated Type VIII, Harboring Class A *mec* and Type 4 *ccr* Gene Complexes in a Canadian Epidemic Strain of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*. 2009; 53(2):531-40.

Zanon U. Etiopatogenia das Complicações Infecciosas Hospitalares. In: Couto CC, Pedrosa TMG, Nogueira JM, editores. *Infecção Hospitalar e outras Complicações Não infecciosas da Doença. Epidemiologia, Controle e Tratamento*. 3. ed. Rio de Janeiro: Medsi. 2003; p. 9-36.

9 - RESUMO

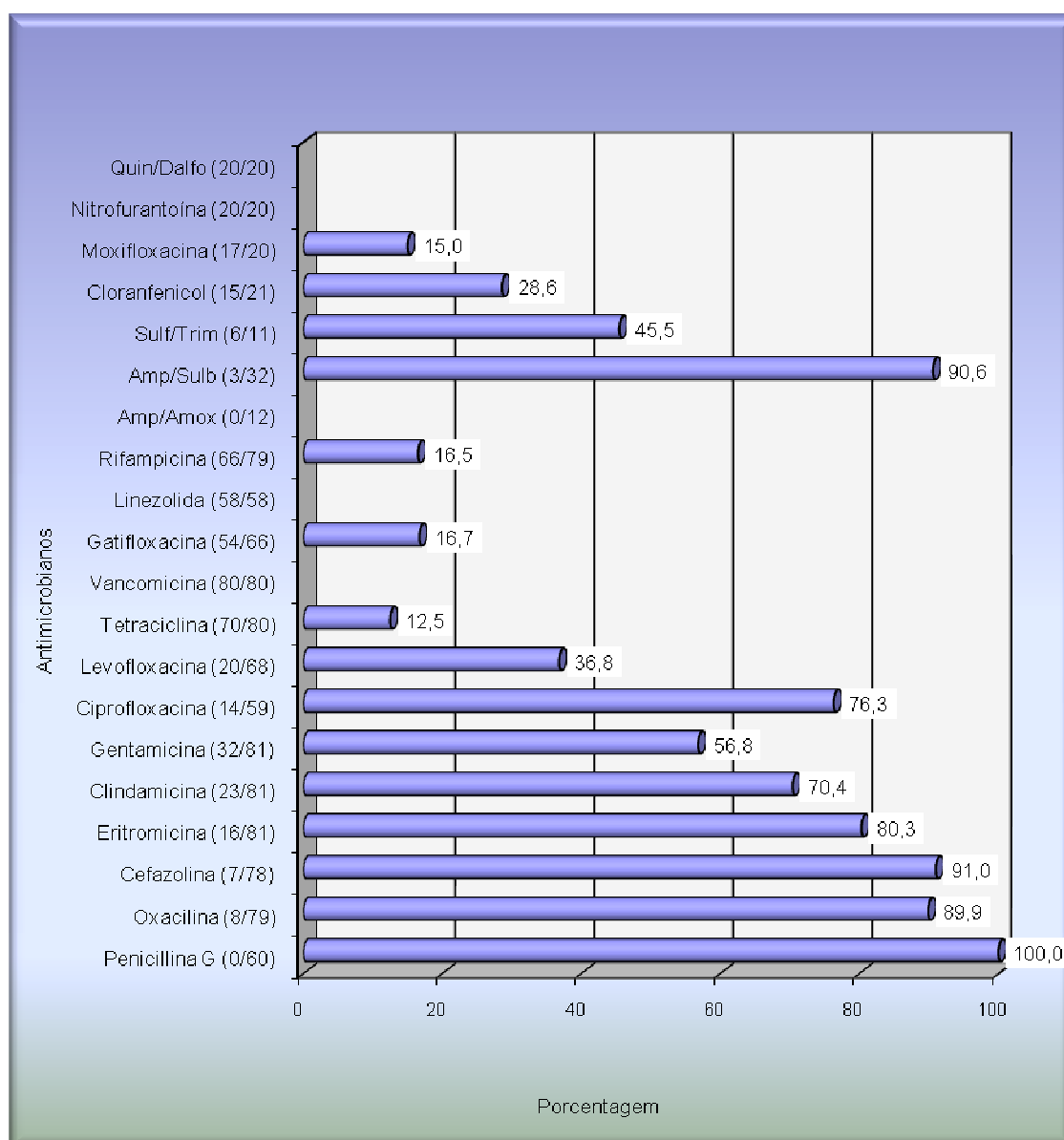
Staphylococcus coagulase negativo (SCoN) são importantes agentes etiológicos responsáveis por infecções relacionadas à assistência à saúde (IrAS) em infecções da corrente sanguínea. Em estudo retrospectivo foram avaliados SCoN isolados de pacientes com IrAS da corrente sanguínea em dois hospitais gerais da cidade de São Paulo no período de agosto de 2005 à agosto de 2007. Os isolados foram caracterizados a nível de espécies e testes de suscetibilidade aos antimicrobianos pelo Vitek[®] system e Vitek[®] 2. A presença do gene *mecA* e o tipo de SCC*mec* foram determinados por PCR multiplex. *Staphylococcus epidermidis* foi a espécie predominante seguido de *S. hominis*, *S. haemolyticus*, *S. simulans*, *S. warneri*, *S. capitis* e *S. auricularis*. Observou-se 88,2% de resistência à oxacilina nos isolados com 100% de concordância entre os discos de oxacilina e cefoxitina confirmados pelo gene *mecA*. Todos isolados foram suscetíveis à vancomicina e quatro isolados apresentaram resistência intermediária à teicoplanina pelo Etest[®]. Um *S. epidermidis* mostrou-se resistente à linezolida. O tipo de SCC*mec* predominante foi o tipo III seguido pelos tipos IV, I, II e V. Em 26,9% dos isolados *mecA* positivo não foram caracterizados nenhum tipo de SCC*mec* pelo protocolo utilizado.

10 – ABSTRACT

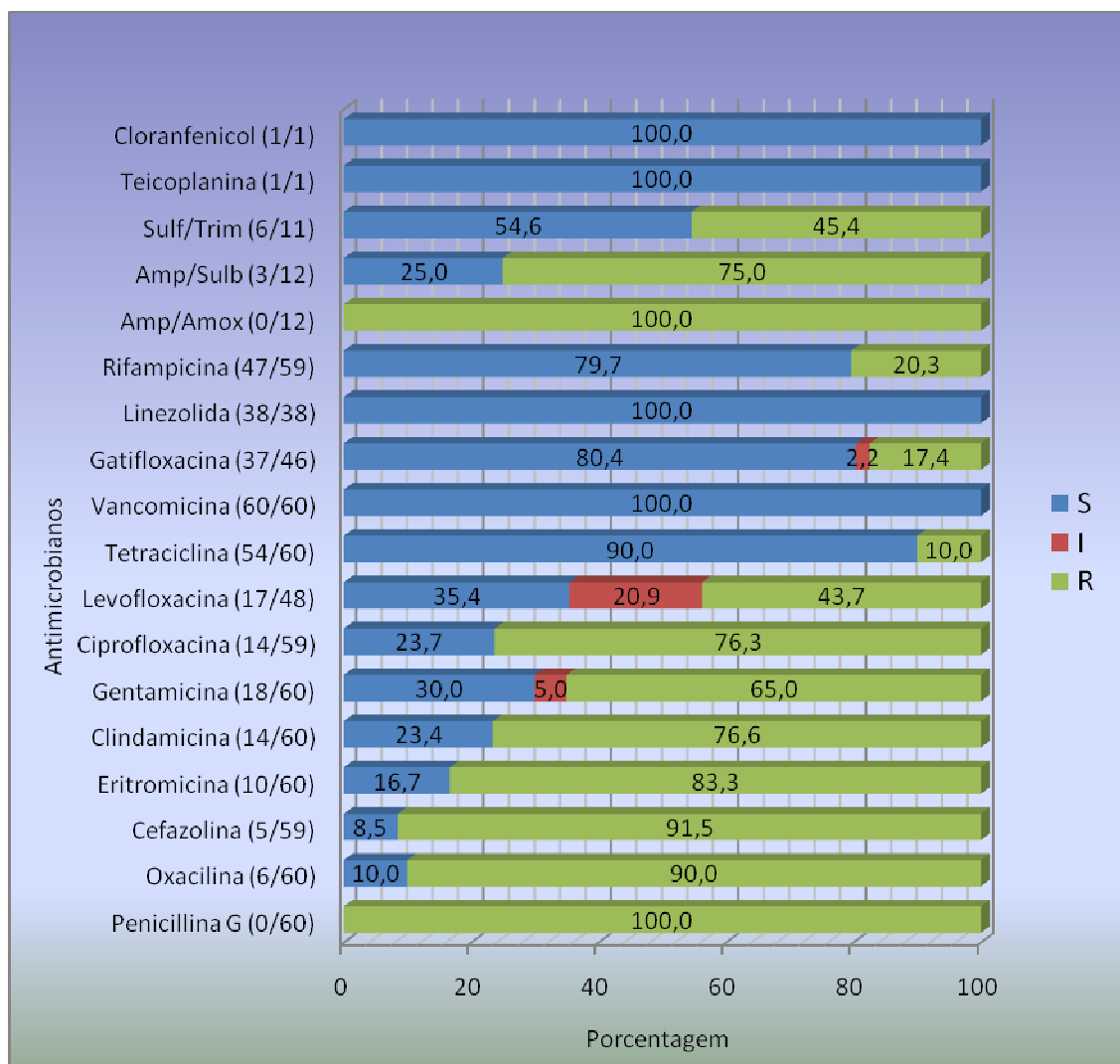
Coagulase negative staphylococci (CoNS) are important etiologic agents responsible for healthcare related infection (HCRI) in bloodstream infections. In a retrospective study we evaluate CoNS isolated from patients with HCRI in bloodstream infections admitted to two general hospitals at São Paulo city, from August 2005 to August 2007. The isolates were characterized at species level and antimicrobial susceptibility tested by the Vitek[®] system and ViteK[®] 2. Oxacillin resistance was evaluated by oxacillin and ceftioxin discs. The presence of *mecA* gene and the SCC*mec* type were determined by multiplex PCR. *Staphylococcus epidermidis* was the predominant specie followed by *S. hominis*, *S. haemolyticus*, *S. simulans*, *S. warneri*, *S. capitis* and *S. auricularis*. Oxacillin resistance was observed in 88.2% of the isolates with 100% concordance between oxacillin and ceftioxin discs confirmed by *mecA* gene. All isolates were susceptible to vancomycin and four isolates revealed intermediate resistance to teicoplanin by Etest[®]. One *S. epidermidis* showed resistance to linezolid. The predominant SCC type was the type III followed by the types IV, I, II and V. In 26.9% positive *mecA* isolates we did not characterize the SCC*mec* type by the molecular protocol utilized.

11 - ANEXO

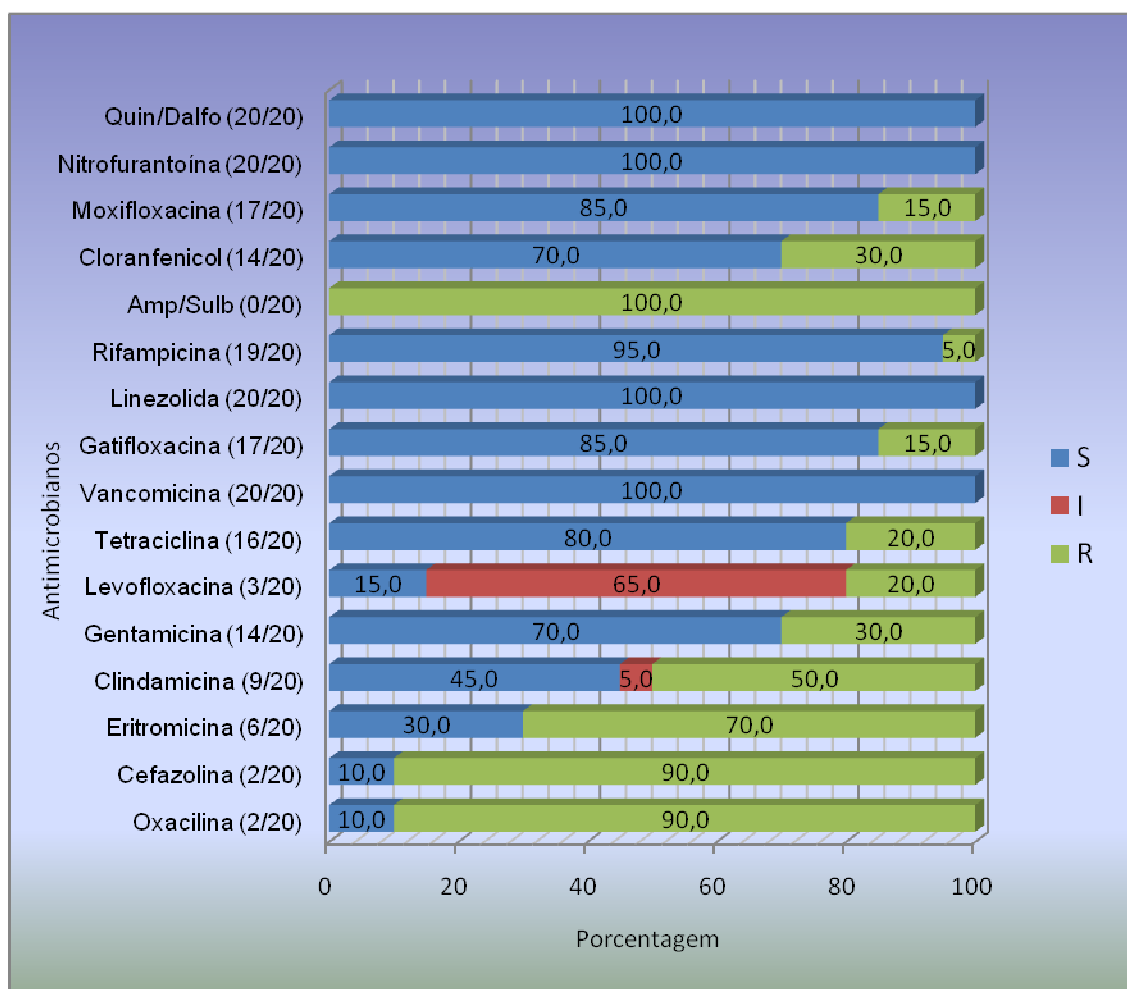
Anexo I - Perfil de suscetibilidade dos isolados de SCoN definidos pelo sistema automatizado, Vitek[®] system e Vitek[®] 2 - HIAE/HNJ – (n° amostras suscetíveis/n° amostras testadas)



Anexo II - Distribuição do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos testados no Vitek® system nos isolados de SCoN do HIAE (n° amostras suscetíveis/n° amostras testadas)



Anexo III - Distribuição do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos testados no Vitek® 2 nos isolados de SCoN do HNJ (n° amostras suscetíveis/n° amostras testadas)



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](#)