



Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Instituto de Microbiologia Paulo de Góes

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DA  
RESISTÊNCIA À ERITROMICINA E À CLINDAMICINA EM  
AMOSTRAS DE *Staphylococcus aureus* E *Staphylococcus epidermidis*  
APRESENTANDO DIFERENTES TIPOS DE SCC<sub>mec</sub>

Cristiane Roberta dos Santos Teodoro

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

Orientadora: Kátia Regina Netto dos Santos

Rio de Janeiro

Julho de 2010

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DA  
RESISTÊNCIA À ERITROMICINA E À CLINDAMICINA EM  
AMOSTRAS DE *Staphylococcus aureus* E *Staphylococcus epidermidis*  
APRESENTANDO DIFERENTES TIPOS DE SCC $mec$

Cristiane Roberta dos Santos Teodoro

Orientadora: Kátia Regina Netto dos Santos

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

Aprovada por:

---

Prof. Sérgio Eduardo Longo Fracalanza (Presidente), UFRJ

---

Prof. Simone Aranha Nouér (Membro), HUCFF, UFRJ

---

Prof. Marinella Silva Laport (Membro), UFRJ

---

Prof. Ana Paula Vieira Colombo (Revisora), UFRJ

Rio de Janeiro

Julho de 2010

## FICHA CATALOGRÁFICA

Teodoro, Cristiane Roberta dos Santos

Caracterização fenotípica e molecular da resistência à eritromicina e à clindamicina em amostras de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* apresentando diferentes tipos de SCCmec – Rio de Janeiro, UFRJ/IMPPG, 2010

X, 59f.:il.; 31 cm

Orientadora: Kátia Regina Netto dos Santos

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)

Universidade Federal do Rio de Janeiro / Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, 2010

Referências Bibliográficas: f 52-59.

1. *Staphylococcus aureus* 2. *Staphylococcus epidermidis* 3. Eritromicina 4. Clindamicina 5. Oxacilina 6. SCCmec 7. Resistência antimicrobiana. I. Santos, Kátia Regina Netto. II. UFRJ, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Mestrado em Ciências (Microbiologia). III. Caracterização fenotípica e molecular da resistência à eritromicina e à clindamicina em amostras de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* apresentando diferentes tipos de SCCmec

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Infecção Hospitalar, Departamento de Microbiologia Médica, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob a orientação da Prof. Kátia Regina Netto dos Santos.

Dedico este trabalho a todos os meus amigos,  
com imensa gratidão por toda força, amparo,  
compreensão e estímulo a mim direcionadas.

Obrigada!!!

## AGRADECIMENTOS

---

A Deus, Nosso Pai, pela vida e pelas oportunidades a mim confiadas.

A Jesus, o Verdadeiro Mestre, pelo exemplo de amor e trabalho que, em todos os momentos de minha vida, me serviram de inspiração e consolo.

Aos meus amigos espirituais que, nas diversas ocasiões em que pensei em desfalecer, me inspiravam uma nova força, uma imensa coragem e bom ânimo para o prosseguimento das tarefas.

À minha querida família, em especial à minha mamãe e meu irmão, por todo incentivo, compreensão e auxílio, sobretudo nos momentos mais delicados.

Ao meu pai, minha avó, minha irmã e à pequena Stéphany, pelos sorrisos que me proporcionaram ao longo de minha vida.

A todos os meus familiares, por toda torcida e interesse em ajudar.

Aos meus queridos amigos, os da primeira hora: Léo, André e Eliezer, e ao Claudio, amigo da última hora que, apesar do pouco tempo em que nos conhecemos, já me proporcionou diversos momentos de companheirismo e apoio.

À Professora Kátia, pelo belo exemplo de profissionalismo e dedicação; obrigada por me conceder diversas oportunidades de crescimento pessoal e profissional, como o CEBAC e o próprio Mestrado. Espero ter feito o melhor ao meu alcance a cada momento.

A todos os amigos do Laboratório de Infecção Hospitalar pelo convívio fraterno e por toda ajuda.

Ao Departamento de Microbiologia Médica, pelo carinhoso acolhimento ao longo desses quase 3 anos.

Ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, representado pela Diretora Prof. Agnes Sá Figueiredo e pela Coordenadora da Pós-Graduação Prof. Ana Paula Colombo.

À UFRJ, que me possibilitou a realização de diversos sonhos ao longo desses 10 anos, desde o estágio da Escola Técnica até o presente momento.

À FAPERJ, CNPq, PRONEX e FUJB, pelo suporte financeiro.

“Embora ninguém possa voltar atrás  
e fazer um novo começo, qualquer um  
pode começar agora e fazer um novo fim.”

Chico Xavier



**SUMÁRIO**

---

<b>RESUMO.....</b>	<b>ix</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....</b>	<b>xi</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>xii</b>
<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....</b>	<b>xiii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>18</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>19</b>
3.1. DESENHO DO ESTUDO.....	19
3.2. CEPAS BACTERIANAS.....	19
3.3. AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS.....	20
3.4. MÉTODOS MOLECULARES.....	22
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>30</b>
<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>44</b>
<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>51</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>52</b>

## RESUMO

### **Caracterização fenotípica e molecular da resistência à eritromicina e clindamicina em amostras de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* apresentando diferentes tipos de SCCmec**

Cristiane Roberta dos Santos Teodoro  
Orientadora: Kátia Regina Netto dos Santos

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

Os antimicrobianos macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas B (MLS<sub>B</sub>) são alternativas terapêuticas no tratamento de infecções por *Staphylococcus* spp. resistentes à oxacilina. Entretanto, um número crescente de amostras resistentes tem sido detectado, podendo haver resistência cruzada entre tais drogas. A resistência à eritromicina é codificada pelos genes *erm* (alteração na subunidade 50S ribossomal) e/ou pelo gene *msrA* (bomba de efluxo), enquanto a resistência à meticilina é codificada pelo gene *mecA*, que está inserido no cassete estafilocócico *mec* (SCCmec). O objetivo deste estudo foi avaliar fenotípica e genotipicamente a resistência à eritromicina e/ou clindamicina em 50 amostras de *Staphylococcus aureus* e 34 de *Staphylococcus epidermidis* isoladas de neonatos e não-neonatos, selecionadas por pulsotipos diferentes através de PFGE, e correlacionar com os tipos de cassetes *mec* (SCCmec). O teste de disco-difusão foi utilizado para determinar a resistência à meticilina e para a detecção de resistência induzida à clindamicina. A concentração mínima inibitória foi determinada para oxacilina, eritromicina e clindamicina. A técnica de PCR foi empregada para a detecção dos genes *ermA*, *ermB*, *ermC* e *msrA* e para a tipagem do SCCmec. Os genes *ermA* (62%) e *ermC* (54%) foram detectados em amostras de *S. aureus* que apresentaram altos níveis de resistência à eritromicina e à clindamicina (CMI<sub>90</sub> ≥ 256 µg/mL), e resistência constitutiva à clindamicina de 86% e induzida de 10%. Entre amostras MRSA o gene *ermA* foi associado aos tipos de SCCmec II (100%) e III (88,2%), enquanto as amostras tipo IV apresentaram o gene *ermC* (58,8%). Em amostras de *S. epidermidis*, houve prevalência do gene *ermC* (82,4%), com altos níveis de resistência à eritromicina e clindamicina (CMI<sub>90</sub> ≥ 256 µg/mL), seguido do gene *msrA* (17,6%). Entre amostras de MRSE, o gene *ermC* foi associado ao SCCmec do tipo IV (76,9%) e não tipáveis (83,3%), com 61,7% de resistência constitutiva à clindamicina e 23,5% de resistência induzida. Em neonatos, 75% das amostras de MRSA e as amostras de MRSE carreadoras do gene *msrA* apresentaram os mesmos perfis fenotípicos, com CMI<sub>90</sub> de 32 µg/mL para eritromicina e sensibilidade à clindamicina. Concluímos que entre amostras MRSA há uma estreita relação entre a presença do gene *ermA* e os SCCmec tipos II e III, características que têm sido relacionadas a altos níveis de resistência antimicrobiana e resistência constitutiva. Por outro lado, o gene *ermC* foi mais relacionado à espécie *S. epidermidis* e ao cassete tipo IV em ambas as espécies estudadas.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, eritromicina, clindamicina, oxacilina, SCCmec, resistência antimicrobiana.

Rio de Janeiro  
2010

## ABSTRACT

### **Phenotypic and molecular characterization of resistance to erythromycin and clindamycin in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* isolates presenting different types of SCCmec**

Cristiane Roberta dos Santos Teodoro  
Orientadora: Kátia Regina Netto dos Santos

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

Macrolide, lincosamides and streptogramin B (MLS<sub>B</sub>) antimicrobials are therapeutic alternatives to treat infections caused by methicillin resistant *Staphylococcus* spp. However, an increasing number of resistant isolates have been detected as well as cross-resistance between these drugs. The erythromycin resistance is encoded by *erm* genes (alteration in ribosomal 50S subunit) and/or by the *msrA* gene (efflux pump), while methicillin resistance is encoded by the *mecA* gene, which is inserted into the Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*). The aim of this study was to evaluate phenotypic and genotypic resistance to erythromycin and / or clindamycin in 50 isolates of *Staphylococcus aureus* and 34 of *Staphylococcus epidermidis* obtained from neonates and non-neonates, with different pulsotypes by PFGE, and to correlate with the types of cassettes *mec* (SCC*mec*). The disk diffusion test was used to determine resistance to methicillin and inducible resistance to clindamycin, while the minimum inhibitory concentration (MIC) was determined for oxacillin, erythromycin and clindamycin. The PCR was used to detect *ermA*, *ermB*, *ermC* and *msrA* genes and typing of SCC*mec*. The genes *ermA* (62%) and *ermC* (54%) were detected in *S. aureus* isolates that had high levels of resistance to erythromycin and clindamycin (MIC<sub>90</sub> ≥256µg/mL) and they were related with constitutive resistance to clindamycin. Among MRSA isolates the *ermA* gene was associated with SCC*mec* types II (100%) and III (88.2%), while type IV isolates presented mainly the gene *ermC* (58.8%). In *S. epidermidis* isolates, the high prevalence of *ermC* gene (82.4%) was associated with high levels of resistance to erythromycin and clindamycin (MIC<sub>90</sub> ≥256µg/mL), followed by the *msrA* gene (17.6%). Among MRSE isolates, the *ermC* gene was related to the SCC*mec* type IV (76.9%) and non typable (83.3%) strains. Constitutive and inducible resistances to clindamycin were seen for these isolates. In newborns, MRSA isolates and MRSE carrying *msrA* gene had similar phenotypic profiles that is CMI<sub>90</sub> of 32µg/mL for erythromycin, and clindamycin susceptibility. We conclude that among MRSA isolates there is a close relationship between the presence of *ermA* gene and the SCC*mec* types II and III, characteristics that have been associated to high levels of antimicrobial and constitutive resistance. On the other hand, the *ermC* gene was more related to the *S. epidermidis* species and to cassette type IV in both species studied.

**Keywords:** *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, erythromycin, clindamycin, oxacillin, SCC*mec*, antimicrobial resistance.

Rio de Janeiro  
2010

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

---

$\mu$ L: Microlitro

$\mu$ M: Micromolar

CA-MRSA: *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina de origem comunitária

*ccr*: Complexo cromossômico de recombinase

CDC: Centro de Prevenção de Controle de Doenças, Estados Unidos

CMI: Concentração Mínima Inibitória

$cMLS_B$ : Fenótipo de resistência constitutiva aos antibióticos  $MLS_B$

DNA: Ácido desoxirribonucleico

dNTPS: Desoxirribonucleotídeos trifosfatados

ES: EDTA-Sarcosil

ESP: EDTA-Sarcosil-Proteinase K

Fbe: Proteína ligadora de fibrinogênio

h: Hora (s)

$iMLS_B$ : Fenótipo de resistência à clindamicina induzida por eritromicina

IRAS: Infecções relacionadas à assistência à saúde

IS: Sequência de inserção

IS431: Elemento flanqueador do plasmídeo pT181

kb: Kilobases

M: Molar

*mecA*: Gene que codifica a proteína que confere resistência à meticilina

*mecI*: Gene que codifica a proteína repressora do gene *mecA*

*mecRI*: Sequência codificante da proteína regulatória do gene *mecA*

mL: Mililitro

$MLS_B$ : Macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas B

mm: Milímetro

mM: Milimolar

MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina

MRSE: *Staphylococcus epidermidis* resistente à meticilina

$MS_B$ : Fenótipo de resistência aos antibióticos macrolídeos e estreptograminas B

MSCRAMMS: Componentes da superfície microbiana que reconhecem moléculas da matriz extracelular

MSSA: *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina

MSSE: *Staphylococcus epidermidis* sensível à metilicina

°C: Graus centígrados

pb: Pares de bases

PBP: Proteína ligadora de penicilina

PCR: Reação em cadeia da polimerase

PFGE: Eletroforese de campo elétrico pulsado

PIA: Adesina intercelular polissacarídica

PM: Padrão de tamanho molecular

p/v: Peso por volume

pT181: Plasmídeo que confere resistência à tetraciclina

pUB110: Plasmídeo que confere resistência a aminoglicosídeos

PVL: Leucocidina de Panton-Valentine

RN: Recém-nascidos

s: Segundo (s)

SCC*mec*: Cassete cromossômico estafilocócico *mec*

SCN: *Staphylococcus* coagulase-negativos

SENTRY: Programa de Vigilância Epidemiológica

TBE: Tris-Borato-EDTA

TE: Tris-EDTA

Tn554: Transpóson responsável pela resistência a macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas B

UFC: Unidade Formadora de Colônias

UPGMA: “Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean”

UTI: Unidade de Terapia Intensiva

UTIN: Unidade de tratamento intensivo neonatal

v/v: Volume por volume

V: Volts

## LISTA DE TABELAS

---

<b>Tabela 1:</b> Características dos diferentes tipos de SCC <i>mec</i> já descritos.....	8
<b>Tabela 2:</b> Amostras clínicas de <i>S. aureus</i> e <i>S. epidermidis</i> obtidas entre 2004 e 2009 de diferentes hospitais do Rio de Janeiro utilizadas no presente estudo.....	19
<b>Tabela 3:</b> Amostras-controle utilizadas neste estudo.....	20
<b>Tabela 4:</b> Oligonucleotídeos utilizados e amplicons obtidos na PCR para tipagem do SCC <i>mec</i> em <i>S. aureus</i> segundo Oliveira e De Lencastre, 2002.....	24
<b>Tabela 5:</b> Oligonucleotídeos utilizados e amplicons obtidos na PCR para tipagem do SCC <i>mec</i> em <i>S. epidermidis</i> .....	25
<b>Tabela 6:</b> Tipos de SCC <i>mec</i> determinados pelas combinações entre os tipos de <i>ccr</i> e as classes <i>mec</i> .....	25
<b>Tabela 7:</b> Oligonucleotídeos utilizados e tamanhos dos amplicons obtidos nas PCRs para detecção de genes de resistência à eritromicina.....	27
<b>Tabela 8:</b> Distribuição de 39 amostras de MRSA isoladas de não-neonatos e neonatos de acordo com o sítio de isolamento e o tipo de SCC <i>mec</i> detectado.....	32
<b>Tabela 9:</b> Distribuição de 32 amostras de MRSE isoladas de não-neonatos e neonatos de acordo com o sítio de isolamento e o tipo de SCC <i>mec</i> detectado.....	32
<b>Tabela 10:</b> Distribuição de 13 amostras de <i>S. aureus</i> e <i>S. epidermidis</i> sensíveis à meticilina de acordo com o sítio de isolamento.....	33
<b>Tabela 11:</b> Perfis das 12 amostras de <i>S. epidermidis</i> resistentes à meticilina que foram não tipáveis pelos métodos utilizados.....	34

<b>Tabela 12:</b> CMI <sub>50</sub> e CMI <sub>90</sub> para oxacilina, eritromicina e clindamicina em 50 amostras de <i>S. aureus</i> sensíveis e resistentes à meticilina e sua relação com os tipos de SCCmec.....	36
<b>Tabela 13:</b> CMI <sub>50</sub> e CMI <sub>90</sub> para oxacilina, eritromicina e clindamicina em 34 amostras de <i>S. epidermidis</i> sensíveis e resistentes à meticilina e sua relação com os tipos de SCCmec.....	37
<b>Tabela 14:</b> Relação entre genes de resistência à eritromicina e tipos de SCCmec em 50 amostras de MRSA.....	38
<b>Tabela 15:</b> Relação entre genes de resistência à eritromicina e tipos de SCCmec em 34 amostras de <i>S. epidermidis</i> .....	39
<b>Tabela 16:</b> CMI <sub>50</sub> e CMI <sub>90</sub> para oxacilina, eritromicina e clindamicina em 50 amostras de <i>S. aureus</i> e 34 amostras de <i>S. epidermidis</i> sensíveis e resistentes à meticilina em relação aos genes de resistência à eritromicina.....	41
<b>Tabela 17:</b> Relação entre os fenótipos MS <sub>B</sub> / MLS <sub>B</sub> e genes de resistência à eritromicina em amostras de <i>S. aureus</i> .....	42
<b>Tabela 18:</b> Relação entre os fenótipos MS <sub>B</sub> / MLS <sub>B</sub> e genes de resistência à eritromicina entre amostras de <i>S. epidermidis</i> .....	43

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

---

- Figura 1:** Figura esquemática simplificada da estrutura dos tipos de cassete cromossômico *mec* (SCC*mec*) encontrados em amostras de *Staphylococcus aureus*..... 9
- Figura 2:** Conformações alternativas do RNAm do gene *ermC* induzível com estruturas secundárias na ausência ou presença de eritromicina.....15
- Figura 3:** Fluxograma da metodologia.....20
- Figura 4:** Imagem representativa de perfis de fragmentação genômica de 26 amostras de *S. aureus*.....30
- Figura 5:** Imagem representativa de perfis de fragmentação genômica de 18 amostras de *S. epidermidis*.....31
- Figura 6:** Eletroforese em gel de agarose das sequências gênicas que codificam os tipos de SCC*mec* em amostras clínicas de *S. aureus*.....33
- Figura 7:** Eletroforese em gel de agarose das sequências gênicas que codificam os tipos de SCC*mec* em amostras de *S. epidermidis*.....34
- Figura 8:** Eletroforese em gel de agarose dos genes de resistência à eritromicina em amostras representativas de *S. aureus* e *S. epidermidis*.....38
- Figura 9:** Resistência à clindamicina induzida por eritromicina (Teste D) observada em uma amostra clínica de *S. epidermidis*.....39



## 1 - INTRODUÇÃO

---

### 1.1. Infecções relacionadas à assistência à saúde – Aspectos Gerais e Epidemiológicos

As infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) são aquelas adquiridas pelos pacientes quando associadas à prestação de cuidados, onde quer que seja, independentemente do nível dos cuidados, se agudos, de reabilitação, ambulatoriais ou domiciliários (COSTA, SILVA & NORIEGA, 2007). De acordo com dados recentes do *Center for Diseases Control* (CDC, 2007), estima-se uma ocorrência anual de 1,7 milhão de casos de infecções bacterianas associadas à assistência à saúde, somente em hospitais americanos, ocasionando 99 mil mortes. Dentre essas infecções, 32% ocorrem no trato urinário, 22% em sítios cirúrgicos, 15% são decorrentes de pneumonias e 14% de sepse. Tais infecções têm como consequência maior tempo de hospitalização, aumentando custos e elevando as taxas de morbidade e mortalidade, sendo, portanto, um grave problema de saúde pública (EL FAR, MARINO & MEDEIROS, 2001).

A incidência de IRAS varia de acordo com o número de leitos hospitalares, a especialidade da clínica médica, o tempo de permanência hospitalar, tendências locais no uso de antimicrobianos e condições de higiene (BERGOGNE-BEREZIN, 1999). Contudo, idade avançada, presença de comorbidades, antibioticoterapia prévia, intervenções cirúrgicas e uso de procedimentos médicos invasivos estão entre os principais fatores de risco para aquisição de IRASs (PITTET, 1999). Estima-se que a incidência mundial dessas infecções seja cerca de 4 a 9 casos em cada 100 admissões, sendo cerca de 20 a 25% das infecções adquiridas em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) (LLANOS-MÉNDEZ *et al.*, 2004). As taxas de infecção nessas unidades chegam a ser três vezes maiores do que em outros setores hospitalares (WEINSTEIN, 1998). Em relação ao número de mortes por IRAS, estas podem chegar a 80.000 casos por ano nos Estados Unidos, sendo que mais de 20% destas ocorrem em UTIs (SMITH, SAWYER & PRUETT, 2003).

O avanço tecnológico em termos de cuidados médicos contribuiu para uma maior sobrevivência de recém-nascidos (RN) prematuros, mas também representou a inclusão de fatores de risco como o uso de procedimentos invasivos, facilitando ainda mais a aquisição de IRAS por estes pacientes. Em particular, o baixo peso, assim como o imunocomprometimento e os baixos níveis de anticorpos transplacentários no RN

contribuem de forma determinante para o agravamento do quadro (PESSOA-SILVA *et al.*, 2001; KILBRIDE *et al.*, 2003; ZINGG, POSFAY-BARBE & PITTET, 2008). As IRASs são responsáveis por taxas significativas de morbidade e mortalidade em Unidades de Tratamento Intensivo Neonatais (UTINs), resultando em hospitalização prolongada dos RNs (WEI *et al.*, 2005). A Organização Mundial de Saúde estima que a taxa de IRAS em UTINs varie de 5,9% a 32% (BANG *et al.*, 2005). No Brasil, as taxas de IRAS em UTINs têm variado de 34% (COUTO *et al.*, 2007; TÁVORA *et al.*, 2008) a 50,7% (NAGATA, BRITO & MATSUO, 2002).

Um estudo envolvendo seis países da América Latina, incluindo o Brasil, entre os anos de 1997 e 2001, mostrou que a espécie *Staphylococcus aureus* foi aquela com maior prevalência em IRASs, especialmente em bacteriemias, sendo responsável por 21% destes quadros. Os *Staphylococcus* coagulase-negativos (SCN) ocuparam o terceiro lugar, sendo responsáveis por 13% dessas bacteriemias (SADER *et al.*, 2004). Zhanel e colaboradores (2008) também observaram que os *Staphylococcus* spp. foram importantes agentes etiológicos que acometeram pacientes em UTIs de 19 centros médicos canadenses no período de 2005 e 2006, tendo sido este microrganismo prevalente em 34,3% das hemoculturas.

O grupo SENTRY, no período entre 1997 e 2000, avaliou a frequência de patógenos em 25.745 hemoculturas coletadas em centros médicos da América do Norte. Os autores observaram que *S. aureus*, *Escherichia coli* e SCN foram as bactérias mais comuns, sendo responsáveis por 55% das bacteriemias. Além disso, os SCN foram os microrganismos mais isolados em crianças com menos de um ano de idade (DIEKEMA, *et al.*, 2001).

## **1.2. O gênero *Staphylococcus* spp.**

Os *Staphylococcus* são cocos Gram-positivos com 0,5 a 1,5  $\mu\text{m}$  de diâmetro e baixo conteúdo C+G em seu genoma. Apresentam-se isolados ou aos pares, em pequenas cadeias de três a quatro células ou em cachos; são imóveis, resistentes à bacitracina e capazes de crescer em meio contendo até 10% de cloreto de sódio e em temperatura entre 30 e 37°C (BANNERMAN & PEACOCK, 2007). Pertencente à família *Staphylococcaceae*, o gênero *Staphylococcus* spp. apresenta 42 espécies e 24 subespécies (EUZÉBY, 2010) amplamente distribuídas na natureza, sendo um dos principais grupos de bactérias que colonizam pele e mucosas de mamíferos (JARLOV, 1999; PEACOCK, 2005). Os *Staphylococcus* spp. constituem uma das principais causas

de infecções bacterianas no ambiente hospitalar, bem como de infecções comunitárias (WILKINSON, 1997). Divide-se em dois grupos, *Staphylococcus* coagulase-positivos e SCN, de acordo com a produção da enzima coagulase, a qual é responsável pela conversão do fibrinogênio sanguíneo em fibrina e que confere à bactéria a capacidade de coagular o plasma humano (ARCHER, 2000).

*S. aureus* é o principal representante entre os coagulase-positivos, não somente por sua prevalência em infecções, como também por sua virulência (ARCHER, 1998). Essa espécie difere consideravelmente de outras espécies de *Staphylococcus* por produzir uma variedade de toxinas extracelulares e outras proteínas associadas à virulência (PROJAN & NOVICK, 1997). Os SCN constituem um grupo onde é encontrada a maior parte das espécies do gênero *Staphylococcus* (JARLOV *et al.*, 1999). Eles foram considerados, durante muito tempo, microrganismos saprófitas, porém, sua importância como patógenos tem sido reconhecida nas últimas décadas. Isso se deve, principalmente, ao aumento no uso de próteses, cateteres e dispositivos médicos, associado ao crescente número de atendimentos de pacientes imunocomprometidos (BANNERMAN & PEACOCK, 2007). Esses fatores trouxeram os SCN para a vanguarda dos patógenos hospitalares. Contudo, como essas bactérias são habitantes normais da pele e mucosas, um dos principais desafios é distinguir as amostras com significância clínica das amostras contaminantes (VON EIFF, PETERS & HEILMANN, 2002).

Acredita-se que os SCN constituam um reservatório para genes de resistência, favorecendo a transferência horizontal destes para os *S. aureus* (HANSSEN & SOLLID, 2004). Berglund e Söderquist (2008) sugeriram que um clone prevalente de *S. haemolyticus* resistente à oxacilina, isolado em uma UTIN de um hospital na Suécia tenha transmitido horizontalmente o gene *mecA* para cepas de *S. aureus* sensíveis, naquela instituição.

### **1.2.1. *Staphylococcus aureus***

*S. aureus* é a espécie de *Staphylococcus* de maior relevância clínica, sendo o principal agente etiológico de infecções nosocomiais e comunitárias, podendo causar desde infecções cutâneas e de tecidos moles, como celulite, impetigo e abscesso até infecções graves, decorrentes da invasão direta dos tecidos, como pneumonia, meningite, endocardite e bacteriemia (CASEY *et al.*, 2007; KUBICA *et al.*, 2008).

O ser humano é considerado o reservatório natural de *S. aureus* e as narinas anteriores constituem o principal nicho deste microrganismo, sendo, aproximadamente, 20% dos indivíduos carreadores persistentes e 30% carreadores intermitentes (WERTHEIM *et al.*, 2008). Esse tipo de colonização se mostra um grande risco para a aquisição de infecções estafilocócicas, já que grande parte das bacteriemias nosocomiais tem origem endógena (HOLTFRETER *et al.*, 2007). Em RNs, o maior reservatório de *S. aureus* é o cordão umbilical, sendo outros sítios também relatados, como pele, nasofaringe e trato gastrointestinal. Após dez dias de vida, aproximadamente 80% dos RNs estão colonizados por *S. aureus* (CIMOLAI, 2003; ZING, POSFAY-BARBE & PITTET, 2008). Esse microrganismo pode ainda causar doenças relacionadas à produção de toxinas, como a síndrome da pele escaldada e a síndrome do choque tóxico, (ARCHER, 1998; TENOVER & GAYNES, 2000).

*S. aureus* produz um vasto número de fatores de virulência, que inclui um conjunto de adesinas superficiais capazes de se ligar aos componentes da matriz extracelular do hospedeiro, denominadas “microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules” (MSCRAMMS). Além disso, praticamente todas as cepas produzem enzimas como proteases, nucleases, hialuronidase, lipase e colagenase (FOSTER, 2005; KUBICA *et al.*, 2008).

Amostras de *S. aureus* resistentes à metilina (MRSA) são reconhecidas como importante causa de infecções associadas aos cuidados à saúde. No entanto, nos últimos anos tem-se verificado uma alta prevalência de MRSA em infecções adquiridas na comunidade (CA-MRSA), acometendo indivíduos sem fatores de risco, atletas, presidiários, crianças em creches, entre outros. Apesar de acometer indivíduos saudáveis, cepas de CA-MRSA também têm sido identificadas em número crescente nos hospitais (CHAMBERS & DELEO, 2009). Tais cepas são caracterizadas pela predominância do “Staphylococcal Cassete Chromosome *mec*” (SCC*mec*) tipo IV, pela ausência de resistência a múltiplas drogas e presença de toxinas específicas, incluindo a leucocidina de Pantón Valentine (PVL) e, ocasionalmente, as toxinas esfoliativas (PARK *et al.*, 2007).

Fatores de risco para aquisição nosocomial de MRSA incluem hospitalização prolongada, permanência em UTI, doenças crônicas, exposição prévia a antibióticos, cirurgias e contato com pacientes colonizados por MRSA. A infecção por esse patógeno é tipicamente precedida pela colonização das narinas anteriores e da pele. Outro sítio de

colonização em potencial inclui feridas pós-operatórias (GARDAM *et al.*, 2000) e cavidade oral (SMITH *et al.*, 2001).

### 1.2.2. *Staphylococcus epidermidis*

*S. epidermidis* é a espécie de SCN mais isolada de infecções em humanos, representando a maior parte da microbiota comum da pele e das membranas mucosas do indivíduo (VOUNG & OTTO, 2002). Nos últimos anos, esse microrganismo tem sido considerado uma das causas mais importantes de IRAs, sendo também o mais isolado de bacteriemias relacionadas ao uso de cateteres vasculares (GARCIA *et al.*, 2004; WEISMAN, 2004; CASEY *et al.*, 2007).

A grande maioria das infecções por *S. epidermidis* apresenta conseqüências significativas ao longo das hospitalizações, como aquisição bacteriana de múltipla resistência a antimicrobianos. Genes de resistência a antibióticos específicos estão amplamente disseminados entre esses microrganismos. Em muitos países, 75-90% de todas as amostras hospitalares isoladas de *S. epidermidis* são resistentes à meticilina, índice mais elevado do que entre isolados de *S. aureus* (40-60%). Além da resistência à meticilina, cepas de *S. epidermidis* têm adquirido resistência a vários outros antibióticos, resistência essa codificada, na maior parte dos casos, por genes encontrados em plasmídios, ocorrendo mais frequentemente entre as cepas resistentes à meticilina do que entre as susceptíveis (OTTO, 2009).

A crescente utilização de aparatos médicos transitórios ou permanentes, tais como cateteres intravasculares, próteses articulares e sondas em pacientes gravemente debilitados e/ou imunocomprometidos (por exemplo pacientes em UTIs, com câncer, transplantados e recém-nascidos prematuros), tornou os SCN patógenos oportunistas de grande relevância clínica (KLOSS & BANNERMAN, 1994). Esse aumento no uso de biomateriais em procedimentos médicos predispõe a colonização e infecção por *S. epidermidis* devido à sua habilidade de aderência a biomateriais através da expressão de proteínas de ligação como a “fibrinogen binding *S. epidermidis*” (Fbe) e a proteína bifuncional AtIE, que atua como adesina e autolisina (VON EIFF, PETERS & HEILMANN, 2002).

As infecções por *S. epidermidis* associadas a dispositivos médicos são complicadas pela formação de biofilme depositado na superfície desses polímeros (VUONG & OTTO, 2002). O biofilme é formado por múltiplas camadas de células envolvidas por uma substância extracelular amorfa conhecida como “slime”. Em

associação ao “slime” foi verificada a presença de uma adesina polissacarídica intercelular, denominada “Polyssaccharide Intercellular Adhesin” (PIA), que é um polissacarídeo composto de  $\beta$ -1-6-N-acetilglicosamina (GÖTZ, 2002) presente também em *S. aureus* e em cepas de *E. coli* (VUONG *et al.*, 2004). O biofilme atua como barreira física à ação do sistema imunológico do paciente e tem se tornado um grave problema na área de saúde, pois está intrinsecamente relacionado ao aumento da resistência dos microrganismos aos antimicrobianos. As células envoltas no biofilme encontram-se menos expostas aos antimicrobianos, a moléculas do sistema imune e, adicionalmente, nesse microambiente há maior concentração de nutrientes, como carbono e nitrogênio (DONLAN, 2001).

### 1.3. Resistência à oxacilina/meticilina

Em 1959, com a introdução das penicilinas semi-sintéticas, como metilina e oxacilina, ocorreu um grande avanço no tratamento das infecções estafilocócicas causadas por amostras produtoras de penicilinases, o que diminuiu consideravelmente os índices de mortalidade por essas infecções (JOHN & BARG, 1996). Porém, já no início da década de 60, surgiram as primeiras amostras de *S. aureus* resistentes a essas drogas na Inglaterra (JEVONS, 1961 *apud* ITO *et al.*, 2004). Atualmente, tanto *S. aureus* como *S. epidermidis* apresentam altos índices de resistência à oxacilina, o que faz com que estes microrganismos sejam importantes agentes de IRAs em diversos países (DIEKEMA *et al.*, 2001). A oxacilina e a metilina não sofrem ação das penicilinases bacterianas e somente a oxacilina é comercializada no Brasil, além de apresentar boa absorção após administração oral, ao contrário da metilina, que precisa ser administrada via parenteral (GOODMAN & GILMAN, 2005).

A resistência a esses fármacos, extensiva aos  $\beta$ -lactâmicos em geral, deve-se à aquisição do gene *mecA*, de 2,1 kb, responsável pela produção de uma proteína ligadora de penicilina alterada (PBP2a), cuja característica principal é a baixa afinidade a essa classe de antimicrobianos. O gene *mecA* encontra-se inserido no cassete cromossômico *mec* presente no gênero *Staphylococcus* spp., sendo altamente conservado entre suas espécies. O cassete *mec* tem sido bem caracterizado em amostras de *S. aureus*.

O SCC*mec* pode apresentar diferentes tamanhos, variando de 20 a 67 kb, sendo caracterizado pela presença de genes codificadores de recombinases, denominado complexo *ccr*, pela presença de genes reguladores da transcrição do *mecA* (*mecR1* e *mecI*) e ainda pode conter segmentos de DNA associados, como seqüências de inserção

(*IS431*), transpósons (*Tn554*) e cópias de plasmídeos (*pUB110* e *pT181*) (HIRAMATSU *et al*, 2001).

Já foram descritas até o momento quatro classes de complexo do gene *mec*, descritas como A, B, C (C1 e C2) e D, além de cinco tipos de complexos *ccr*: 1, 2, 3, 4 e 5. Com base na classe do complexo dos genes *mec* e *ccr* presentes e em suas combinações, os cassetes *SCCmec* são classificados em oito tipos, I, II, III, IV, V, VI, VII e VIII (ITO *et al*, 2001; MA *et al*, 2002; ITO *et al*, 2004; OLIVEIRA, MILHEIRIÇO & DE LENCASTRE, 2006; HIGUCHI *et al*, 2008; ZHANG, 2009). A Tabela 1 e a Figura 1 ilustram de forma esquemática as estruturas dos cassetes *mec* I ao VIII.

O *ccr* pode consistir em dois genes adjacentes, *ccrA* e *ccrB*, ou em apenas um gene, o *ccrC*, que codifica recombinases da família da invertase/resolvase, que medeiam a integração e excisão do cassete no genoma bacteriano, sendo responsáveis pela mobilidade do *SCCmec*. Há cinco tipos de complexo gênico *ccr*: tipo1, *ccrA1ccrB1*; tipo 2, *ccrA2ccrB2*; tipo 3, *ccrA3ccrB3*; tipo 4, *ccrA4ccrB4*; e tipo 5 ou *ccrC*. O complexo *mec* é composto por *IS431* e/ou *IS1272*, *mecA* e um conjunto intacto ou truncado dos genes regulatórios *mecR1* (codificante da proteína transdutora de sinal MecR1) e *mecI* (gene codificante da proteína repressora MecI) (CHAMBERS & DELEO, 2009; ZHANG *et al*, 2009). O complexo *mec* apresenta quatro classes, com as seguintes estruturas: classe A, *mecI-mecR1-mecA-IS431* (completo); classe B, *IS1272-ΔmecR1(truncado)-mecA-IS431*; classe C, *IS431-ΔmecR1-mecA-IS431*, com subtipos C1 e C2; classe D, *ΔmecR1-mecA-IS431*. Os subtipos C1 e C2 se diferem pelo fato de C2 apresentar a região *IS431* à montante com orientação inversa (KWON *et al*, 2005; CHAMBERS & DELEO, 2009).

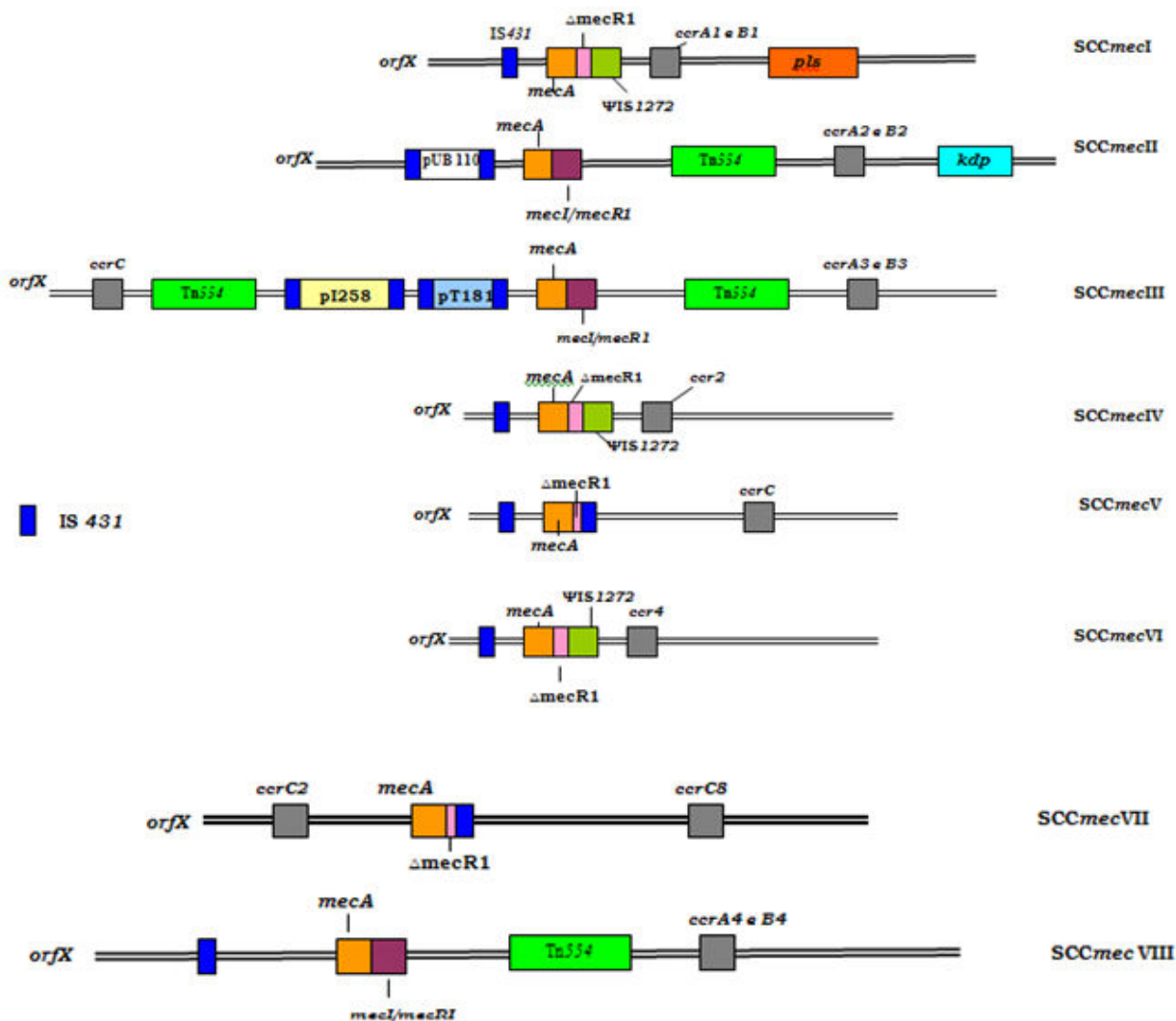
A proteína MecI atua na repressão dos genes *mecA* e *mecR1*, enquanto a MecR1 é uma proteína transmembranar com capacidade de reconhecer os β-lactâmicos. Na presença do antimicrobiano, MecR1 sofre clivagem e o domínio metaloprotease intracelular torna-se ativo. Esse domínio cliva a proteína MecI que está ligada à região promotora do *mecA*, permitindo assim, a expressão do gene *mecA* e, conseqüentemente, a síntese da PBP2a (BERGER-BACHI & ROHER, 2002).

**Tabela 1:** Características dos diferentes tipos de SCC*mec* já descritos

Características	Tipos de SCC <i>mec</i>							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Tamanho (kb)	34	53	67	21-24	28	24	41-49	32
Complexo <i>mec</i>	B	A	A	B	C2	B	C1 ou C2	A
Complexo <i>ccr</i>	1 (A1 e B1)	2 (A2 e B2)	3 (A3 e B3)	2 (A2 e B2)	5 (C)	4 (A4 e B4)	5 (C2 e C8)	4 (A4 e B4)
IS431 (n)	1	2	4	1	2	1	1	1
Tn554 (n)	0	1	2	0	0	0	0	1
pUB 110	-	+	-	-	-	-	-	-
pT181	-	-	+	-	-	-	-	-
pI258	-	-	+	-	-	-	-	-
Outros genes de resistência	Nenhum	<i>erm, spc</i> e <i>tobra</i>	<i>erm, tet</i> e Hg <sup>++</sup>	Nenhum	Nenhum	Nenhum	Nenhum	<i>erm</i> e <i>spc</i>

Adaptado de CHAMBERS & DELEO, 2009. n = número de cópias; Hg<sup>++</sup>, *erm*, *tet*, *spc* e *tobra* = genes de resistência a mercúrio, eritromicina, tetraciclina, espectinomicina e tobramicina, respectivamente.





**Figura 1:** Figura esquemática simplificada da estrutura dos tipos de cassete cromossômico *mec* (SCC*mec*) encontrados em amostras de *Staphylococcus aureus* (adaptado de DEUREMBERG & STOBBERINGH, 2008; ZHANG *et al*, 2009). Cores iguais representam os mesmos fragmentos gênicos.

Normalmente, os tipos I, IV, V, VI e VII determinam resistência apenas aos  $\beta$ -lactâmicos, enquanto os tipos II, III e VIII determinam resistência a várias classes de antimicrobianos, devido aos elementos genéticos adicionais integrados a esses cassetes, tais como: plasmídeos (pUB110, pI258 e pT181) e transpósons (Tn554 e  $\Psi$ Tn554). O plasmídeo pUB110 apresenta o gene *ant*(4') que confere resistência a vários aminoglicosídeos, enquanto o pI258 confere resistência às penicilinas e aos metais pesados e o pT181 resistência à tetraciclina. O transpóson Tn554 carrega o gene *ermA* e, por este motivo, é responsável pela resistência a macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas B; o  $\Psi$ Tn554 confere resistência ao cádmio. Os elementos genéticos móveis atuam como

potenciais regiões “hot spot” (alta frequência de recombinação), contribuindo para a variação na composição do cassete.

Os tipos I, II e III de SCC*mec* causam principalmente infecções nosocomiais e são significativamente maiores que os demais. O SCC*mec* tipo I possui tamanho de aproximadamente 34 kb, sendo o menor entre os três tipos. Esse cassete não carrega transpósom ou plasmídeo que confira resistência a metais pesados ou outros antibióticos além da meticilina; contudo, o subtipo IA tem apresentado o plasmídeo integrado pUB110. O cassete denominado SCC*mec* tipo II tem o tamanho de 53 kb, e contém, além dos genes que conferem resistência à meticilina *mecA* e *mecR1*, o transpósom Tn554, responsável pela resistência à eritromicina.

O SCC*mec* tipo III é o maior entre os demais tipos, com um tamanho de aproximadamente 67 kb, contendo os genes *mecA* e *mecR1*, os transpósomos Tn554 e  $\Psi$ Tn554, o plasmídeo pT181 e com o transpósom  $\Psi$ Tn554. Esse tipo de cassete apresenta dois subtipos, o IIIA, que não contém o plasmídeo pT181 ou seu elemento flanqueador IS431, e o IIIB, com ausência de cópias de pT181 e Tn554.

Amostras de *Staphylococcus* contendo o SCC*mec* tipo IV são as principais responsáveis por infecções adquiridas na comunidade. Esse elemento é pequeno e normalmente não possui outros genes de resistência que não seja o *mecA*. Além disso, esse cassete apresenta múltiplos subtipos, sugerindo que o SCC*mec* tipo IV seja altamente transmissível. Os quatro subtipos de SCC*mec* tipo IV (IVA, IVB, IVC e IVD) diferem em suas seqüências a montante do complexo *ccr*, conhecidas como região L-C (SHORE *et al.*, 2005, *apud* MARTINS & CUNHA, 2007).

Em 2004, ITO *et al.* descreveram o SCC*mec* tipo V, um cassete de aproximadamente 27 kb que, à semelhança do tipo IV, possui somente genes codificadores de resistência à meticilina. No entanto, diferente dos outros tipos, o SCC*mec* de tipo V carrega um novo gene *ccr*, o tipo C, que está presente em cópia única, ao invés de um par como encontrado em relação ao gene *ccr* de outros tipos de SCC*mec*.

Oliveira, Milheiriço e De Lencastre, em 2006, detectaram o SCC*mec* tipo VI em amostras de MRSA isoladas em hospitais portugueses, enquanto que Higuchi e colaboradores, em 2008, detectaram o aparecimento de mais um tipo de SCC*mec*: o tipo VII. Este foi encontrado em Taiwan, a partir de cepas de MRSA adquiridas na comunidade, apresentando tamanho de 41 kb. Finalmente, em 2009, Zhang e colaboradores descreveram o SCC*mec* tipo VIII, cujo tamanho fica em torno de 32 kb, tendo sido relatado originalmente entre cepas de CA-MRSA isoladas na Suécia.

A técnica de tipagem do SCC $_{mec}$  tem se mostrado uma ferramenta importante na caracterização de diferentes amostras de MRSA. A técnica se baseia na presença de diferentes fragmentos de DNA específicos dos vários tipos de SCC $_{mec}$  (OLIVEIRA & DE LENCASTRE, 2002). Kondo e colaboradores (2007) desenvolveram uma técnica de tipagem que tem sido mais apropriada para os SCN. Esta técnica consiste em duas reações de polimerase em cadeia multiplex, M-PCR1, que amplifica genes dos cinco tipos de *ccr* e a M-PCR2, que detecta as classes do gene *mec*. A combinação entre a classe de gene *mec* e o tipo de *ccr*, indica o tipo de SCC $_{mec}$  da amostra analisada.

O tratamento utilizado em infecções causadas por amostras *Staphylococcus* spp. resistentes à oxacilina ainda é bastante limitada. Algumas drogas começaram a ser usadas nos últimos anos, tais como linezolida, quinupristina/dalfopristina, tigeciclina (AKSOY & UNAL, 2007) e daptomicina. Contudo, a vancomicina, que é administrada endovenosamente e pode induzir efeitos colaterais devido a sua toxicidade, continua sendo o principal antimicrobiano de escolha (HIRAMATSU *et al.*, 2001). Macrolídeos e clindamicina também podem ser vistos como opções terapêuticas no tratamento de tais infecções.

#### **1.4. Antibióticos macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas B (MLS<sub>B</sub>): aspectos gerais**

Estes antimicrobianos apresentam mecanismos de ação idênticos, mas estruturas químicas muito diferentes. Todos eles bloqueiam a síntese proteica por inibição da peptidiltransferase na subunidade 50S ribossomal, o que estimula a dissociação da molécula de peptidil-tRNA durante o alongamento da cadeia peptídica. Devido a este mecanismo de ação em comum, os estafilococos freqüentemente desenvolvem resistência cruzada a estas três classes de antimicrobianos (SPÍZEK & REZANKA, 2004).

##### **1.4.1. Macrolídeos**

Esta classe é composta de diferentes antimicrobianos, tais como: eritromicina, claritromicina, azitromicina, josamicina, espiramicina e tilosina. A eritromicina é o protótipo do grupo, tendo sido introduzida em 1952 como o primeiro antibiótico macrolídeo. Foi originalmente obtida a partir de produtos metabólicos de uma cepa de *Streptomyces erythreus*. Sua ação bacteriana pode ser bacteriostática ou bactericida (KATZUNG, 2003).

Os constituintes mais novos dessa classe são moléculas semi-sintéticas com substituições no anel lactônico. Esses novos derivados, a exemplo da claritromicina e da azitromicina, apresentam maior penetração intracelular e tissular, são mais estáveis, possuem melhor absorção, interagem menos com outros fármacos e ocasionam menos efeitos colaterais (ROBERTS *et al*, 1999). A claritromicina e a eritromicina são praticamente idênticas na sua atividade antibacteriana e, por este motivo, os estafilococos resistentes à eritromicina também apresentam resistência à claritromicina. A azitromicina, por sua vez, difere-se das demais principalmente quanto às suas propriedades farmacocinéticas, além de ser ligeiramente menos ativa contra estafilococos (KATZUNG, 2003).

#### **1.4.2. Lincosamidas**

Lincomicina e clindamicina são lincosamidas utilizadas na prática clínica, cuja atuação pode ser bacteriostática ou, em concentrações mais elevadas, bactericida. A lincomicina é obtida a partir de produtos de fermentação de cepas de *Streptomyces lincolnensis*, enquanto a clindamicina é preparada semi-sinteticamente (SPÍZEK & REZANKA, 2004).

A clindamicina apresenta-se ainda hoje como alternativa terapêutica em casos de infecção por *S. aureus*, sendo indicada a pacientes que apresentem alergia à penicilina. Encontra-se disponível em formulações oral e intravenosa e se distribui de forma significativa na pele e em tecidos subcutâneos (GOODMAN & GILMAN, 2005). As cepas de CA-MRSA, causadoras de infecções cutâneas e de tecidos moles, costumam ser suscetíveis a este antibiótico. Além disso, a clindamicina inibe a produção de toxinas e fatores de virulência em microrganismos Gram-positivos interferindo na síntese protéica bacteriana (DAUREL *et al*, 2008).

#### **1.4.3. Estreptograminas B**

A quinupristina é uma estreptogramina B derivada semi-sintética de uma pristinamicina de origem natural produzida por *Streptomyces pristinaespiralis*. Devido à sua solubilidade em água, mostra-se apropriada para administração intravenosa. É utilizada clinicamente em associação com a dalfopristina, uma estreptogramina A que atua em sítio ribossomal próximo. A ação sinérgica entre ambos produz um efeito bactericida (GOODMAN & GILMAN, 2005; KATZUNG, 2003). Fuchs e colaboradores (2000) mostraram que mais de 90% das 516 amostras de *S. aureus* analisadas por eles

apresentavam susceptibilidade à quinupristina-dalfopristina em concentrações  $\leq 1,0$   $\mu\text{g/mL}$ , e que sua atividade não era significativamente afetada pela resistência à meticilina. Além disso, esse grupo observou que a susceptibilidade à clindamicina, assim como a CMI da quinupristina isoladamente, são bons indicadores da atividade bactericida *in vitro* da quinupristina-dalfopristina.

#### **1.4.4. Mecanismos de resistência aos antibióticos MLS<sub>B</sub>**

O uso de antibióticos macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas B (MLS<sub>B</sub>) costuma ser uma alternativa terapêutica no tratamento de infecções por cocos Gram-positivos; no entanto, este tem sido acompanhado de um número crescente de cepas resistentes (GOODMAN & GILMAN, 2005).

Os principais mecanismos responsáveis pela resistência à eritromicina em estafilococos são a alteração no sítio-alvo e o efluxo ativo do fármaco. A modificação no sítio-alvo da subunidade 50S ribossomal é mediada pelos genes *erm* (*ermA*, *ermB* ou *ermC*) e confere resistência aos antibióticos MLS<sub>B</sub>, cuja expressão fenotípica pode ser induzível ou constitutiva (LIM *et al*, 2002). Por outro lado, o efluxo de macrolídeos neste mesmo gênero é realizado por proteínas de membrana codificadas pelos genes metil-sulfóxido redutase A e B (*msrA* e *msrB*, respectivamente), sendo este mecanismo específico para macrolídeos, como a eritromicina, claritromicina, azitromicina e estreptograminas B (fenótipo MS) (SPILIOPOULOU *et al*, 2004).

Pode-se também observar, embora menos freqüentemente, a resistência somente às lincosamidas (fenótipo L). Este tipo de resistência se dá pelas lincomicina-nucleotidiltransferases codificadas pelo gene *lin* ou *lnu*, que inativam somente este grupo de antibióticos (ROBERTS *et al*, 1999). O gene *linA* foi descrito em *Staphylococcus haemolyticus* e o gene *linA'* em *S. aureus*, tendo ambos apresentado alto grau de homologia entre si (LINA *et al*, 1999).

##### **1.4.4.1. Os genes “erythromycin ribosome methylation” (*erm*)**

Os genes *erm* codificam metilases que impedem a ligação dos antibióticos do grupo MLS<sub>B</sub> ao ribossomo bacteriano, resultando na resistência cruzada a macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas B (ROBERTS *et al*, 1999). Tal resistência é mediada por uma simples alteração no ribossomo, acarretando mudança conformacional, conferida por N<sup>6</sup>-dimetilação de uma adenina na posição 2058 do RNAr 23S (MARTINEAU *et al*, 2000; STROMMENGER *et al*, 2003).

Em linhagens hospitalares de *Staphylococcus* spp., os genes *erm* mais encontrados são *ermA* e *ermC*, também podendo ser encontrado, embora mais raramente, o gene *ermB*. O gene *ermA* foi primeiramente descrito em 1969 em uma amostra clínica com resistência induzida à clindamicina (WEISBLUM & DEMOHN, 1969 *apud* WESTH *et al.*, 1995). Esse gene se encontra inserido no transpóson Tn554, possuindo predominantemente um único sítio específico de inserção no cromossomo de *S. aureus* (MURPHY, 1985). O gene *ermB* foi detectado no Japão, em 1963, em um plasmídio de elevado tamanho molecular, o pI258, tendo sido visto mais tarde também no transpóson Tn551 (NOVICK *et al.*, 1979 *apud* WESTH *et al.*, 1995). Esse gene é mais frequente entre espécies do gênero *Streptococcus* spp. O gene *ermC* costuma estar inserido em pequenos plasmídios, cujos tamanhos variam de 2,5 a 5 kb (IORDANESCU *et al.*, 1975 *apud* WESTH *et al.*, 1995).

A expressão de resistência aos antimicrobianos do grupo MLS<sub>B</sub> pode ser constitutiva ou induzida. Quando a expressão é do tipo constitutiva, as cepas são resistentes a todas as três classes de antibióticos. A resistência induzida (fenótipo iMLS<sub>B</sub>) é observada em resposta aos macrolídeos, visto que estas moléculas são as únicas que atuam como indutores da expressão da metilase (FLUIT *et al.*, 2001).

O caráter de resistência não está relacionado à classe de gene *erm*, mas depende da sequência da região regulatória a montante do gene estrutural da metilase. Na ausência de um indutor, a inatividade do RNAm é devido à estrutura de seu terminal 5', que inclui um peptídeo líder e um conjunto de sequências repetitivas invertidas que formam a estrutura de um grampo (Figura 2). Esta estrutura em grampo seqüestra as sequências de iniciação (sítios de ligação ao ribossomo e códon de iniciação) para a metilase através do pareamento de suas bases. De acordo com o modelo de regulação pós-transcricional, a indução acontece através da ligação de um macrolídeo indutor ao ribossomo durante a tradução do peptídeo líder, levando à desestabilização da estrutura em grampo, exposição das sequências de iniciação no ribossomo e tradução da metilase Erm (DAUREL *et al.*, 2008).

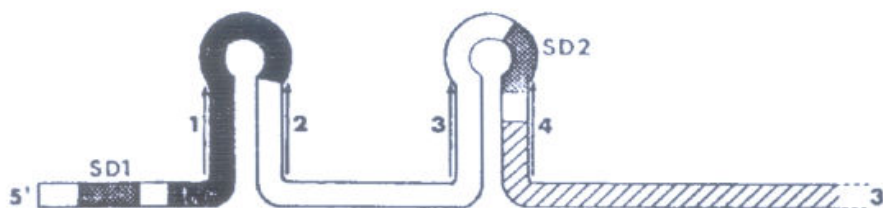
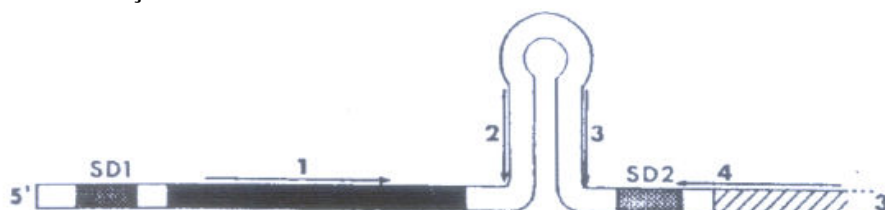
**Conformação I****Conformação II**

Figura 2: Conformações alternativas do mRNA do gene *ermC* induzível com estruturas secundárias na ausência de eritromicina (conformação I) ou na sua presença (conformação II), promovendo a desestabilização da estrutura em grampo, o que permite a expressão do peptídeo líder. Regiões pretas: seqüência do peptídeo líder; regiões hachuradas: seqüência da metilase; 1, 2, 3 e 4 representam repetições invertidas (palíndromos); SD1 e SD2: seqüências de Shine-Dalgarno (Figura adaptada de Leclercq & Courvalin, 1991).

A exposição de *S. aureus* contendo fenótipo  $MLS_B$  induzível pode resultar em resistência cruzada a todos os outros antibióticos do grupo, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Pode-se observar então falhas terapêuticas durante o tratamento com clindamicina devido à seleção de cepas com genes *erm* mutantes constitutivos pré-existent. Estes mutantes podem se originar a partir de mutações pontuais ou duplicações em “tandem” no atenuador, ou mesmo da deleção completa do mesmo, produzindo a expressão constitutiva de resistência (SIBERRY *et al*, 2003; DAUREL *et al*, 2008).

#### 1.4.4.2. O gene metil-sulfóxido redutase A (*msrA*)

O gene *msrA* é principal responsável pela resistência somente aos antibióticos da classe dos macrolídeos e estreptograminas B (MARTINEAU *et al*, 2000). Ele codifica uma proteína hidrofílica denominada *msrA* que contém 488 aminoácidos e dois motivos ligantes à ATP, característicos dos transportadores do tipo ABC (“ATP-binding cassette”). A organização clássica dos transportadores do tipo ABC requer a interação entre os dois domínios de ligação à ATP citoplasmáticos e dois domínios hidrofóbicos posicionados na membrana. Há evidências de que este gene, além de conferir resistência a antibióticos, pode ter um papel adicional na virulência de estafilococos (REYNOLDS *et al*, 2003). Dois

genes, *stpA* e *smpA*, foram identificados a montante do gene *msrA* do plasmídeo original de *S. epidermidis*, codificando uma proteína de ligação à ATP e uma proteína transmembrana, respectivamente. Sequências altamente similares ao *stpA* e *smpA* (*stpB* e *smpB*, respectivamente) foram encontradas adjacentes a uma cópia cromossomial de *msrA* em *S. hominis* (ROSS *et al.*, 1995).

#### **1.4.5. Aspectos epidemiológicos das infecções por *Staphylococcus* spp. resistentes à eritromicina**

Alguns autores têm identificado em amostras clínicas de *S. aureus* e *S. epidermidis* resistentes à eritromicina genes que codificam resistência a macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas B. Schmitz e colaboradores (2000), num estudo envolvendo 851 amostras clínicas de *S. aureus* (358 MSSA e 493 MRSA) obtidas de 24 diferentes hospitais universitários europeus, verificaram que o gene *ermA* apresentou a maior prevalência (67%), seguido dos genes *ermC* (23%) e *msrA/msrB* (6%). O gene *ermB* foi detectado em apenas 0,6% das amostras analisadas. Eles observaram também que o gene *ermA* foi o mais comum entre amostras de MRSA (88%) do que entre amostras MSSA (38%), enquanto o gene *ermC* foi mais freqüente entre os MSSA (47%) do que em MRSA (5%). Entre os *S. aureus* estudados, o gene *ermA* se mostrou predominante nas cepas que expressavam o fenótipo MLS<sub>B</sub> constitutivo, ao passo que o gene *ermC* foi prevalente em amostras de MSSA com um fenótipo MLS<sub>B</sub> induzível. Em 84% das amostras de *S. aureus*, apenas um tipo de gene *erm* foi detectado, e a combinação de *ermA* e *ermC* foi vista em apenas 3% das mesmas.

Esses resultados corroboram com os encontrados por Lina e colaboradores (1999), que estudaram 144 amostras de *S. aureus* provenientes de hospitais da França resistentes aos antibióticos MLS<sub>B</sub>. Eles encontraram o gene *ermA* em 57,6% das amostras de MRSA, principalmente entre as que expressavam o fenótipo MLS<sub>B</sub> constitutivo, e em 5,6% das amostras de MSSA. Por outro lado, o gene *ermC* foi o mais comum entre as amostras de MSSA (20,1%), principalmente entre as cepas com fenótipo de resistência induzível, e em apenas 4,9% das amostras de MRSA. Um outro estudo realizado em hospitais universitários da Grécia (SPILIOPOULOU *et al.*, 2004) mostrou que, entre 60 amostras de MSSA, 35 (58,3%) apresentaram o gene *ermA*, 12 (20%) o gene *ermC* e 13 (21,7%), o gene *msrA*. Entre as 113 amostras de MRSA, 109 (96,5%) carregavam o gene *ermC*, e somente 3 (2,7%) carregavam o gene *ermA*. Uma amostra continha os genes *ermA* e *ermC* e nenhuma apresentou o gene *msrA*.



Lina e colaboradores (1999) também mostraram que, entre 150 amostras de SCN isoladas na França, tanto as resistentes quanto as sensíveis à meticilina apresentaram com maior frequência o gene *ermC*. Eady e colaboradores (1993) documentaram a predominância do gene *ermC* entre amostras clínicas e comensais de SCN isoladas no Reino Unido. A resistência codificada pelo gene *msrA* foi mais encontrada entre os SCN do que entre os *S. aureus* (EADY *et al.*, 1993 *apud* FLUIT *et al.*, 2001).

Park e colaboradores (2007) realizaram um estudo num hospital universitário na Coreia, comparando características fenotípicas e genotípicas de 138 amostras de MRSA obtidas de 50 pacientes adultos e 88 pacientes pediátricos. Os autores correlacionaram os tipos de SCC*mec* e “sequence typing” (ST) com a presença dos genes *erm* e verificaram que o gene *ermA* foi detectado principalmente entre amostras com SCC*mec* II / ST5. O gene *ermC* foi prevalente entre amostras tipo IV apresentando diferentes STs. Os resultados também mostraram que a resistência à clindamicina foi mais alta na população adulta do que na pediátrica, além de o gene *ermC* ter sido detectado em 52 (59,1%) das 88 amostras pediátricas de MRSA e somente em 5 (10%) das amostras de MRSA obtidas de pacientes adultos. Os resultados desses trabalhos mostram claramente a variação existente na prevalência dos genes que codificam resistência à eritromicina e clindamicina em relação às espécies de *Staphylococcus*, às diferentes regiões geográficas, às diferentes populações, assim como em relação à resistência à meticilina em amostras de *Staphylococcus* spp.

Estudos que objetivam a investigação da resistência a macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas B em *Staphylococcus* spp. são escassos no Brasil. Como escolha alternativa na terapêutica de infecções estafilocócicas, em especial aquelas causadas por amostras da comunidade, essas classes de antimicrobianos necessitam ser melhor avaliadas quanto à resistência bacteriana e presença de genes relacionados. Adicionalmente, em amostras resistentes à meticilina, a presença de alguns desses genes parece estar relacionada à multirresistência estafilocócica e, por consequência, a cassetes *mec* específicos. Entretanto, são raros os estudos que analisam essa correlação. Desse modo, a caracterização da resistência à eritromicina e clindamicina em amostras clínicas de *S. aureus* e *S. epidermidis*, duas estafilocócicas espécies de maior relevância clínica, e a análise de sua relação com diferentes tipos de SCC*mec* têm grande importância na epidemiologia de infecções por *Staphylococcus* spp.

## 2 - OBJETIVO

---

O presente estudo objetivou caracterizar um grupo de amostras clínicas de *S. aureus* e *S. epidermidis*, isoladas de neonatos e não-neonatos, quanto a aspectos fenotípicos e moleculares da resistência à eritromicina e à clindamicina, relacionando-os aos diferentes tipos de SCCmec.

### 3 - MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Desenho do estudo

Foi realizado um estudo descritivo, com amostras selecionadas por conveniência, a partir de amostras clínicas não duplicadas de *S. aureus* e *S. epidermidis* pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Infecção Hospitalar do Departamento de Microbiologia Médica, IMPPG, UFRJ.

#### 3.2. Cepas bacterianas

De um total de 315 amostras bacterianas isoladas inicialmente analisadas, sendo 208 de *S. aureus* e 107 de *S. epidermidis*, foram selecionadas apenas aquelas resistentes à eritromicina e com perfis de fragmentação genômica distintos (Figura 3). A técnica de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), após tratamento com a enzima de restrição *SmaI*, serviu como base para tal análise, possibilitando a seleção apenas das amostras que apresentavam pulsotipos diferentes. Os dendrogramas foram obtidos por análise computadorizada utilizando o programa Bionumerics versão 6.0. Todas as amostras foram obtidas no período de junho de 2004 a junho de 2009 a partir de 7 hospitais do Rio de Janeiro (Tabela 2). As mesmas foram previamente submetidas à confirmação de suas espécies.

**Tabela 2:** Amostras clínicas de *S. aureus* e *S. epidermidis* obtidas entre 2004 e 2009 de diferentes hospitais do Rio de Janeiro utilizadas no presente estudo.

Hospital (Total de amostras = 84)	Amostras resistentes à meticilina (71)		Amostras sensíveis à meticilina (13)	
	<i>S.aureus</i> (n=39)	<i>S.epidermidis</i> (n=32)	<i>S.aureus</i> (n=11)	<i>S.epidermidis</i> (n=2)
HNMD (30)	16	13	0	1
INTO (22)	14	0	8	0
IMMFM (17)	1	15	0	1
HMLJ (6)	3	1	2	0
CPL (3)	0	3	0	0
HCD (3)	3	0	0	0
HUCFF (3)	2	0	1	0

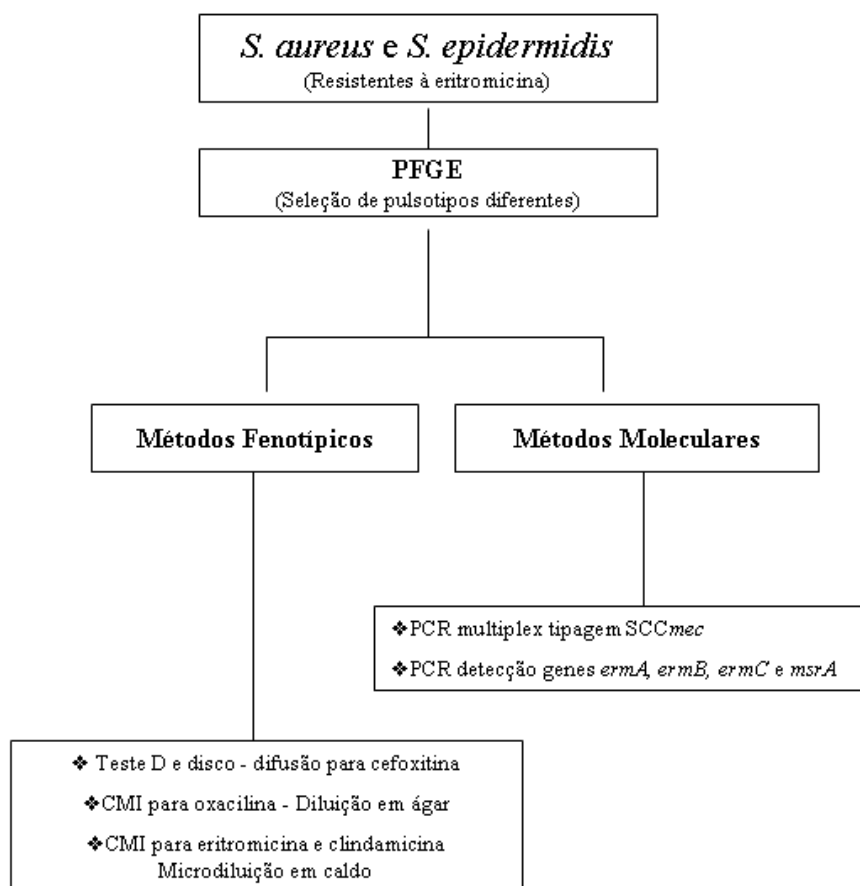
HNMD=Hospital Naval Marcílio Dias, INTO=Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia, IMMFM=Instituto Municipal da Mulher Fernando Magalhães, HMLJ=Hospital Municipal Lourenço Jorge, CPL= Clínica Perinatal de Laranjeiras, HCD=Hospital Copa D'Or, HUCFF=Hospital Universitário Clementino Fraga Filho.

As cepas utilizadas neste estudo como controles dos testes estão apresentadas na Tabela 3.

**Tabela 3:** Amostras-controle utilizadas neste estudo.

Espécie	Amostra	Descrição	Referência
<i>S. aureus</i>	ATCC 25923	Padrão para antibiograma	CLSI
<i>S. aureus</i>	ATCC 29213	Padrão para teste de diluição em agar ou caldo para determinação da CMI	CLSI
<i>S. aureus</i>	ATCC 33591	Amostra <i>mecA</i> positiva	CLSI
<i>S. aureus</i>	ATCC BAA-976	Amostra <i>msrA</i> positiva	CLSI
<i>S. aureus</i>	ATCC BAA-977	Amostra <i>ermA</i> positiva	CLSI
<i>Streptococcus</i> do grupo G	015195	Amostra <i>ermB</i> positiva	D'OLIVEIRA <i>et al</i> (2003)
<i>S. aureus</i>	HM290-1	Amostra <i>ermC</i> positiva	LINA <i>et al</i> (1999) <sup>a</sup>
<i>S. aureus</i>	63a	Amostra clínica com SCC <i>mec</i> III	VIVONI <i>et al</i> (2005)
<i>S. aureus</i>	Mu50	Amostra SCC <i>mec</i> II	HIRAMATSU <i>et al</i> (1997)
<i>S. aureus</i>	522a	Amostra clínica com SCC <i>mec</i> IV	VIVONI <i>et al</i> (2005)

ATCC – American Type Culture Collection. <sup>(a)</sup> Amostra gentilmente cedida pelo Dr. Gerard Lina, do Laboratório de Bacteriologia do Centro Nacional de Referência de Toxemias Estafilocócicas, França.



**Figura 3:** Fluxograma da metodologia.

### **3.3. Avaliação da susceptibilidade antimicrobiana**

#### **3.3.1. Teste de disco-difusão para detecção da resistência à oxacilina e resistência induzida à clindamicina por eritromicina (CLSI, 2009a)**

O teste de difusão foi realizado para os discos de cefoxitina (30µg, Oxoid, Hampshire, Inglaterra), clindamicina (2µg, CECON, São Paulo, Brasil) e eritromicina (15µg, CECON). O disco de cefoxitina é preconizado pelo CLSI como indicador da resistência fenotípica à meticilina. Os discos de eritromicina e clindamicina foram posicionados a uma distância de 20 mm entre bordas internas. A presença de um halo de inibição achatado na região próxima ao disco de eritromicina (descrito como zona “D”) foi indicativo de resistência à clindamicina induzida por macrolídeos. Foram utilizados como controles positivo e negativo para o teste as amostras de *S. aureus* ATCC BAA-977 (teste D positivo) e ATCC BAA- 976 (teste D negativo), respectivamente. A leitura dos testes foi realizada de acordo com os valores do CLSI (2009a).

#### **3.3.2. Determinação da CMI para oxacilina através do teste de diluição em ágar (CLSI, 2009b)**

As amostras bacterianas foram inicialmente semeadas em ágar-sangue, por 18-24h, a 35°C. Algumas colônias foram diluídas em salina a 0,9% (p/v) para obtenção do padrão de turvação 0,5 da escala de McFarland ( $\sim 1,5 \times 10^8$  UFC/poço). Em seguida, fez-se uma diluição 1:10 (v/v) em salina 0,9% e as amostras foram transferidas para o replicador de “Steers”. Posteriormente, as amostras ( $\sim 1,5 \times 10^7$  UFCs/poço) foram inoculadas nas placas contendo ágar Mueller-Hinton (Difco Laboratories, Le Pont de Claix, França), 2% de NaCl (Reagen, Rio de Janeiro, Brasil) e concentrações crescentes de oxacilina (Sigma-Aldrich Company, St. Louis, EUA), variando de 0,25 a 256µg/mL. As placas foram então incubadas por 24 h a 35°C. A leitura do teste foi realizada de acordo com os valores do CLSI (2009c). As cepas de *S. aureus* ATCC 29213 e *S. aureus* ATCC 33591 foram utilizadas como controles de susceptibilidade e resistência, respectivamente.

#### **3.3.3. Determinação da CMI para eritromicina e clindamicina através do teste de microdiluição em caldo (CLSI, 2009b)**

As amostras bacterianas foram inicialmente semeadas em ágar-sangue, por 18-24h, a 35°C. Algumas colônias foram ressuspensas em salina a 0,9% (p/v) para obtenção do padrão de turvação 0,5 da escala de McFarland ( $\sim 1,5 \times 10^8$  UFC/mL). Em seguida, fez-se

uma diluição 1:10 (v/v) em salina 0,9% e 10 µL por poço foram adicionados na placa de microtitulação, apresentando concentrações crescentes (0,25 a 256 µg/mL) de eritromicina e clindamicina (Sigma-Aldrich Company). Posteriormente, as placas foram incubadas por 24h a 35°C. A leitura do teste foi realizada visualmente de acordo com os valores do CLSI (2009a). As cepas de *S. aureus* ATCC 29213 (sensível à meticilina), ATCC BAA-976 (resistente à eritromicina e teste D negativo) e ATCC BAA-977 (resistente à eritromicina e teste D positivo) foram utilizadas como controles.

### **3.4. Métodos Moleculares**

#### **3.4.1. Obtenção de DNA**

O DNA foi obtido através de lise por guanidina, conforme descrito por Pitcher, Sauders & Owen (1989). Cinco colônias isoladas previamente em ágar-sangue foram transferidas para “Tryptic Soy Broth” (TSB; Oxoid) e incubadas a 35°C durante 18h. Em seguida, 1 mL do crescimento bacteriano foi transferido para um tubo eppendorf e centrifugado por 5 min a 8.000  $x$  g. O sedimento foi ressuspense em 1 mL de tampão TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,8) e novamente centrifugado a 8.000  $x$  g por mais 5 min. Ao sedimento, foram adicionados 100 µL de solução de lise [1 mL de tampão TE, 10 mg de lisozima (Sigma), 50 µL de BRIJ a 0,5% (Sigma)] acrescido de 5 µL de lisostafina (1 mg/mL) (Sigma), seguidos por agitação e incubação a 37°C, por 1h, em banho-maria. Em seguida, 500 µL de solução de isotiocianato de guanidina (Gibco BRL – Life Technologies) a 5 M foram adicionados, tendo sido os tubos agitados manualmente e incubados à temperatura ambiente por 5 a 10 min. As amostras lisadas foram deixadas posteriormente em gelo, durante 10 min, quando então foram adicionados 250 µL de acetato de amônio (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) a 7,5 M. Após agitação manual, os tubos foram deixados mais uma vez por 10 min no gelo. Passado esse tempo, adicionou-se aos tubos 500 µL de solução de clorofórmio/álcool isoamílico 24:1 v/v (Vetec), homogeneizando-se em seguida. As amostras foram centrifugadas a 13.000  $x$  g por 10 min e aproximadamente 800 µL de sua fase aquosa transferida a um novo tubo, acrescentando-se 0,54 volumes (430 µL) de isopropanol gelado (Vetec). Os tubos foram agitados suavemente por inversão durante 1 min para homogeneização e centrifugados por 5 min a 13.000  $x$  g. O DNA precipitado foi lavado 3 vezes com etanol (Vetec) gelado a 70% (a 13.000  $x$  g por 5 min), ressuspense em 50 µL de tampão TE, incubado por 18 h a 37°C, em banho-maria, e estocado a -20°C.

### 3.4.2. PCR multiplex para tipagem do SCCmec de *S. aureus*

A determinação do tipo de SCCmec foi realizada conforme descrito por Oliveira e De Lencastre (2002). O resultado dessa PCR multiplex consiste na amplificação de fragmentos de regiões específicas de cada tipo de SCCmec. Como controle interno da reação, utilizou-se o par de oligonucleotídeos MRS1 e MRS2, responsável pela amplificação do gene *mecA* (SANTOS *et al.*, 1999). Na tabela 4 estão descritas as seqüências dos oligonucleotídeos utilizados, o tamanho dos amplicons e a especificidade para cada tipo de SCCmec em *S. aureus*. A amplificação dos fragmentos foi realizada em um termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradient, Hamburgo, Alemanha), utilizando-se um volume total de 50 µL constituído por 1 µL (cerca de 25 ng em *S. aureus* e 10 ng em *S. epidermidis*) de DNA, tampão da enzima (10mM de Tris-HCl e 25 mM de KCl), 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200µM de cada deoxinucleotídeo trifosfatado (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) (LifeTechnologies, Parsley, Escócia), 1,5 U de *Taq* DNA polimerase (Biotools, Madrid, Espanha), 20 pmoles dos oligonucleotídeos CIF2 F2, CIF2R2, MECI P2 e MECI P3, 25 pmoles dos oligonucleotídeos RIF5 F10, RIF5 R13, pUB110 R1 e pT181 R1, 40 pmoles dos oligonucleotídeos DCS F2, DCS R1, IS431 P4, MRS1 e MRS2 e 10 pmoles dos oligonucleotídeos KDP F1, KDP R1, RIF4 F3 e RIF4 R9 (Tabela 4).

As etapas do ciclo foram: desnaturação inicial a 94<sup>0</sup>C por 4 min, seguida de 30 ciclos de 30 s a 94<sup>0</sup>C, 30 s a 53<sup>0</sup>C e 1 min a 72<sup>0</sup>C, finalizada com um ciclo de extensão a 72<sup>0</sup>C, por 4 min. O produto da reação foi em seguida analisado por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, em TBE (Tris 0,89 M, ácido bórico 0,89 M, EDTA 2,5 mM, pH 8,2). Após corrida de 1h a 80V, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (0,5µg/mL) e a imagem capturada sob luz ultravioleta em um fotodocumentador (Vilber Lourmat, Marne-la-Vallé, França). Como padrão de DNA, utilizou-se o marcador 100 pb DNA ladder (Biotools).

**Tabela 4:** Oligonucleotídeos utilizados e amplicons esperados na PCR para tipagem do SCC*mec* em *S. aureus* segundo Oliveira e De Lencastre, 2002.

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

### 3.4.3. PCR multiplex para tipagem do SCC*mec* de *S. epidermidis*

O protocolo de tipagem de SCC*mec* em *S. epidermidis*, assim como a interpretação dos resultados, foram realizadas segundo Kondo e colaboradores (2007). Esse protocolo consistiu em duas reações de PCR multiplex, sendo a primeira para detecção do tipo de *ccr* na amostra analisada, e a segunda para detecção da classe de gene *mec*. As seqüências dos oligonucleotídeos utilizados e o tamanho dos amplicons estão descritos na Tabela 5. A Tabela 6 descreve as combinações dos tipos de *ccr* com as classes *mec* para determinação do tipo de SCC*mec* em *S. epidermidis*.



**Tabela 5:** Oligonucleotídeos utilizados e amplicons obtidos na PCR para tipagem do SCC*mec* em *S. epidermidis*.

PCR Multiplex 1 (para amplificação do tipo de complexo gênico <i>ccr</i> e e do gene <i>mecA</i> )			
Oligonucleotídeo	Sequencia (5'→3')	Gene	Amplicon (pb)
mA1	TGCTATCCACCCTCAAACAGG	<i>mecA</i>	286
mA2	AACGTTGTAACCACCCCAAGA		
$\alpha$ 1	AACCTATATCATCAATCAGTACGT	<i>ccrA1</i>	695
$\alpha$ 2	TAAAGGCATCAATGCACAAACACT	<i>ccrA2</i>	937
$\alpha$ 3	AGCTCAAAGCAAGCAATAGAAT	<i>ccrA3</i>	1.791
$\beta$ c (reverso dos anteriores)	ATTGCCTTGATAATAGCCITCT	<i>ccrB1, ccrB2, ccrB3</i>	
$\alpha$ 4.2	GTATCAATGCACCAGAACTT	<i>ccrA4</i>	1.287
$\beta$ 4.2	TTGCGACTCTCTTGCGGTTT	<i>ccrB4</i>	
$\gamma$ R	CCTTTATAGACTGGAATTATTCAAATAT	<i>ccrC</i>	518
$\gamma$ F	CGTCTATTACAAGATGTAAAGGATAAT		
PCR Multiplex 2 (para amplificação da classe do complexo gênico <i>mec</i> )			
Oligonucleotídeo	Sequencia (5'→3')	Gene	Amplicon (pb)
mI6	CATAACTTCCCATTCTGCAGATG	<i>mecI</i> (classe A)	1.963
IS7	ATGCTTAATGATAGCATCCGAATG	IS 1272 (classe B)	2.827
IS2 (iS-2)	TGAGGTTATTCAGATATTTTCGATGT	IS 431 (classe C)	804
mA7 (reverso dos anteriores)	ATATACCAAACCCGACAACTACA	<i>mecA</i>	

Kondo *et al.*, 2007.**Tabela 6:** Tipos de SCC*mec* determinados pelas combinações entre os tipos de *ccr* e as classes *mec*.

SCC <i>mec</i>	PCR 1 (tipo <i>ccr</i> )	PCR 2 (classe <i>mec</i> )
Tipo I	<i>ccr 1</i>	<i>mec</i> classe B
Tipo II	<i>ccr 2</i>	<i>mec</i> classe A
Tipo III	<i>ccr 3</i>	<i>mec</i> classe A
Tipo III <i>mercury</i>	<i>ccr 3 + ccrC</i>	<i>mec</i> classe A
Tipo IV	<i>ccr 2</i>	<i>mec</i> classe B
Tipo V	<i>ccr 5 (= ccrC)</i>	<i>mec</i> classe C
Tipo VI	<i>ccr 4</i>	<i>mec</i> classe B
Tipo VII	<i>ccrC2 + ccrC8</i>	<i>mec</i> classe C
Tipo VIII	<i>ccr4</i>	<i>mec</i> classe A

www.staphylococcus.net

Cada reação foi composta por um volume final de 50  $\mu\text{L}$ , contendo tampão de enzima, 3,2 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 200  $\mu\text{M}$  de cada dNTP, 20 pmoles dos oligonucleotídeos, 1,5 U de *Taq* DNA Polimerase e 1  $\mu\text{L}$  de DNA bacteriano.

As etapas da primeira PCR (tipo de *ccr*) consistiram em uma desnaturação inicial a 94°C por 2 min, seguida de 30 ciclos com desnaturação a 94°C por 2 min, anelamento a 60°C por 1 min, extensão a 72°C por 2 min, e extensão final a 72°C por 5 min. A segunda PCR (classe *mec*) teve como única diferença a temperatura de anelamento, que neste caso foi de 57°C. Os produtos de amplificação foram analisados em gel de agarose a 1,5%, em TBE, a 80 V. Após corrida de 1h e 30 min, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e a imagem capturada sob luz ultravioleta em um fotodocumentador (Vilber Lourmat). Como padrões de DNA, utilizou-se os marcadores 1 kb DNA ladder (Invitrogen, Carlsbad, EUA) e 100 pb DNA Ladder (Biotools).

#### **3.4.4. PCR multiplex para detecção dos genes *ermA* e *ermC***

A detecção dos genes de resistência aos antibióticos  $\text{MLS}_B$  foi realizada conforme Lim e colaboradores (2002), com algumas modificações.

Foram utilizados 1 $\mu\text{l}$  de DNA obtido por lise de guanidina, tampão da enzima 10X (10mM de Tris-HCl e 25 mM de KCl), 1,5 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 200 $\mu\text{M}$  de cada dNTP, 1,5 U de *Taq* DNA polimerase, 40 pmoles dos oligonucleotídeos ERM A1, ERM A2, ERM C1 e ERM C2 (Bioneer, Denmark), em volume final de 50  $\mu\text{L}$ .

As etapas do PCR consistiram de desnaturação inicial a 95°C por 5 min, seguida de 35 ciclos de 30 s a 95°C, anelamento de 30 s a 54°C e extensão a 72°C por 1 min; e ciclo de extensão final a 72°C por 5 min. Os produtos das reações foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, em TBE, utilizando-se como padrão de tamanho molecular o marcador de 100 pb DNA ladder (Biotools). Após corrida de 1h a 80V, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e a imagem capturada sob luz ultravioleta em um fotodocumentador (Vilber Lourmat). As sequências dos oligonucleotídeos utilizados, assim como os tamanhos dos fragmentos obtidos estão contidos na Tabela 6.

#### **3.4.5. PCR para detecção do gene *ermB***

A detecção deste gene também seguiu os parâmetros descritos por Lim e colaboradores (2002), com algumas modificações. Foram utilizados 1  $\mu\text{L}$  de DNA, tampão

da enzima (10 mM de Tris-HCl e 25 mM de KCl), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada dNTP, 1 U de *Taq* DNA Polimerase, 40 pmoles dos oligonucleotídeos ERM B1 e ERM B2, em volume final de 25 µL. As etapas de PCR, assim como a visualização do resultado, foram realizadas de forma idêntica à realizada na detecção dos genes *ermA* e *ermC*. A sequência dos oligonucleotídeos utilizados, assim como o tamanho do fragmento obtido está contido na Tabela 6.

### 3.4.6. PCR para detecção do gene *msrA*

A detecção do gene responsável pelo fenótipo de resistência MS foi realizado segundo Lina e colaboradores (1999) com modificações.

Foram utilizados 1 µl de DNA, tampão da enzima (10mM de Tris-HCl e 25 mM de KCl), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada dNTP, 1 U de *Taq* DNA Polimerase, 30 pmoles dos oligonucleotídeos MSRA F e MSRA R (Bioneer) em volume final de 25 µL.

As etapas desse PCR consistiram de desnaturação inicial a 94°C por 5 min, seguida de 25 ciclos de 1 min a 94°C, anelamento de 1 min a 50°C, extensão a 72°C por 90 s e extensão final a 72°C por 5 min. Os produtos das reações foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, em TBE, utilizando-se como padrão de tamanho molecular o marcador de 100 pb DNA ladder (Biotools). Após corrida de 1h a 80V, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (0,5µg/mL) e a imagem foi capturada sob luz ultravioleta em um fotodocumentador (Vilber Lourmat). A sequência dos oligonucleotídeos utilizados, assim como o tamanho do fragmento obtido está contido na Tabela 7.

**Tabela 7:** Oligonucleotídeos utilizados e tamanhos dos amplicons obtidos nas PCRs para detecção de genes de resistência à eritromicina.

Gene	Sequencia (5'→3')	Amplicon (pb)
<i>ermA</i> <sup>a</sup>	GTTCAAGAACAATCAATACAGAG GGATCAGGAAAAGGACATTTTAC	421
<i>ermB</i> <sup>b</sup>	GAAAAGGTACTCAACCAAATA AGTAACGGTACTTAAATTGTTTAC	639
<i>ermC</i> <sup>a</sup>	GCTAATATTGTTTAAATCGTCAATTCC GGATCAGGAAAAGGACATTTTAC	572
<i>msrA</i> <sup>a</sup>	GGCACAATAAGAGTGTTTAAAGG AAGTTATATCATGAATAGATTGTCCTGTT	940

<sup>a</sup>Lina *et al.*, 1999. <sup>b</sup>Lim *et al.*, 2002.

### 3.4.7. Análise do perfil de fragmentação do DNA cromossômico após tratamento com enzima de restrição e separação por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)

A análise do perfil de fragmentação do DNA cromossômico das amostras isoladas nesse estudo foi realizada por PFGE dos fragmentos gerados após tratamento com a enzima de restrição *Sma*I (Vivoni *et al*, 2005). As amostras foram inicialmente cultivadas em ágar-sangue a 35°C, por 24h. Posteriormente, cinco colônias isoladas de *S. aureus* ou dez de *S. epidermidis* foram inoculadas em 3 mL de caldo TSB (Oxoid) e incubadas por aproximadamente 4 h, a 35°C, até atingir a escala 2 de Mc Farland ( $\sim 6,0 \times 10^8$  UFC/mL). A seguir, 1 mL desta suspensão foi transferido para um tubo Eppendorf, centrifugado a  $7.000 \times g$  por 5min, e ressuspensão em 250  $\mu$ L de tampão PIV (NaCl 1M, Tris-HCl 10mM, pH 7,6). A esta suspensão adicionou-se o mesmo volume de agarose de baixo ponto de fusão (“Low Melting Point Agarose”, IBI Technical, New Haven, EUA) a 2%, dissolvida em tampão PIV e mantida a 58°C. Após homogeneização, a agarose foi distribuída em moldes, os quais foram posteriormente mantidos a 4°C por cerca de 10 min para serem cortados em pequenos blocos. A seguir, os blocos de agarose foram colocados em 2 mL de solução de lise EC (Tris-HCl 6mM, NaCl 1M, EDTA 100 mM, 0,5% de Brij 58 e 0,5% lauril sarcosinato de sódio; pH final 7,5), contendo lisozima (Sigma-Aldrich Company) e lisostafina (Sigma-Aldrich Company) em concentrações finais de 0,5 e 0,05 mg/mL, respectivamente, e incubados a 37°C, sob agitação lenta, durante 18 h. Após este período, os tubos foram resfriados a 4°C e a solução substituída por 2 mL de solução ES (EDTA 0,4M pH 9,5, 1% (p/v) de lauril sarcosinato de sódio) contendo 0,1 mg/mL de proteinase K (Sigma-Aldrich Company), sendo essa solução incubada a 50°C, em banho-maria, sob leve agitação, durante 18 h. A digestão do DNA cromossômico foi realizada utilizando-se somente um bloco de agarose, lavado cinco vezes em tampão TE a 37°C, em banho-maria, sendo as quatro primeiras lavagens de 1 h cada e a última de 18 h. Após este processo, o bloco de agarose foi transferido para uma solução contendo 250  $\mu$ L do tampão específico da enzima de restrição *Sma*I (New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA) e incubado a 25°C, por 4 h. Em seguida, o bloco de agarose foi novamente transferido para um novo tampão da enzima de restrição contendo 20 U da enzima *Sma*I e incubado a 25°C durante 18 h. Posteriormente, a solução contendo a enzima foi retirada e o bloco de agarose fundido a 70° e então aplicado no gel de agarose (Invitrogen) a 1% feito em tampão TBE 0,5x. O gel foi submetido a eletroforese em campo pulsado (CHEF DR III, Bio-Rad), utilizando um tempo de pulso crescente de 1 a 35 s, durante 21 h, a 6 V/cm, 13°C, com ângulo de 120°. Essas condições são iguais tanto para a espécie *S. aureus* quanto para *S.*

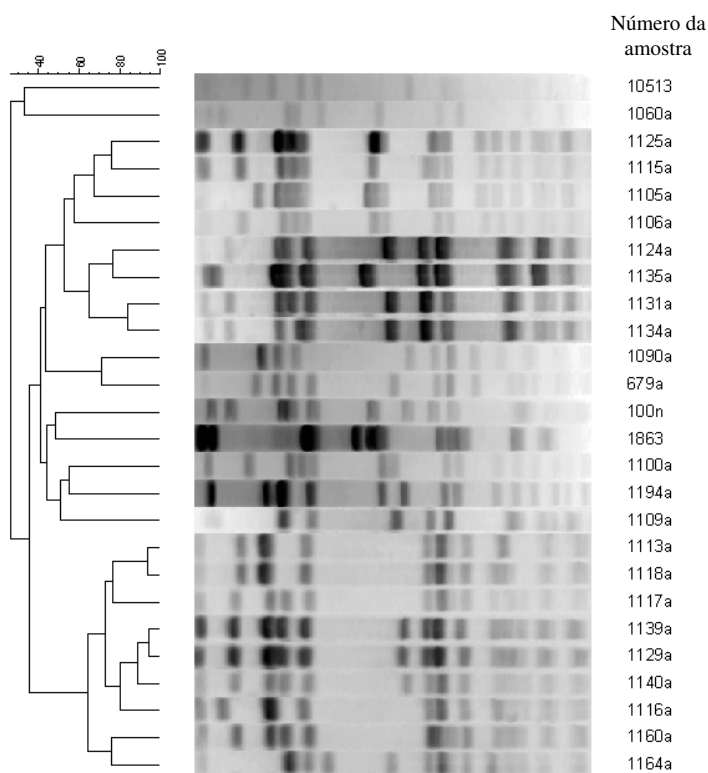
*epidermidis*. Após a corrida, o gel foi corado com brometo de etídio (0,5µg/mL), por 40 min. Posteriormente, a imagem foi capturada sob luz ultravioleta em um fotodocumentador (Vilber Lourmat). Como padrão de tamanho molecular de DNA, utilizou-se o marcador 50-1.000 Kb Lambda Ladder PFGE Marker (New England BioLabs).

O padrão dos fragmentos foi analisado através da comparação visual entre as amostras e classificados de acordo com os critérios de Tenover e colaboradores (1995), além de ter sido realizada uma análise automatizada utilizando-se o programa Bionumerics, versão 6.0 (Applied Maths, Bélgica), usando-se o coeficiente Dice de similaridade e o método de “Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages” (UPGMA) para análise dos agrupamentos.

## 4 - RESULTADOS

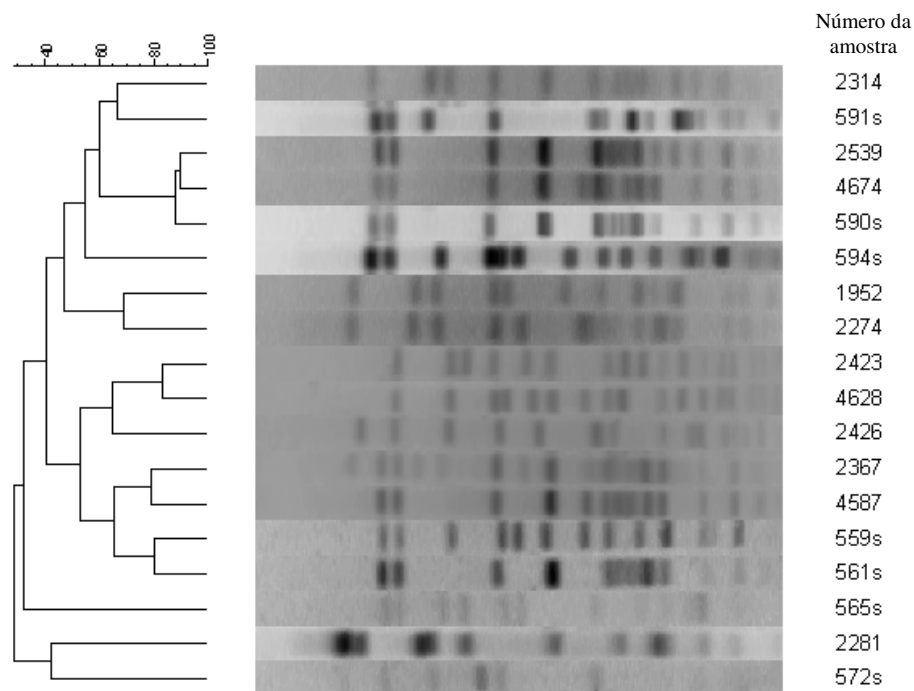
### 4.1. Caracterização genômica das amostras de *S. aureus* e *S. epidermidis* utilizadas no estudo

No presente estudo foram selecionadas 84 amostras que apresentavam, além de resistência à eritromicina, diversidade genômica, com diferença de pelo menos uma banda entre si. A Figura 4 ilustra perfis de fragmentação representativos de 26 das 50 amostras de *S. aureus* estudadas. Entre elas se encontram amostras resistentes e sensíveis à metilina.



**Figura 4:** Imagem representativa de perfis de fragmentação genômica de 26 amostras de *S. aureus*. Amostras MSSA: 10513, 1124a, 1135a, 1131a, 1863, 1194a, 1109a; amostras com SCCmec tipo III: 1090a, 679a, 1113a, 1118a, 1117a, 1139a, 1129a, 1140a, 1116a, 1160a, 1164a; amostras com SCCmec tipo IV: 1060a, 1125a, 1115a, 1105a, 1106a, 1134a, 100n, 1100a.

A Figura 5 representa os padrões de fragmentação representativos de 18 amostras de *S. epidermidis*. Entre elas se encontram amostras sensíveis e resistentes à metilina.



**Figura 5:** Imagem representativa de perfis de fragmentação genômica de 18 amostras de *S. epidermidis*. Amostra MSSE: 2274; amostras com SCCmec tipo II: 591s, 2423; amostras com SCCmec tipo III: 4628, 572s; amostras com SCCmec tipo IV: 2539, 4674, 590s, 594s, 2426, 2367, 4587, 559s, 561s, 2281; amostra com SCCmec tipo V: 565s; amostras com SCCmec não tipável: 2314, 1952.

#### 4.2. Características gerais das amostras estafilocócicas analisadas e relação com os tipos de SCCmec

As 84 amostras selecionadas foram discriminadas por espécie (*S. aureus* e *S. epidermidis*), local de isolamento e grupo de paciente envolvido (neonatos e não-neonatos). A tabela 8 apresenta as 39 amostras de *S. aureus* resistentes à metilina (MRSA) analisadas no presente estudo, sendo 34 (87%) de não-neonatos. Entre essas amostras, 57% eram de secreção cutânea e de prótese ortopédica. A análise do tipo de SCCmec mostrou que 34 (87%) das amostras eram dos tipos III e IV. Todas as 4 amostras de neonatos eram do SCCmec tipo IV, sendo 3 delas de sangue.

**Tabela 8:** Distribuição de 39 amostras de MRSA isoladas de não-neonatos e neonatos de acordo com o local de isolamento e o tipo de SCCmec detectado

Pacientes (n)	Local de isolamento	Tipos de SCCmec			
		II (5)	III (17)	IV (17)	Total (%)
Não-neonatos (35)	Prótese Ortopédica	–	6	6	12 (30,8)
	Secreção Cutânea	2	5	1	8 (20,5)
	Secreção de TR	3	1	2	6 (15,4)
	Sangue	–	3	2	5 (12,8)
	Urina	–	–	2	2 (5,1)
	Líquor	–	1	–	1 (2,6)
	Narina	–	1	–	1 (2,6)
Neonatos (4)	Sangue	–	–	3	3 (7,6)
	Narina	–	–	1	1 (2,6)
Total		5	17	17	39 (100)

MRSA = *S. aureus* resistente à meticilina; (n) = n° de amostras; TR- trato respiratório.

Dentre as 32 amostras de *S. epidermidis* resistentes à meticilina (MRSE), 20 (62,5%) eram de neonatos, sendo 95% destas de sangue. Entre as 12 amostras de não-neonatos, 66,6% eram de sangue e de cateter vascular. A análise do tipo de SCCmec mostrou que a maioria das amostras MRSE (43,8%) era do tipo IV, apesar de 37,5% das amostras de neonatos ser não-tipável (Tabela 9). As 13 amostras sensíveis à meticilina, 11 de *S. aureus* e duas de *S. epidermidis*, foram isoladas principalmente de prótese ortopédica (61,5%) e sangue (30,8%) (Tabela 10).

**Tabela 9:** Distribuição de 32 amostras de MRSE isoladas de não-neonatos e neonatos de acordo com o local de isolamento e o tipo de SCCmec detectado

Pacientes (n)	Local de isolamento	Tipos de SCCmec					
		II (2)	III (3)	IV (14)	V (1)	NT (12)	Total (%)
Não-neonatos (12)	Cateter Vascular	–	–	3	–	1	4 (12,5)
	Sangue	–	1	3	–	–	4 (12,5)
	Líquido Pericárdico	1	–	–	–	–	1 (3,1)
	Prótese Ortopédica	–	–	1	–	–	1 (3,1)
	Narina	–	–	1	–	–	1 (3,1)
	Urina	–	–	–	–	1	1 (3,1)
Neonatos (20)	Sangue	1	2	6	1	9	19 (59,5)
	Cateter Vascular	–	–	–	–	1	1 (3,1)
Total		2	3	14	1	12	32 (100)

MRSE = *S. epidermidis* resistente à meticilina; NT = não tipável; (n) = n° de amostras.



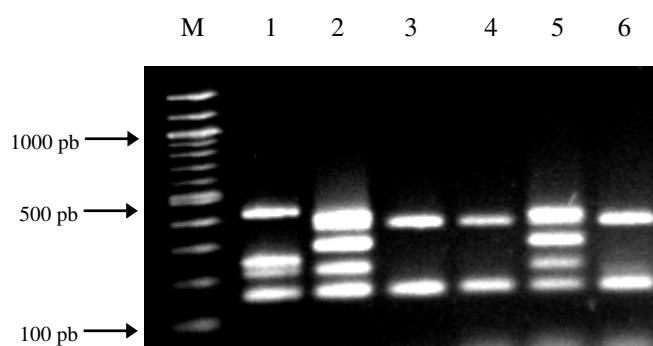
**Tabela 10:** Distribuição de 13 amostras de *S. aureus* e *S. epidermidis* sensíveis à metilina de acordo com o local de isolamento.

Espécie (n)	Local de isolamento	Total (%)
<i>S. aureus</i> (11)	Prótese Ortopédica	8 (61,5)
	Sangue	3 (23,1)
<i>S. epidermidis</i> (2)	Sangue	1 (7,7)
	Tecido Ósseo	1 (7,7)

(n) = n° de amostras.

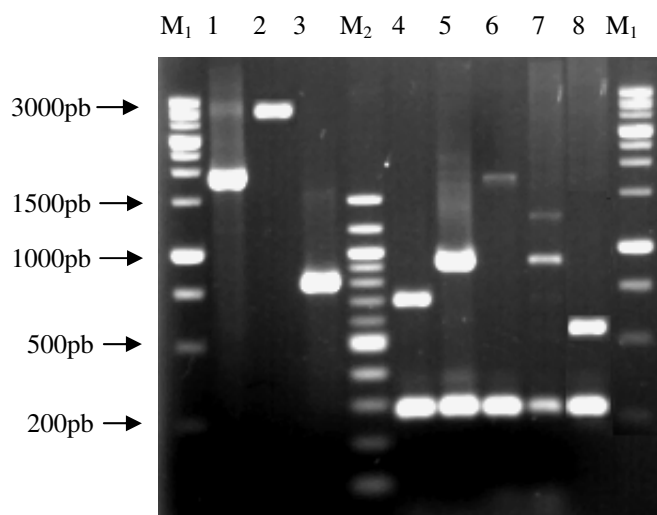
### 4.3. Tipagem do cassete estafilocócico *mec* (SCC*mec*) em *S. aureus* (MRSA) e *S. epidermidis* (MRSE)

A Figura 6 mostra a eletroforese em gel de agarose das sequências gênicas que codificam os tipos de SCC*mec* detectados por PCR multiplex em amostras de MRSA. A figura mostra a presença de segmentos gênicos compatíveis com 3 tipos de cassete *mec*: II, III e IV.



**Figura 6:** Eletroforese em gel de agarose das sequências gênicas que codificam os tipos de SCC*mec* em amostras clínicas de *S. aureus*. M – padrão de tamanho molecular de 100 pb ladder; Linha 1 – SCC*mec* tipo II; Linha 2 – SCC*mec* tipo III; Linha 3 – SCC*mec* tipo IV; Linhas 4 e 6 – amostras contendo SCC*mec* tipo IV; Linha 5 - amostra contendo SCC*mec* tipo III (OLIVEIRA & DE LENCASTRE, 2002).

A Figura 7 mostra a eletroforese em gel de agarose das sequências gênicas que codificam os tipos de SCC*mec* detectados por PCR multiplex, M-PCR 1 (detecção do tipo de *ccr*) e M-PCR 2 (detecção da classe do gene *mec*) em *S. epidermidis*. A análise mostrou a presença de segmentos gênicos compatíveis com os tipos II, III, IV e V de cassete *mec* (Tabela 9). Em 12 (37,5%) amostras não foi possível determinar o tipo de SCC*mec* porque essas apresentavam mais de um tipo de gene *ccr* ou ausência da classe do gene *mec*.



**Figura 7:** Eletroforese em gel de agarose das sequências gênicas que codificam os tipos de SCC*mec* em amostras de *S. epidermidis*. M<sub>1</sub> – padrão de tamanho molecular de 1Kb ladder; M<sub>2</sub> – padrão de tamanho molecular de 100 pb ladder; Linha 1 – *mec* classe A (1963 pb); Linha 2 – *mec* classe B (2827 pb); Linha 3 – *mec* classe C (804 pb); Linha 4 – *ccr 1* (695 pb); Linha 5 – *ccr 2* (937 pb); Linha 6 – *ccr 3* (1791 pb); Linha 7 – *ccr 2* e *ccr 4* (1287pb); Linha 8 - *ccr 5* ou C (518 pb); Linhas 4 a 8 – fragmentos de 286 pb correspondentes ao gene *mecA* (KONDO *et al.*, 2007).

A tabela 11 mostra os resultados encontrados em relação a presença de genes *ccr* e da classe do gene *mec* para 12 amostras não-tipáveis de MRSE, de acordo com Kondo e colaboradores (2007). Duas amostras do grupo dos não-neonatos apresentaram apenas o gene *mecA*, enquanto entre 10 amostras de neonatos, quatro apresentaram três genes *ccr* diferentes, ao passo que em seis amostras detectou-se dois genes *ccr* distintos.

**Tabela 11:** Perfis das 12 amostras de *S. epidermidis* resistentes à meticilina que foram não-tipáveis pelos métodos utilizados.

Pacientes	Nº de amostras	M-PCR <sub>1</sub>						M-PCR <sub>2</sub>		
		<i>mecA</i>	<i>ccr1</i>	<i>ccr2</i>	<i>ccr3</i>	<i>ccr4</i>	<i>ccr5</i>	<i>mec</i> classe A	<i>mec</i> classe B	<i>mec</i> classe C
Não neonatos (n=2)	2	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Neonatos (n=10)	2	+	-	-	+	+	+	+	-	-
	1	+	-	+	-	+	-	-	+	-
	2	+	-	+	-	+	+	-	-	+
	1	+	-	-	-	+	+	+	-	-
	1	+	-	+	-	+	-	+	-	-
	3	+	-	-	-	+	+	-	-	+

M-PCR<sub>1</sub>- PCR multiplex para detecção dos genes *mecA*, *ccr1*, *ccr2*, *ccr3*, *ccr4* e *ccr5*; M-PCR<sub>2</sub>- PCR multiplex para detecção dos genes *mec* classes A, B ou C.

#### **4.4. Associação entre tipos de SCCmec e CMI de oxacilina, eritromicina e clindamicina**

A tabela 12 mostra a relação entre tipos de SCCmec e CMI para oxacilina, eritromicina e clindamicina em 50 amostras de *S. aureus* analisadas. O grupo de amostras MRSA isoladas de não-neonatos apresentou altos índices de resistência à eritromicina e clindamicina. Apenas algumas poucas amostras com SCCmec IV foram mais sensíveis, similar ao observado para amostras de neonatos, todas com SCCmec tipo IV, que foram sensíveis à clindamicina e apresentaram valores de CMI<sub>90</sub> para oxacilina de 16µg/mL e para eritromicina de 32µg/mL. As 11 amostras de MSSA também foram sensíveis à clindamicina, mas a CMI<sub>90</sub> para eritromicina foi  $\geq 256\mu\text{g/mL}$ .

A tabela 13 mostra a relação entre os tipos de SCCmec e suas respectivas CMIs para oxacilina, eritromicina e clindamicina entre as 34 amostras de *S. epidermidis* analisadas. Amostras de não-neonatos foram em geral e independente do tipo de SCCmec mais resistentes aos antimicrobianos eritromicina e clindamicina do que amostras de neonatos. As CMI<sub>50</sub> para clindamicina e eritromicina em amostras tipo IV de neonatos foram as mais baixas, 32 e  $\leq 0,25\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Em relação à oxacilina, os valores de CMI foram baixos para todas as amostras.

**Tabela 12:** CMI<sub>50</sub> e CMI<sub>90</sub> para oxacilina, eritromicina e clindamicina em 50 amostras de *S. aureus* sensíveis e resistentes à metilina e sua relação com os tipos de SCCmec.

Tipo de amostra (n)	Tipos de SCCmec (n)	Oxacilina (µg/mL)			Eritromicina (µg/mL)			Clindamicina (µg/mL)		
		Intervalo	CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>	Intervalo	CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>	Intervalo	CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>
MRSA (39)										
Não-neonatos (35)	II (5)	128 - ≥256	128	≥256	≥256	≥256	≥256	≥256	≥256	≥256
	III (17)	≥256	≥256	≥256	≥256	≥256	≥256	≤0,25 - ≥256	≥256	≥256
	IV (13)	8 - ≥256	32	128	2 - ≥256	≥256	≥256	≤0,25 - ≥256	128	≥256
Neonatos (4)	II (0)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	III (0)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	IV (4)	1 - 16	16	16	8 - 32	8	32	≤0,25	≤0,25	≤0,25
MSSA (11)	-	≤0,25 - 1	0,5	1	1 - ≥256	16	≥256	≤0,25	≤0,25	≤0,25

MRSA = *S. aureus* resistente à metilina; MSSA = *S. aureus* sensível à metilina; (n) = n° de amostras. CMI para eritromicina (µg/mL): ≤0,5 (S), 1-4 (I), ≥ 8 (R); CMI para clindamicina (µg/mL): ≤0,5 (S), 1-2 (I), ≥ 4 (R); CMI para oxacilina (µg/mL) em *S. aureus*: ≤2 (S), ≥4 (R); CMI para oxacilina (µg/mL) em *S. epidermidis*: ≤0,25 (S), ≥0,5 (R). (S) = sensibilidade; (I) = intermediária; (R) = resistência (CLSI, 2009c).

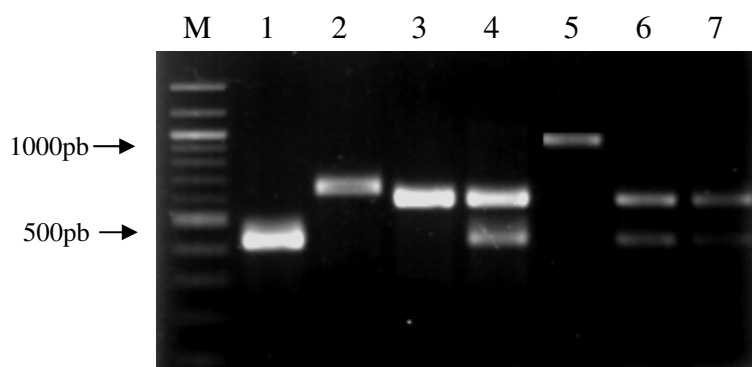
**Tabela 13:** CMI<sub>50</sub> e CMI<sub>90</sub> para oxacilina, eritromicina e clindamicina em 34 amostras de *S. epidermidis* sensíveis e resistentes à metilina e sua relação com os tipos de SCCmec.

Tipo de amostra (n)	Oxacilina (µg/mL)				Eritromicina (µg/mL)			Clindamicina (µg/mL)		
	SCCmec (n)	Intervalo	CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>	Intervalo	CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>	Intervalo	CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>
<b>MRSE (32)</b>										
Não-neonatos (12)	II (1)	8	8	8	≥256	≥256	≥256	≥256	≥256	≥256
	III (1)	8	8	8	≥256	≥256	≥256	≥256	≥256	≥256
	IV (7)	1 - 64	2	8	32 - ≥256	≥256	≥256	0,5 - ≥256	≥256	≥256
	V (1)	2	2	2	32	32	32	≤0,25	≤0,25	≤0,25
	NT (2)	8	8	8	≥256	≥256	≥256	≤0,25 - ≥256	≤0,25	≥256
Neonatos (20)	II (1)	4	4	4	16	16	16	≤0,25	≤0,25	≤0,25
	III (2)	64 - 128	64	128	64 - 128	64	128	≥256	≥256	≥256
	IV (6)	1 - 64	1	2	4 - ≥256	32	≥256	≤0,25 - ≥256	≤0,25	128
	V (1)	1	1	1	≥256	≥256	≥256	≤0,25	≤0,25	≤0,25
	NT (10)	1 - 8	2	8	4 - ≥256	≥256	≥256	≤0,25 - ≥256	0,5	≥256
<b>MSSE (2)</b>	-	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25 - ≥256	≤0,25	≥256	≤0,25 - ≥256	≤0,25	≥256

MRSE = *S. epidermidis* resistente à metilina; MSSE = *S. epidermidis* sensível à metilina; NT = não-tipável; (n) = n° de amostras. CMI<sub>50</sub> e CMI<sub>90</sub> = concentração mínima capaz de inibir o crescimento de 50% e 90% da população bacteriana, respectivamente. CMI para eritromicina (µg/mL): ≤0,5 (S), 1-4 (I), ≥ 8 (R); CMI para clindamicina (µg/mL): ≤0,5 (S), 1-2 (I), ≥ 4 (R); CMI para oxacilina (µg/mL) em *S. epidermidis*: ≤0,25 (S), ≥0,5 (R). (S) = sensibilidade; (I) = intermediária; (R) = resistência (CLSI, 2009c).

#### 4.5. Presença de genes de resistência à eritromicina e relação com tipos de SCCmec em amostras de *S. aureus* e *S. epidermidis*

A Figura 8 ilustra a eletroforese em gel de agarose de fragmentos correspondentes aos genes de resistência à eritromicina (*erm* e *msrA*) detectados em amostras de *S. aureus* e *S. epidermidis*.



**Figura 8:** Eletroforese em gel de agarose dos genes de resistência à eritromicina em amostras representativas de *S. aureus* e *S. epidermidis*. M - padrão de tamanho molecular (100 pb ladder); Linha 1 - gene *ermA* (421 pb); Linha 2 – gene *ermB* (639 pb); Linha 3 – gene *ermC* (572 pb); Linha 5– gene *msrA* (940 pb); Linhas 4, 6 e 7- genes *ermA* e *ermC* simultaneamente.

A tabela 14 mostra a relação entre a presença de genes de resistência à eritromicina e os tipos de SCCmec em 50 amostras de *S. aureus*. O gene *ermA* foi detectado, isoladamente ou em associação, em 62% das amostras. Entre as amostras tipo III, 88,2% apresentaram o gene *ermA*. Todas as amostras tipo II do estudo também apresentaram esse gene. O gene *ermC* foi o segundo mais encontrado (54%), sendo mais detectado entre amostras tipo IV (58,8%) e em todas amostras sensíveis à metilina.

**Tabela 14:** Associação entre genes de resistência à eritromicina e tipos de SCCmec em 50 amostras de *S. aureus*.

Genes de resistência à eritromicina	MRSA Não-Neonatos (n = 35)					MRSA Neonatos (n = 4)					MSSA (n = 11)	Total (%)
	Tipos de SCCmec					Tipos de SCCmec						
	II	III	IV	V	NT	II	III	IV	V	NT		
<i>ermA</i>	5	15	1	-	-	-	-	-	-	-	-	21 (42)
<i>ermC</i>	-	2	9	-	-	-	-	1	-	-	4	16 (32)
<i>msrA</i>	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	2 (4)
<i>ermA+ermC</i>	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	6	9 (18)
<i>ermB+ermC</i>	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1 (2)
<i>ermA+ermB+ermC</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1 (2)
<b>Total</b>	<b>5</b>	<b>17</b>	<b>13</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>4</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>11</b>	<b>50 (100)</b>

MRSA = *S. aureus* resistente à metilina; MSSA = *S. aureus* sensível à metilina.

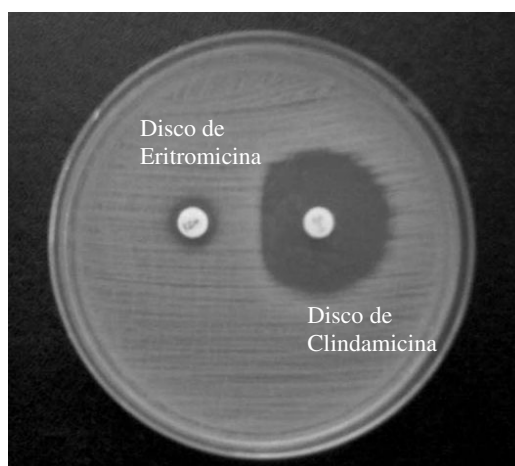
Entre as 34 amostras de *S. epidermidis* foi verificada a presença do gene *ermC* em amostras com SCCmec de diferentes tipos (Tabela 15). Esse gene foi detectado, isoladamente ou em associação, em 82,4% das amostras de *S. epidermidis*. Esse gene foi detectado entre amostras com SCCmec tipo IV (76,9%) e não tipáveis (83,3%). O gene *msrA*, com prevalência de 17,6%, foi detectado somente entre amostras de neonatos.

**Tabela 15:** Associação entre genes de resistência à eritromicina e tipos de SCCmec em 34 amostras de *S. epidermidis*.

Genes de resistência à eritromicina	MRSE Não-Neonatos (12)					MRSE Neonatos (20)					MSSE (n = 2)	Total (%)
	Tipos de SCCmec					Tipos de SCCmec						
	II	III	IV	V	NT	II	III	IV	V	NT		
<i>ermA</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1 (2,9)
<i>ermC</i>	1	1	7	-	2	-	2	3	1	8	1	26 (76,6)
<i>msrA</i>	-	-	-	-	-	1	-	2	-	2	-	5 (14,7)
<i>ermA+ermC</i>	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1 (2,9)
<i>msrA+ermC</i>	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1 (2,9)
<b>Total</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>7</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>6</b>	<b>1</b>	<b>10</b>	<b>2</b>	<b>34 (100)</b>

MRSE = *S. epidermidis* resistente à meticilina; MSSE = *S. epidermidis* sensível à meticilina

A Figura 9 mostra o fenótipo de resistência a clindamicina induzida pela eritromicina (iMLS<sub>B</sub>) em *S. epidermidis* detectada através do teste D.



**Figura 9:** Resistência à clindamicina induzida por eritromicina (Teste D) observada em uma amostra clínica de *S. epidermidis*.

A tabela 16 relaciona as CMI's de oxacilina, eritromicina e clindamicina com a presença dos genes de resistência à eritromicina em amostras de *S. aureus* e *S. epidermidis*. Observa-se uma prevalência dos genes *ermA* (42%) e *ermC* (32%), isoladamente, entre amostras de *S. aureus* apresentando CMI's  $\geq 256 \mu\text{g/mL}$  para todas os antimicrobianos testados. A relação entre os genes *ermA* e *ermC* foi detectada entre amostras com CMI's relativamente baixos para oxacilina e eritromicina e sensibilidade à clindamicina. Entre as 34 amostras de *S. epidermidis* verificou-se uma prevalência entre o gene *ermC* com CMI's altas para a eritromicina e clindamicina. O gene *msrA* esteve relacionado com CMI mais baixa para eritromicina (CMI =  $32 \mu\text{g/mL}$ ) e sensibilidade a clindamicina.

A tabela 17 apresenta uma associação entre os fenótipos  $\text{MS}_B$  (resistência apenas a macrolídeos e estreptograminas) e  $\text{MLS}_B$  (macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas B) e genes de resistência à eritromicina em amostras de *S. aureus*. O fenótipo  $\text{MLS}_B$  constitutivo foi verificado em 86% das amostras e o fenótipo induzível em 10% das amostras, com predominância do gene *ermA* seguido do gene *ermC*. A resistência a clindamicina foi de 79,5% entre amostras de MRSA e 36,4% entre amostras de MSSA.



**Tabela 16:** Intervalo, CMI<sub>50</sub> e CMI<sub>90</sub> para oxacilina, eritromicina e clindamicina em 50 amostras de *S. aureus* e 34 amostras de *S. epidermidis* sensíveis e resistentes à metilina em relação aos genes de resistência à eritromicina.

Espécie /Genes de resistência (número de amostras)	Oxacilina (µg/mL)			Eritromicina (µg/mL)			Clindamicina (µg/mL)		
	Intervalo	CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>	Intervalo	CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>	Intervalo	CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>
<i>S. aureus</i>									
<i>ermA</i> (21)	64 - ≥256	≥256	≥256	≥256	≥256	≥256	≤0,25 - ≥256	≥256	≥256
<i>ermC</i> (16)	1 - ≥256	64	≥256	1 - ≥256	≥256	≥256	≤0,25 - ≥256	≥256	≥256
<i>msrA</i> (2)	8 - 32	8	32	2 - 4	2	4	≤0,25	≤0,25	≤0,25
<i>ermA+ermC</i> (9)	0,5 - 16	16	16	1 - 8	8	8	≤0,25	≤0,25	≤0,25
<i>ermB+ermC</i> (1)	16	16	16	≥256	≥256	≥256	≥256	≥256	≥256
<i>ermA+ermB+ermC</i> (1)	≤0,25	≤0,25	≤0,25	16	16	16	≤0,25	≤0,25	≤0,25
<i>S. epidermidis</i>									
<i>ermA</i> (1)	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25
<i>ermC</i> (26)	≤0,25 - 128	2	64	32 - ≥256	≥256	≥256	≤0,25 - ≥256	≥256	≥256
<i>msrA</i> (7)	1 - 8	4	8	4 - ≥256	8	32	≤0,25	≤0,25	≤0,25
<i>msrA+ermC</i> (1)	1	1	1	4	4	4	≤0,25	≤0,25	≤0,25

**Tabela 17:** Associação entre os fenótipos MS<sub>B</sub> / MLS<sub>B</sub> e genes de resistência à eritromicina em amostras de *S. aureus*.

Tipo de amostra (N total=50)	Fenótipo	<i>ermA</i>	<i>ermC</i>	<i>ermA+C</i>	<i>ermB+C</i>	<i>ermA+B+C</i>	<i>msrA</i>	Total (%)
MRSA Não-neonatos (35)	MS <sub>B</sub>	-	-	-	-	-	2	2 (5,7)
	cMLS <sub>B</sub>	20	10	-	1	-	-	31 (88,6)
	iMLS <sub>B</sub>	1	1	-	-	-	-	2 (5,7)
	Resistência à clindamicina	20	10	-	1	-	-	31 (88,6)
MRSA Neonatos (4)	MS <sub>B</sub>	-	-	-	-	-	-	-
	cMLS <sub>B</sub>	-	1	3	-	-	-	4 (100)
	iMLS <sub>B</sub>	-	-	-	-	-	-	-
	Resistência à clindamicina	-	-	-	-	-	-	-
MSSA (11)	MS <sub>B</sub>	-	-	-	-	-	-	-
	cMLS <sub>B</sub>	-	3	4	-	1	-	8 (72,7)
	iMLS <sub>B</sub>	-	1	2	-	-	-	3 (27,3)
	Resistência à clindamicina	-	1	3	-	-	-	4 (36,4)

Fenótipo MS<sub>B</sub> = resistência a macrolídeos e estreptograminas B produzida pelo gene *msrA*; fenótipo MLS<sub>B</sub> = resistência a macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas B produzidas pelos genes *erm*; cMLS<sub>B</sub> = resistência constitutiva à clindamicina; iMLS<sub>B</sub> = resistência induzida à clindamicina; MRSA = *S. aureus* resistente à metilina; MSSA = *S. aureus* sensível à metilina.

A tabela 18 apresenta a relação entre os fenótipos MS<sub>B</sub> e MLS<sub>B</sub> com genes de resistência à eritromicina em amostras de *S. epidermidis*. O fenótipo MLS<sub>B</sub> constitutivo foi observado em 61,7% das amostras e o induzível em 23,5%, com predominância do gene *ermC*. A resistência à clindamicina foi de 70,6% entre amostras de MRSE e de 50% entre amostras de MSSE.

**Tabela 18:** Associação entre os fenótipos MS<sub>B</sub> / MLS<sub>B</sub> e genes de resistência à eritromicina entre amostras de *S. epidermidis*.

Tipo de amostra (N total=34)	Fenótipo	<i>ermA</i>	<i>ermC</i>	<i>ermA+C</i>	<i>msrA+ermC</i>	<i>msrA</i>	Total (%)
MRSE Não-neonatos (12)	MS <sub>B</sub>	-	-	-	-	-	-
	cMLS <sub>B</sub>	-	9	1	-	-	10 (83,3)
	iMLS <sub>B</sub>	-	2	-	-	-	2 (16,7)
	Resistência à clindamicina	-	11	-	-	-	11 (91,7)
MRSE Neonatos (20)	MS <sub>B</sub>	-	-	-	-	5	5 (25)
	cMLS <sub>B</sub>	-	8	-	1	-	9 (45)
	iMLS <sub>B</sub>	-	6	-	-	-	6 (30)
	Resistência à clindamicina	-	12	-	-	-	12 (60)
MSSE (2)	MS <sub>B</sub>	-	-	-	-	-	-
	cMLS <sub>B</sub>	1	1	-	-	-	2 (100)
	iMLS <sub>B</sub>	-	-	-	-	-	0
	Resistência à clindamicina	-	1	-	-	-	1 (50)

Fenótipo MS<sub>B</sub> = resistência a macrolídeos e estreptograminas B produzida pelo gene *msrA*; fenótipo MLS<sub>B</sub> = resistência a macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas B produzidas pelos genes *erm*; cMLS<sub>B</sub> = resistência constitutiva à clindamicina; iMLS<sub>B</sub> = resistência induzida à clindamicina; MRSE = *S. epidermidis* resistente à meticilina; MSSE = *S. epidermidis* sensível à meticilina

## 5 - DISCUSSÃO

---

Os *Staphylococcus* spp. são habitantes comuns da microbiota humana e responsáveis por cerca de um terço das IRAS (SADER *et al.*, 2004). As espécies *S. aureus* e *S. epidermidis* são as de maior prevalência nessas infecções (CASEY *et al.*, 2007), e têm adquirido resistência a diversas classes de antimicrobianos (SADER *et al.*, 2004), o que torna extremamente relevante a realização de estudos que auxiliem na compreensão desses mecanismos.

No presente estudo, foram avaliadas amostras de *S. aureus* e de *S. epidermidis* resistentes à eritromicina, isoladas no período de junho de 2004 a junho de 2009, de diferentes espécimes clínicos e de dois tipos de pacientes, neonatos e não-neonatos. Em amostras resistentes à meticilina, foram também detectados os tipos de cassetes *mec* (SCC*mec*) presentes e, em seguida avaliada sua relação com a resistência fenotípica e molecular à eritromicina e à clindamicina. A análise de amostras estafilocócicas diferentes entre si, nas duas espécies avaliadas, foi determinada pela utilização da técnica de PFGE, que permitiu selecionar pulsotipos diferentes. Portanto, apesar do número reduzido de amostras, foi possível avaliar amostras únicas, com perfis genômicos não duplicados.

Em um total de 84 amostras selecionadas, 50 foram de *S. aureus* e 34 de *S. epidermidis*. Entre as 39 amostras de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA), o maior percentual (89,7%) era de não-neonatos, sendo 57% de secreção cutânea e de prótese ortopédica. No grupo dos neonatos havia apenas quatro amostras MRSA, confirmando que amostras de *S. aureus* de neonatos costumam ser sensíveis à maioria dos antimicrobianos. Segundo Graham e colaboradores (2002), MSSA é geralmente considerado um patógeno endêmico em UTINs. Quanto ao cassete *mec*, verificamos que os tipos III e IV foram os mais detectados (87%) em amostras MRSA, sendo que, de neonatos só havia amostras tipo IV. Cepas hospitalares, em geral, apresentam os tipos I, II ou III, diferentes daquelas de origem comunitária que apresentam, normalmente, os tipos IV ou V (DIETRICH *et al.*, 2004, KILLIC *et al.*, 2006, UDO *et al.*, 2008). Entretanto, esse quadro vem se alterando na última década, sendo cada vez mais comum o isolamento de amostras com SCC*mec* IV no ambiente hospitalar (WANNET *et al.*, 2005; FOSSUM & BUKHOLM, 2006; UDO *et al.*, 2008; SCHUENCK *et al.*, 2009). O tamanho reduzido do SCC*mec* dessas amostras emergentes pode conferir vantagem

adaptativa a elas. Tal característica auxiliaria em sua disseminação (OKUMA *et al.*, 2002), inclusive para amostras de MSSA (ROBINSON & ENRIGHT, 2003), as quais normalmente colonizam regiões, como cordão umbilical em neonatos, narina e pele.

Os SCN também têm se mostrado patógenos relevantes em IRAS, sobretudo em infecções relacionadas a dispositivos médicos (ARNASON *et al.*, 2008; GARLAND *et al.*, 2008). Sua presença tem sido relevante em bacteriemias neonatais, com prevalência da espécie *S. epidermidis* (GRAY *et al.*, 2007; HIRA *et al.*, 2007; MYREYA *et al.*, 2007). No presente estudo foram avaliadas 34 amostras de *S. epidermidis*, sendo 94% resistentes à meticilina (MRSE). Destas, a maioria (62,5%) era de neonatos, sendo 95% de sangue, espécime clínico de bacteriemias, o tipo de infecção mais avaliado em neonatos (COUTO *et al.*, 2007; TÁVORA *et al.*, 2008). O tipo de SCCmec mais encontrado entre as amostras MRSE foi o IV (43,8%), seguido de 37,5% de amostras não tipáveis. Os poucos estudos que analisaram amostras de SCN, em relação ao seu cassete de resistência, relataram a predominância do SCCmec IV, com taxas de até 41%, apesar de amostras não tipáveis também terem sido comuns (HANSEN & SOLLID, 2007; MIRAGAIA *et al.*, 2007; MACHADO *et al.*, 2007; RUPPÉ *et al.*, 2008; IBRAHEM *et al.*, 2009). O SCCmec tipo IV se mostra como um problema particular, visto que não impõe um custo energético extra, além de poder ser disseminado mesmo na ausência de pressão seletiva de antibióticos (OTTO, 2009). Um estudo desenvolvido por Ruppé e colaboradores (2008) mostrou que, dentre 96 amostras de SCN, 29% apresentavam o cassete tipo IV e 26% o tipo V. Esse mesmo trabalho mostrou que o SCCmec tipo IV era predominante em *S. epidermidis*, enquanto o SCCmec tipo V era detectado sobretudo em *S. haemolyticus*, sugerindo que estas espécies sejam os principais reservatórios dos tipos IV e V, respectivamente.

Amostras não tipáveis têm sido comuns entre os SCN (HANSEN *et al.*, 2004; RUPPÉ *et al.*, 2008). Ruppé e colaboradores, em 2008, detectaram 43,7% de amostras não tipáveis entre SCN. Na Finlândia, Ibrahim e colaboradores (2009) determinaram o tipo de SCCmec em 61 amostras hospitalares de SCN isoladas de colonização nasal, pela técnica de Oliveira e De Lencastre (2002), utilizada para *S. aureus*. Os autores observaram que 90% dessas amostras eram não tipáveis. Em contrapartida, quando esses mesmos autores compararam os resultados com aqueles obtidos com a técnica descrita por Kondo e colaboradores (2007), somente 38% das amostras foram não tipáveis. No presente estudo, optamos por utilizar as duas técnicas para a tipagem do SCCmec, o que nos permitiu detectar 12 (37,5%) amostras não tipáveis entre as 32

amostras de MRSE analisadas, valor próximo ao encontrado por Ibrahem e colaboradores (2009), apesar de nosso estudo não ter sido do tipo epidemiológico. Essas amostras não tipáveis apresentaram mais de um tipo de *ccr* ou ausência de classe *mec*. Ruppé e colaboradores (2008) e Ibrahem e colaboradores (2009) também verificaram ausência de classe *mec* e presença de mais de um *ccr* em amostras de SCN resistentes à meticilina.

As CMI<sub>s</sub> obtidas em nosso estudo para os três antimicrobianos avaliados em amostras de MRSA foram bem distintas entre os dois grupos de pacientes avaliados. As amostras de não-neonatos apresentaram elevados índices de resistência para oxacilina, eritromicina e clindamicina, com valores que variaram entre 128 e  $\geq 256$   $\mu\text{g/mL}$ . Diekema e colaboradores (2001) avaliaram a sensibilidade de um grande número de amostras de *S. aureus* (1274 MSSA e 692 MRSA) obtidas em hospitais da América Latina, entre os anos de 1997 e 1999. Eles detectaram resistência à eritromicina e clindamicina entre amostras de MRSA, com valores de CMI<sub>90</sub> maiores que 8  $\mu\text{g/mL}$  para ambos os antibióticos. Apesar de os autores não testarem concentrações mais elevadas das drogas, nossos resultados confirmam os dados de resistência encontrados em amostras MRSA.

Por outro lado, entre amostras MRSA de neonatos, todas com SCC*mec* tipo IV, as CMI<sub>s</sub> para eritromicina foram baixas (CMI<sub>90</sub>=32 $\mu\text{g/mL}$ ) e todas foram sensíveis à clindamicina, fato que tem sido observado para amostras com este tipo de cassete. O perfil fenotípico de resistência antimicrobiana de amostras com esse tipo de cassete é similar, independentemente do país de origem. Amostras com SCC*mec* tipos IV e V não costumam ser resistentes a múltiplas drogas, além de frequentemente ocasionarem infecções cutâneas e de tecido mole (CHAMBERS & DELEO, 2009). Outro aspecto relacionado a essa baixa resistência seria o fato de serem amostras MRSA de pacientes neonatos, sendo provavelmente uma aquisição endógena a partir da microbiota da mãe, o que justificaria essa maior sensibilidade bacteriana.

Entre amostras de MRSE, aquelas mais resistentes foram as de não-neonatos, cujas CMI<sub>s</sub> para clindamicina e eritromicina foram, em geral, elevadas ( $\geq 256$   $\mu\text{g/mL}$ ). Concentrações elevadas também foram verificadas por Lim e colaboradores (2002) entre 186 amostras de SCN resistentes e sensíveis à meticilina. Por outro lado, em amostras MRSE tipo IV de neonatos as CMI<sub>50</sub> para clindamicina e eritromicina foram as mais baixas, 32 $\mu\text{g/mL}$  e  $\leq 0,25$   $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. No presente estudo, apesar de muitas amostras de MRSE isoladas de neonatos serem resistentes à eritromicina e

clindamicina pelo menos metade foi sensível à clindamicina e apresentou resistência em níveis baixos à eritromicina, refletindo provavelmente, a microbiota do paciente. A literatura tem demonstrado que grande parte das amostras nosocomiais apresenta altos índices de resistência a diversos antibióticos, ao passo que, amostras comensais ou provenientes da comunidade costumam ser mais susceptíveis (CASEY, LAMBERT & ELLIOTT, 2007).

Em relação à presença de genes de resistência à eritromicina em amostras de *S. aureus*, foi verificado na presente coleção de amostras uma prevalência do gene *ermA* (62%) e uma forte associação entre a presença dele e os tipos II e III de *SCCmec* em amostras de MRSA. O gene *ermA* é encontrado em um transposon, o Tn554, que faz parte dos *SCCmec* tipos II e III, podendo ainda ser encontrado em outras regiões do genoma bacteriano (MURPHY, 1985). Park e colaboradores (2007) detectaram uma taxa de 58% e 6,8% do gene *ermA* entre amostras de MRSA com *SCCmec* tipo II obtidas de adultos e crianças, respectivamente. Entre amostras de MRSA com tipo III, eles verificaram 16% do gene *ermA* entre amostras obtidas de adultos, e 1,1% em amostras de crianças.

O gene *ermC* foi o segundo mais encontrado (54%) em amostras de *S. aureus*, sendo mais detectado entre amostras MRSA tipo IV (58,8%) e em amostras sensíveis à meticilina (100%). Quanto à sensibilidade antimicrobiana, observou-se uma associação entre a presença desse gene e o tipo de amostra, visto que ele esteve presente principalmente em amostras tipo IV, normalmente de origem comunitária, e em amostras MSSA. O gene *ermC* se encontra presente em pequenos plasmídeos, facilmente transferíveis entre essas amostras de mesma origem. (MURPHY, 1985; WESTH *et al.*, 1995). Por outro lado, Schmitz e colaboradores (2000), analisando 358 amostras de MSSA e 493 de MRSA, verificaram que o gene *ermC* foi mais frequente entre MSSA (47%) do que em amostras de MRSA (5%).

O gene *ermB*, carregado por transposons ou plasmídios de elevado tamanho molecular, foi detectado em somente 2 (4%) amostras, uma de MRSA tipo IV e outra MSSA, sempre associado a outros genes *erm*. Martineau e colaboradores (2000), em estudo envolvendo 206 amostras clínicas de *S. aureus* e 188 amostras de *S. epidermidis* provenientes de vários países, relataram que o gene *ermB* é menos frequentemente encontrado do que o gene *ermA* em estafilococos eritromicina-resistentes, com taxas de 1,9% entre amostras de *S. aureus* e 0,5% entre amostras de *S. epidermidis*. O presente trabalho detectou esse gene em uma taxa de 4% e somente em amostras de *S. aureus*.

Um outro estudo realizado no Reino Unido, detectou uma incidência de 7,2% do gene *ermB* entre amostras de SCN e observou que esse gene foi encontrado exclusivamente em amostras de origem animal das espécies *S. intermedius*, *S. xylosus* e *S. hyicus*, o que explicaria a baixa frequência do gene *ermB* encontrada entre as amostras de origem humana (EADY *et al.*, 1993).

No presente estudo, uma amostra sensível à meticilina carreando o gene *ermA* apresentou CMI para eritromicina de sensibilidade ( $\leq 0,25$   $\mu\text{g/mL}$ ). Esse fato indica a aquisição do gene de resistência à eritromicina, sem que haja a sua expressão. Hososaka e colaboradores (2007) descreveram casos de amostras clínicas que continham o gene *mecA*, e que, no entanto, apresentavam fenótipo de susceptibilidade à oxacilina. Num total de 480 amostras de *S. aureus* isoladas de dois hospitais universitários e nove hospitais gerais do Japão, no período entre 2003 a 2005, eles detectaram 6 amostras *mecA*-positivas com CMIs para oxacilina menores que 2  $\mu\text{g/mL}$ . Portanto, pacientes infectados por amostras MRSA oxacilina-sensíveis, como foram denominadas, quando tratados com antibióticos  $\beta$ -lactâmicos tenderiam a desenvolver altos níveis de resistência aos mesmos, ocasionando falha terapêutica. Apesar de não haver relatos deste tipo em relação à resistência à eritromicina, pode-se inferir que o mesmo pode ocorrer com o paciente infectado com amostras deste tipo, que contém o gene *ermA* mas não apresenta resistência fenotípica a droga.

Entre as amostras de *S. epidermidis* analisadas, foi verificada a presença do gene *ermC* em amostras com SCC*mec* de diferentes tipos, independente do tipo de paciente, tendo sido detectado em 82,4% das amostras. O gene *msrA* foi detectado no presente estudo em 17,6% das amostras de *S. epidermidis*, mas somente em amostras MRSE de neonatos. Lina e colaboradores (1999) mostraram que, entre 150 amostras de SCN isoladas na França, tanto as resistentes quanto as sensíveis à meticilina apresentaram com maior frequência o gene *ermC*. Eady e colaboradores (1993) documentaram a predominância do gene *ermC* entre amostras clínicas e comensais de SCN isoladas no Reino Unido. Contudo, ainda não há relatos na literatura que correlacionem os genes de resistência à eritromicina aos tipos de SCC*mec* em amostras *S. epidermidis*.

Em algumas amostras, tanto de *S. aureus* quanto de *S. epidermidis*, que continham o gene *msrA*, observou-se faixas de CMI intermediárias para eritromicina (1 - 4  $\mu\text{g/mL}$ ). Esse gene codifica uma proteína que se liga a moléculas de ATP, atuando como uma bomba de efluxo, dose-dependente, mediante a hidrólise dessas moléculas (ROSS *et al.*, 1990). Por agir de forma dose-dependente, quanto maior a utilização de



antibióticos da classe dos macrolídeos e estreptograminas B, maior é a expressão dessa proteína, induzindo altos índices de resistência aos mesmos. No entanto, se comparado aos genes *erm*, o gene *msrA* leva a níveis de resistência à eritromicina bem mais baixos, além de não atuar em lincosamidas, gerando o fenótipo conhecido com  $MS_B$ .

O presente estudo detectou uma relação entre as CMI<sub>s</sub> ( $\geq 256\mu\text{g/mL}$ ) para os três antimicrobianos testados e a presença dos genes de resistência à eritromicina (*ermA* e *ermC*) em amostras de *S. aureus*. Entre os *S. epidermidis*, esse tipo de associação foi observado para o gene *ermC*. Dados de Lim e colaboradores (2002) mostraram essa correlação em amostras de *S. aureus* e de SCN. Apesar de os autores não correlacionarem os genes *erm* com as CMI<sub>s</sub> para eritromicina e clindamicina, eles detectaram valores de CMI<sub>90</sub> maiores que  $64\mu\text{g/mL}$  para ambas as drogas em *S. aureus* e em SCN. Um outro estudo realizado por Park e colaboradores (2007) detectou, entre 50 amostras de MRSA de adultos, CMI maior que  $512\mu\text{g/mL}$  para eritromicina e clindamicina associada ao gene *ermA*, confirmando nossos resultados.

A clindamicina costuma ser utilizada como alternativa no tratamento de infecções ocasionadas por MRSA e MSSA. Contudo, a presença de resistência induzida em amostras estafilocócicas pode limitar sua eficácia, levando possivelmente à falha terapêutica (WEISBLUM, 1985). Nosso estudo detectou entre amostras de *S. aureus*, mesmo entre aquelas sensíveis a meticilina, alto índice de resistência à clindamicina (70%) e de fenótipos do tipo  $MLS_B$  constitutivos (86%). No entanto, a resistência induzível foi observada em um total de 10% das amostras, tendo sido detectada em 5,7% das amostras de não-neonatos e em 27,3% das amostras de MSSA. Em São Paulo, Amorim e colaboradores (2009) verificaram a presença de resistência constitutiva em 79,1% das amostras de MRSA, sendo que em 4,7% foi observada resistência induzida à clindamicina. Entre amostras de MSSA, o fenótipo  $MLS_B$  constitutivo foi de 2,9% e o fenótipo  $MLS_B$  induzível foi de 6,7%. A resistência no grupo  $MLS_B$  e a expressão constitutiva foram mais comuns entre as amostras MRSA, e a taxa de resistência  $MLS_B$  induzível foi maior entre amostras MSSA.

O fenótipo  $MLS_B$  constitutivo (61,7% das amostras) foi associado a um elevado percentual de resistência à clindamicina (70,6%). Os fenótipos  $MLS_B$  induzido e  $MS_B$  apresentaram taxas de 23,5% e 14,8%, respectivamente. A prevalência do fenótipo induzível foi relativamente alta entre amostras de neonatos (30%). A taxa de resistência induzível à clindamicina entre MRSE de neonatos sugere que este antibiótico seja utilizado com critério neste grupo. Lina e colaboradores (1999) também mostraram um

fenótipo induzível de 28,7% entre 150 amostras de SCN isoladas na França, tanto resistentes quanto sensíveis à metilicina.

Os resultados deste trabalho confirmam a relação entre os SCC*mec* tipos II ou III, altos níveis de resistência à eritromicina e clindamicina e presença do gene *ermA* em amostras de MRSA, em geral, mais isoladas de não-neonatos. O fenótipo cMLS<sub>B</sub> foi predominante neste grupo de amostras. Amostras de MRSE foram freqüentes entre os neonatos que apresentaram principalmente o SCC*mec* tipo IV e não tipável, apresentaram elevados níveis de resistência à eritromicina e clindamicina e o gene *ermC* como predominante. Os fenótipos cMLS<sub>B</sub>, iMLS<sub>B</sub> e MS<sub>B</sub> apresentaram freqüências similares. Os altos índices de resistência encontrados aos macrolídeos e à clindamicina entre os grupos de amostras analisados, assim como o elevado percentual de resistência induzida à clindamicina em amostras de MRSE de neonatos, sugerem maior precaução na utilização deste fármaco, a fim de se evitar falha terapêutica.

## 6 - CONCLUSÕES

---

- Entre amostras de MRSA houve uma estreita relação entre a presença do gene *ermA*, os *SCCmec* tipos II e III e altos níveis de resistência à eritromicina e à clindamicina.
- Amostras de MRSA tipo IV apresentaram o gene *ermC* como mais freqüente.
- Amostras de neonatos apresentaram principalmente a associação dos genes *ermA* e *ermC*, baixos valores de CMI<sub>90</sub> para eritromicina e sensibilidade à clindamicina.
- Entre amostras MRSE, o gene *ermC* esteve associado a todos os tipos de *SCCmec* avaliados, em especial entre amostras com *SCCmec* tipo IV e não tipáveis, além de altos valores de CMI para eritromicina e clindamicina.
- O gene *msrA* se mostrou relacionado a amostras tipo IV, apresentando baixos níveis de resistência à eritromicina e sensibilidade à clindamicina.
- O fenótipo MLS<sub>B</sub> constitutivo foi observado em *S. aureus* e os fenótipos MS<sub>B</sub> e MLS<sub>B</sub> induzível na espécie *S. epidermidis*.

## 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

AMORIM, D.M.R.; PERSON, O.C.; AMARAL, P.J. & TAMAKA, I.I. **Resistência induzível à clindamicina entre isolados clínicos de *S. aureus***. O Mundo da Saúde, 33, 401-405, 2009.

AKSOY, D.Y. & UNAL, S. **New antimicrobial agents for the treatment of Gram-positive bacterial infections**. Clin. Microbiol. Infect., 14, 411-420, 2008.

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

ARCHER, G. L. ***Staphylococcus epidermidis* and the other coagulase-negative staphylococci**. In: Principles and practice of infections diseases. 8<sup>th</sup> ed. Churchill Livingstone, New York, USA, 2000.

ARNASON, S.; THORS, V.S.; GUDNASON, T.; KRISTINSSON, K.G.; & HARALDSSON, A. **Bacteraemia in children in Iceland 1994-2005**. Laeknabladid, 94, 523-9, 2008.

BANG, A.T.; BANG, R.A.; STOLL, B.J.; BAITULE, S.B.; REDDY, H.M. & DESHMUKH, M.D. **Is home-based diagnosis and treatment of neonatal sepsis feasible and effective? Seven years of intervention in the gadchiroli field trial (1996 to 2003)**. J. Perinatol., 25, S62-S71, 2005.

BANNERMAN, T. L.A & PEACOCK S. J. ***Staphylococcus*, *Micrococcus* and other catalase-positive cocci**. In: Manual of Clinical Microbiology, Murray, P. R.; Baron, E. J.; Jorgensen, J. H., Landry, M. L. & Pfaller, M. A., 9<sup>th</sup> ed, 390-411, ASM Press, Washington, D.C., 2007.

BERGLUND, C. & SÖDERQUIST, B. **The origin of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate at a neonatal ward in Sweden-possible horizontal transfer of a staphylococcal cassette chromosome *mec* between methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus aureus***. Clin. Microbiol. Infect., 14, 1048-56, 2008.

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

BOUCHAMI, O.; ACHOUR, W. & BEN HASSEN. **Prevalence of resistance phenotypes and genotypes to macrolide, lincosamide and streptogramin antibiotics in Gram-positive cocci isolated in Tunisian Bone Marrow Transplant Center**. Pathol. Biol., 2009.

CASEY, A.L.; LAMBERT, P.A. & ELLIOT, T.S.J. ***Staphylococci***. I. J. Antimicrob. Agents, 3, S23-S32, 2007.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC, 2007). Disponível em <<http://www.cdc.gov.ncidod/healthDis.html>>, acessado em 10/06/2010.

CHAMBERS, H.F. & DELEO, F.R. **Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era**. Nature Rev. Microbiol., 7, 629-641, 2009.

CIMOLAI, N. ***Staphylococcus aureus* outbreaks among newborns: new frontiers in an old dilemma**. Am.J.Perinatol., 20, 125-136, 2003.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE – CLSI. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing** – tenth edition supplement, M02-A10, Pennsylvania, USA, 2009a.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE – CLSI. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically** – Approved standards – eighth edition: M07-A8, Pennsylvania, USA, 2009b.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE – CLSI. **Performance standards for antimicrobial testing** – nineteenth informational supplement, M100-S19, Pennsylvania, USA, 2009c.

COUTO, R.C.; CARVALHO, E.A.; PEDROSA, T.M.; PEDROSO, E.R.; NETO, M.C. & BISCIONE, F.M. **A 10-year prospective surveillance of nosocomial infections in neonatal intensive care units.** *Am.J.Infect.Control.*, 35, 183-9, 2007.

COSTA, A.C.; SILVA, M.G. & NORIEGA, E. **Manual de Operacionalização do Programa Nacional de Prevenção e Controle da Infecção Associada aos Cuidados de Saúde.** Ministério da Saúde, Portugal, 2007.

DAUREL, C.; HUET, C.; DHALLUIN, A.; BES, M. ; ETIENNE, J. & LECLERCQ, R. **Differences in potential for selection of clindamicin-resistant mutants between inducible *ermA* and *ermC* *Staphylococcus aureus* genes.** *J. Clin. Microbiol.*, 46, 546-550, 2008.

DEURENBERG, R.H. & STOBBERINGH, E.E. **The evolution of *Staphylococcus aureus*.** *Infect. Genetics Evol.*, 8, 747-763, 2008.

DIEKEMA, D.J.; PFALER, M.A.; SCMITZ, F.J.; SMAYEVSKY, J.; BELL, J., JONES, R.N.; BEACH, M. & SENTRY GROUP. **Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific Region for the SENTRY antimicrobial surveillance program, 1997-1999.** *Clin. Infect.Dis.*, 32, 2, S114-132, 2001.

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

D'OLIVEIRA R.E.; BARROS R.R.; MENDONÇA C.R.; TEIXEIRA L.M.; CASTRO A.C. **Susceptibility to antimicrobials and mechanisms of erythromycin resistance in clinical isolates of *Streptococcus agalactiae* from Rio de Janeiro, Brazil.** *J Med Microbiol.*, 52, 1029-30, 2003.

DONLAN, R.M. **Biofilms and Device-Associated Infections.** *Emerg Infect. Dis.*, 7, 277-281, 2001.

EADY E.A.; ROSS J.I.; TIPPER J.L.; WALTERS C.E.; COVE J.H. & NOBLE W.C. **Distribution of genes encoding erythromycin ribosomal methylases and an erythromycin efflux pump in epidemiologically distinct groups of staphylococci.** *J. Antimicrob. Chemother.*, 31, 211-217, 1993.

EL FAR, F., MARINO, C.G.J., MEDEIROS, E.A.S. **The organization of hospital infections control committees and their importance in Brazil.** *Braz.J.Infect. Dis.*, 5, 6, 290-293, 2001.

EUZÉBY, J.P. **List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature - Genus *Staphylococcus*.** <http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html> 14/06/2010.

FLUIT, A.D.C., VISSER, M.R. & SCHMITZ, F. -J. **Molecular Detection of Antimicrobial Resistance.** *Clin. Microbiol. Rev.*, 14, 836-871, 2001.

FOSTER, T.J. **Immune evasion by *Staphylococci*.** *Nature*, 3, 948-958, 2005.

FOSSUM, A. E. & BUKHOLM, G.. **Increased incidence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST80, novel ST125 and SCC*mecIV* in the south-eastern part of Norway during a 12-year period.** *Clin. Microbiol. Infect.*, 12, 627-633, 2006.

FUCHS, P.C., BARRY, A.L. & BROWN, S.D. **Bactericidal Activity of Quinupristin-Dalfopristin against *Staphylococcus aureus*: Clindamycin Susceptibility as a Surrogate Indicator.** *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2880-2882, 2000.

GARCIA, P.; BENITEZ, R.; LAM, M., SALINAS, A.M.; WIRTH, H.; ESPINOZA, C.; GARAY, T.; DEPIX, M.S.; LABARCA, J. & GUZMAN, A.M. **Coagulase-negative staphylococci: clinical, microbiological and molecular features to predict true bacteraemia.** *J. Med. Microbiol.*, 53, 67-72, 2004.

GARLAND, J.S.; ALEX, C.P.; SEVALLIUS, J.M.; MURPHY, D.M.; GOOD, M.J.; VOLBERDING, A.M.; HOFER, L.L.; GORDON, B.J. & MAKI, D.G. **Cohort study of the pathogenesis and molecular**

**epidemiology of catheter-related bloodstream infection in neonates with peripherally inserted central venous catheters.** *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.*, 29, 243-9, 2008.

GARDAM, M.A. **Is methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* an emerging community pathogen? A review of the literature.** *Can. J. Infect. Dis.*, 11, 202-211, 2000.

GOODMAN & GILMAN. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica.** 10ª edição: Editora Mc Graw Hill, 2005.

GÖTZ, F. ***Staphylococcus* and biofilms.** *Mol. Microbiol.*, 43, 1367-1378, 2002.

GRAY, J.W. **Surveillance of infection in neonatal intensive care units.** *Early Hum Dev.*, 83, 3, 157-63, 2007.

GRAHAM, P. L.; MOREL, A.-S.; ZHOU, J.; WU, F.; DELLA-LATTA, P.; RUBENSTEIN, D. & SAIMAN, L. **Epidemiology of Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* in the Neonatal Intensive Care Unit.** *Infect Control Hosp. Epidemiol.*, 23, 677-682, 2002.

HANSEN, A.M.; KJELDSEN, G. & SOLLID, J.U.E. **Local variants of staphylococcal cassette chromosome *mec* in sporadic methicillin-resistant coagulase-negative *Staphylococci*: evidence of horizontal gene transfer?** *Antimicrob. Agents Chemother.*, 48, 285-296, 2004.

HIGUCHI, W., TAKANO, T., TENG, L. & YAMAMOTO, T. **Structure and specific detection of staphylococcal cassette chromosome *mec* type VII.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 377, 752-756, 2008.

HIRA, V.; SLUIJTER, M.; ESTEVÃO, S.; HORST-KREFT, D.; OTT, A.; DE GROOT, R.; HERMANS, P.W. & KORNELISSE, R.F. **Clinical and epidemiologic characteristics of coagulase-negative staphylococcal bloodstream infections in intensive care neonates.** *Ped. Infect Dis J.*, 26, 607-12, 2007.

HIRAMATSU, K.; CHUI, L.; KURODA, M. & ITO, T. **The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** *Trends Microbiol.*, 9, 486-493, 2001.

HOLTFRETER, S.; GRUMANN, D.; SCHMUDDE, M.; NGUYEN, H.T.T.; EICHLER, P.; STROMMINGER, B.; KOPRON, K.; KOLATA, J.; GIEDRUS-KALEMBA, S.; STEINMETZ, I.; WITTE, W. & BRÖKER, B.M. **Clonal distribution of superantigen genes in clinical *Staphylococcus aureus* isolates.** *J. Clin. Microbiol.*, 45, 2669-2680, 2007.

HOSOSAKA, Y.; HANAKI, H.; ENDO, H.; SUZUKI, Y.; NAGASAWA, Z.; OTSUKA, Y.; NAKAE, T. & SUNAKAWA, T. **Characterization of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus*: a new type of MRSA.** *J Infect Chemother.*, 13, 79-86, 2007.

IBRAHEM, S.; SALMENLINNA, S.; VIROLAINEN, A.; KERTTULA, A.M.; INEN, O.L.; JAÛGUERROS, H.; BROAS, M. & VUOPIO-VARKILA, J. **Carriage of Methicillin-Resistant *Staphylococci* and Their SCC*mec* Types in a Long-Term-Care Facility.** *J. Clin. Microbiol.*, 46, 32-37, 2009.

IORDANESCU, S. **Three distinct plasmids originating in the same *Staphylococcus aureus* strain.** *Arch. Roum. Pathol. Exp. Microbiol.*, 35, 111-118, 1976.

ITO, T.; KATAYAMA, Y.; ASADA, K.; MORI, N.; TSUTSUMIMOTO, K.; TIENSATORN, 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.*, 45, 1323-1336, 2001.

ITO, T.; MA, X. X.; 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.*, 48, 2637-2651, 2004.

JARLOV, J.O. **Phenotypic characteristics of coagulase-negative staphylococci: typing and antibiotic susceptibility.** APMIS, 107, 1S-42S, 1999.

JEVONS, M.P. **Celbenin-resistant Staphylococci.** Brit.Med. J., 1, 124–125, 1961.

JOHN, J. F. & BARG N. L. **Staphylococcus aureus in hospital: Epidemiology and Infection Control.** 1st ed., Williams & Wilkins Company, USA, 271-289, 1996.

KATZUNG, B.G., **Farmacologia Básica e Clínica.** 8ª edição: Editora Guanabara Koogan, 2003.

KILBRIDE, H.W.G. & PREMKUMAR, K. Neonatal sepsis: *Staphylococcus aureus* as the predominant pathogen. Int. J. Ped., 68, 715-717, 2003.

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

KLOSS, W.E. & BANNERMAN, T.L. **Update on clinical significance of coagulase-negative *Staphylococci*.** Clin. Microbiol., 7, 117-140, 1994.

KWON N.H.; PARK K.T.; MOON J.S.; JUNG W.K.; KIM S.H.; KIM J.M.; HONG S.K.; KOO H.C.; JOO Y.S.; PARK Y.H. **Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) characterization and molecular analysis for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and novel SCC*mec* subtype IVg isolated from bovine milk in Korea.** J. Antimicrob. Chemother., 56, 624-32, 2005.

KONDO, Y.; ITO, T.; XUE, X.; WATANABE, M.S. & KREISWIRTH, B.N. **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., 51, 264-274, 2007.

KUBICA, M.; GUZIK, K.; KOZIEL, J.; ZAREBKI, M.; RICHTER, W.; GAJKOWSKA, B.; GOLDA, A.; MACIAG-GUDOWSKA, A.; BRIX, K.; SHAW, L.; FOSTER, T. & POTEMPA, J. **A potential new pathway for *Staphylococcus aureus* dissemination: the silent survival of *Staphylococcus aureus* phagocytosed by human monocyte-derived macrophages.** PLoS ONE, 9, 1-16, 2008.

LECLERCQ, R. & COURVALIN, P. **Bacterial Resistance to Macrolide, Lincosamide, and Streptogramin Antibiotics by Target Modification.** Antimicrob. Agents Chemother., 35, 1267-1272, 1991.

LIM, J-A.; KWON, A-R.; KIM, S-K.; CHONG, Y.; LEE, K. & CHOI, E.C. **Prevalence of resistance to macrolide, lincosamine and streptogramin in Gram-positive cocci isolated in a Korean hospital.** J. Antimicrob. Chemother., 49,3, 489-495, 2002.

LINA, G.; QUAGLIA, A.; REVERDY, M.E.; LECLERCQ, R.; VANDENESCH, F. & ETIENNE, J. **Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides and streptogramins among *Staphylococci*.** Antimicrob. Agents Chemother., 43, 1062-1066, 1999.

LLANOS-MÉNDEZ, A.; DÍAZ-MOLINA, C.; BARRANCO-QUINTANA, J.L.; GARCÍA-ORTÚZAR, V. & FERNÁNDEZ-CREHUET, R. **Factors influencing hospital infection in patients in the intensive care unit.** Gac.Sanit., 18, 190-6, 2004.

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

MACHADO, A.B.M.P.; REITER, K.C.; PAIVA, R.M. & BARTH, A.L. **Distribution of staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) types I, II, III and IV in coagulase-negative**

**staphylococci from patients attending a tertiary hospital in southern Brazil.** J Med. Microbiol., 56, 1-7, 2007.

MARTINEAU, F.; PICARD, F.J.; LANSAC, N. C.; MENARD C.; ROY, P.H.; OUELLETTE, M. & BERGERON, M.G. **Correlation between the resistance genotype determined by multiplex PCR assays and the antibiotic susceptibility patterns of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*.** Antimicrob. Agents Chemother.; 44, 231-238, 2000.

MARTINS, A. & CUNHA, M.L.R.S. **Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci: epidemiological and molecular aspects.** Microbiol. Immunol.; 51, 787-795, 2007.

MIRAGAIA, M.; THOMAS, J.C.; COUTO, I.; ENRIGHT, M.C. & DE LENCASTRE, H. **Inferring a population structure for *Staphylococcus epidermidis* from multilocus sequence typing data.** J. Bacteriol., 189, 2540-52, 2007.

MIREYA, U.A.; MARTI, P.O.; XAVIER, K.V.; LATORRE, O.C.; MARTÍN, M.M. & CAMPINS, M.M. **Nosocomial infections in pediatric and neonatal intensive care units.** J. Infect, 54, 212-220, 2007.

MURPHY, E.; HUWYLER, L. & FREIRE BASTOS, M. **Transposon Tn554: complete nucleotide sequence and isolation of transposition-defective and antibiotic-sensitive mutants.** EMBO J., 4, 3357-3365, 1985.

NAGATA, E.; BRITO, A.S. & MATSUO, T. **Nosocomial infections in a neonatal intensive care unit: incidence and risk factors;** Am.J.Infect.Control., 30, 26-31, 2002.

NOVICK, R. P.; E. MURPHY; GRYCZAN T.J., BARON E. & EDELMAN, I. **Penicillinase plasmids of *Staphylococcus aureus*: restriction-deletion maps,** 1979.

OLIVEIRA, D.C. & 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., 46, 2155-2161, 2002.

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

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

OTTO, M. ***Staphylococcus epidermidis* – the ‘accidental’ pathogen.** Nature Rev. Microbiol., 7, 555-567, 2009.

PARK, J.Y.; JIN, J.S.; KANG, H.Y.; JEONG, E.H.; LEE, J.C.; LEE, Y.C.; SEOL, S.Y.; CHO, D.T. & KIM, J. **A comparison of adult and pediatric methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates collected from patients at a University Hospital in Korea.** J. Microbiol., 45, 447-452, 2007.

PEACOCK, W.F. **Future options for management of heart failure in an emergency department observation unit.** Crit. Pathw. Cardiol., 4, 177-81, 2005.

PESSOA-SILVA, C.L.; MIYASAKI, C.H.; ALMEIDA, M.F.; KOPELMAN, B.I.; RAGGIO, R.L. & WEY, S.B. **Neonatal late-onset bloodstream infection: attributable mortality, excess of length of stay and risk factors.** Europ. J. Epidemiol., 17, 715-720, 2001.

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



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

PROJAN, S.J. & NOVICK, R.P. **The molecular basis of pathogenicity.** In: *The Staphylococci in human disease.* Crossley, K.B. & Archer, G.L. Churchill Livingstone, 55-81, 1997.

REYNOLDS, E.; ROSS, J.I. & COVE J.H. **Msr(A) and related macrolide/streptogramin resistance determinants: incomplete transporters?** *Int. J. Antimicrob. Agents*, 22, 228-36, 2003.

ROBERTS, M.C.; SUTCLIFFE, J.; COURVALIN, P.; JENSEN, L.B.; ROOD, J. & SEPPALA, H. **Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants.** *Antimicrob. Agents Chemother.*, 43, 2823-2830, 1999.

ROBINSON, D. A. & ENRIGHT, M. C. **Evolutionary models of the emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** *Antimicrob. Agents Chemother.*, 47, 3926-3934, 2003.

ROSS, J.; EADY, E.A., COVE, J.H. & BAUMBERG, S. **Identification of a chromosomally encoded ABC-transport system with the staphylococcal erythromycin exporter MsrA may interact.** *Gene*, 153, 93-98, 1995.

RUPPE, E.; BARBIER, M. Y., MAIGA, A., COJOCARU, R., BENKHALFAT, M., BENCHOUK, S., HASSAINE, H., MAIGA, I., DIALLO, A., KOUMARE, A.K., OUATARRA, K., SOUMARE, S., DUFOURCQ, J-B., NARETH, C., SARTHOU, J.-L., ANDREMONT, A. & RUMMY, R. **Diversity of Staphylococcal Cassete Chromosome *mec* Structures in Methicillin-Resistant *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus* Strains among Outpatients from four Countries.** *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 442-449, 2008.

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

SANTOS, K.R.N., TEIXEIRA, L.M., LEAL, G.S., FONSECA, L.S. & GONTIJO FILHO, P.P. **DNA typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: isolates and factors associated with nosocomial acquisition in two Brazilian university hospitals.** *J. Med. Microbiol.*, 48, 17-23, 1999.

SCHMITZ, F.-J.; SADURSKI R.; KRAY A.; BOSS, M.; GEISEL, R.; KÖHRER, K.; VERHOEF, J. & FLUIT, A.C. **Prevalence of macrolide resistance genes in *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecium* isolates from 24 European university hospitals.** *J. Antimicrob. Chemother.*, 45, 921-923, 2000.

SCHUENCK, R.P. ***Staphylococcus aureus* isolados de próteses articulares e outras infecções: diversidade genotípica e aspectos relacionados à resistência e virulência.** *Doutorado (Microbiologia).* Universidade Federal do Rio de Janeiro. 128p. 2009.

SHORE, A.; ROSSNEY, A.S.; KEANE, C.T.; ENRIGHT, M.C. & COLEMAN, D.C. **Seven novel variants of the staphylococcal chromosomal cassette *mec* in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Ireland.** *Antimicrob. Agents Chemother.*, 49, 2070-2083, 2005.

SIBERRY, G. K.; TEKLE T.; CARROLL, K. & DICK, J. **Failure of clindamycin treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* expressing inducible clindamycin resistance in vitro.** *Clin. Infect. Dis.*, 37, 1257-1260, 2003.

SMITH, S.I.; AWEH, A.J.; COKER, A.O.; SAVAGE, K.O.; ABOSEDE, D.A. & OYEDEJI, K.S. **Lactobacilli in human dental caries and saliva.** *Microbios*, 105, 77-85, 2001.

SMITH, R.L.; SAWYER, R.G. & PRUETT, T.L. **Hospital-acquired infections in the surgical intensive care: epidemiology and prevention.** *Zentralbl. Chir.*, 128, 1047-1061, 2003.

SPILIOPOULOU, I.; PETINAKI, E.; PAPANDREOU, P. & DIMITRACOPOULOS, G. ***ermC* is the predominant genetic determinant for the expression of resistance to macrolides among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates in Greece.** J. Antimicrob. Chemother., 53, 8814-817, 2004.

SPIZEK, J. & REZANKA, T. **Lincomycin, clindamycin and their applications.** Appl. Microbiol. Biotechnol., 64, 455-464, 2004.

STROMMENGER, B.; KETTLITZ, C.; WERNER, G. & WITTE, W. **Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus*.** J. Clin. Microbiol., 41, 4089-4094, 2003.

TÁVORA, A.C.; CASTRO, A.B.; MILITÃO, M.A.; GIRÃO, J.E.; RIBEIRO, K.D.E.C. & TÁVORA L.G. **Risk factors for nosocomial infection in a Brazilian neonatal intensive care unit.** Braz. J. Infect. Dis. 12, 75-9, 2008.

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

TENOVER, F.C. & GAYNES, R.P. **The epidemiology of *Staphylococcus* infections.** In: *Gram-Positive Pathogens*. Fischetti, V.A.; Novick, R.P.; Ferretti, J.J.; Portnoy, D.A. & Rood, J.I., 1<sup>st</sup> edition. ASM Press, Washington, 414-421, 2000.

UDO, E.E.; PANIGRAHI, D. & JAMSHEER, A.E. **Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated in a Bahrain hospital.** Med. Princ. Pract., 17, 308-314, 2008.

VIVONI, A.M.; NETTO-DOS-SANTOS, K.R.; DE-OLIVEIRA, M.P.; GIAMBIAGI-DEMARVAL, M.; FERREIRA, A.L.P.; RILEY, L.W. & MOREIRA, B.M. **Mupirocin for controlling methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: lessons from a decade of use at a university hospital.** Infect. Control. Hosp. Epidemiol., 26, 662-667, 2005.

VON EIFF, C.; PETERS, G. & HEILMANN, C. **Pathogenesis of infection due to coagulase-negative staphylococci.** Lancet Infect. Dis., 2, 677-685, 2002.

YOUNG, C. & OTTO, M. ***Staphylococcus epidermidis* infections.** Microbes Infect., 4, 481-489, 2002.

YOUNG, C.; KOCIANOVA, S.; VOYICH, J.M.; YAO, Y.; FISCHER, E.R.; DELEO, F.R. & OTTO, M. **A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion and virulence.** J. Biol. Chem., 279, 54881-6, 2004.

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

WEI, S.; CHIU, H.; HUNG, K.; WANG, J.; SU, B.; LIN, T. & LIN, H. **Epidemiologic trends in nosocomial bacteraemia in a neonatal intensive care unit.** J. Microbiol. Immunol. Infect., 38, 283-288, 2005.

WEINSTEIN, R.A. **Nosocomial infection update.** Emerg. Infect. Dis., 4, 416-20, 1998.

WEISBLUM, B. & DEMOHN, V. **Erythromycin-inducible resistance in *Staphylococcus aureus*: survey of antibiotic classes involved.** J. Bacteriol., 8, 447-452, 1969.

WEISMAN, L.E. **Coagulase-negative staphylococcal disease: emerging therapies for the neonatal and pediatric patient.** Curr. Opin. Infect. Dis., 17, 237-241, 2004.

WERTHEIM, H.F.; WALSH, E.; CHOUDHURRY, R.; MELLES, D.C.; BOELEN, H.A.; MIAJLOVIC, H.; VERBRUGH, H.A.; FODSTER, T. & VAN BELKUM, A. **Key role for clumping factor B in *Staphylococcus aureus* nasal colonization of humans.** PLoS. Med. 5, 104-112, 2008.

WESTH, H.; HOUGAARD, D.M.; VUUST, J. & ROSDAHL, V.T. **Prevalence of *erm* gene classes in erythromycin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated between 1959 and 1988.** Antimicrob. Agents Chemother., 39, 369-373, 1995.

WILKINSON, B.J. **Biology.** In: The Staphylococci in human disease. Crossley K.B. & Archer G.L. Churchill Livingstone, 1-38, 1997.

ZHANEL, G.G.; DECORBY, M.; LAING, N.; WESHNOWESKI, B.; VASHISHT, R.; TAILOR, F.; NICHOL, K.A.; WIERZBOWSKI, A.; BAUDRY, P.J.; KARLOWSKY, J.A.; LAGACÉ-WIENS, P.; WALKTY, A.; MCCRACKEN, M.; MULVEY, M.R.; JOHNSON, J.; CANADIAN ANTIMICROBIAL RESISTANCE ALLIANCE (CARA) & HOBAN, D.J. **Antimicrobial-resistant pathogens in intensive care units in Canada: results of the Canadian National Intensive Care Unit (CAN-ICU) study, 2005-2006.** Antimicrob. Agents Chemother., 52, 1430-7, 2008.

ZHANG, K.; McCLURE, J.; ELSAYED, S. & CONLY, J.M. **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*.** Antimicrob. Agents Chemother., 53, 531-540, 2009.

ZINGG, W.; POSFAY-BARBE, K.M. & PITTET, D. **Healthcare-associated infections in neonates.** Curr. Opin. Infect. Dis., 21, 228-234, 2008.

# 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](#)