

Universidade Federal do Rio de Janeiro

CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA À
MUPIROCINA EM *Staphylococcus*
haemolyticus DE ORIGEM NOSOCOMIAL

Natália do Carmo Ferreira

2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

“CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA À MUPIROCINA EM *Staphylococcus haemolyticus* DE ORIGEM NOSOCOMIAL”

Natália do Carmo Ferreira

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

Orientadora: Dra. Marcia Giambiagi-deMarval

Rio de Janeiro

Julho de 2010

“CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA À MUPIROCINA EM *Staphylococcus haemolyticus* DE ORIGEM NOSOCOMIAL”

Natália do Carmo Ferreira

Orientadora: Dra. Marcia Giambiagi-deMarval

Aprovada por:

Kátia Regina Netto dos Santos (Presidente)

Doutora em Ciências (Microbiologia), Universidade Federal do Rio de Janeiro

Ana Luíza de Mattos Guaraldi

Doutora em Ciências (Microbiologia), Universidade Estadual do Rio de Janeiro

Eliézer Menezes Pereira

Doutor em Ciências (Microbiologia), Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro

Eliane de Oliveira Ferreira

Doutor em Ciências (Microbiologia), Universidade Federal do Rio de Janeiro

FICHA CATALOGRÁFICA

Dissertação de Mestrado

Ferreira, Natália do Carmo

“Caracterização da resistência à mupirocina em *Staphylococcus haemolyticus* de origem nosocomial”/ Natália do Carmo Ferreira – Rio de Janeiro, UFRJ/IMPPG, 2010

68 páginas

Orientador: Marcia Giambiagi-deMarval

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)

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

Referências bibliográficas: f 61-68

1. Mupirocina. 2. Plasmídios. 3. *Staphylococcus haemolyticus*. I. Giambiagi-deMarval, Marcia. II. UFRJ, Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, Mestrado em Microbiologia. III. “Caracterização da resistência à mupirocina em *Staphylococcus haemolyticus* de origem nosocomial”

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia Molecular, Departamento de Microbiologia Médica, Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob orientação da professora Marcia Giambiagi-deMarval.

AGRADECIMENTOS

Agradeço sobretudo a Deus. Não só pela dádiva da vida, mas por caminhar ao meu lado e por colocar na minha vida pessoas tão especiais.

A começar pelos meus pais, devo tudo que sou a eles. Agradeço pelo amor e apoio incondicionais. Por todas as horas em que eu, extremamente cansada, me dirigia a vocês e era acolhida com muito carinho. Obrigada pela força, estímulo e amparo que sempre recebi de vocês. A confiança que vocês depositaram em mim foi o principal estímulo para que eu nunca desistisse.

À minha família, aos de perto e aos de longe, que sempre torceram e acreditaram em mim. Ao meu querido avô, que infelizmente não pôde ver a conclusão desse trabalho.

Agradeço ao Rodrigo, que não é apenas um namorado, é um grande amigo e companheiro, está ao meu lado há muitos anos e sempre me incentivou, desde a etapa do vestibular! Obrigada por todos os momentos felizes e por me compreender e amparar nos momentos difíceis. Obrigada pelos incentivos nos momentos de desespero, você nunca me deixou desistir.

À minha orientadora, a Professora Marcia Giambiagi, por toda a confiança em mim depositada. Agradeço pela oportunidade de fazer parte de um grupo tão empenhado e unido. Obrigada também por sempre ser tão clara, tanto nas críticas quanto nos elogios. Aprendi muito com você ao longo desses anos e serei eternamente grata por isso.

Às meninas e meninos dos Laboratórios de Microbiologia Molecular e Bacteriologia Molecular e Marinha: Clayton, Elaine, Jú, Lívia, Lorayne, Marcinha, Naira, Olinda, Palloma, Paula, Viviane e Wesley. O que seria de mim sem vocês?! Obrigada pelos momentos de descontração, pelas festas surpresa e por todos os momentos felizes dentro e fora do laboratório. Ao clã querido (Elaine, Lívia, Lorayne e Olinda) obrigada por tudo! Vocês foram mais do que companheiras de trabalho, tornaram-se imprescindíveis no decorrer dessa trajetória. Ao querido Orlando, que facilitou, e muito, a minha vida no laboratório. Obrigada pela convivência agradável e por sempre “dar um jeitinho” de me ajudar! Obrigada também aos que não fazem mais parte desse grupo, especialmente à Fabiane Villalba e André Olendski. À Fabi por fazer parte dos primeiros meses e ao André pelas palavras de incentivo e pelas piadas para descontrair.

À professora Marinella, que sempre esteve presente e disposta a ajudar.

À professora Kátia Regina, por contribuir com materiais, muita experiência e estar sempre de bom humor. Sua risada é contagiante!

Ao brilhante Marcus Lívio, que me ajudou sempre que possível e contribuiu muito com suas ideias brilhantes. Obrigada por ser sempre tão solícito. Reconheço e agradeço sua ajuda, mesmo quando você não podia, você fazia o possível para me atender.

À professora Maria do Carmo, por me emprestar o Marcus e pelas ideias, sugestões e assessoria durante a realização deste trabalho.

Ao chato, quero dizer, querido companheiro do laboratório ao lado, Ricardo Schuenck, que me ensinou a fazer PFGE na iniciação científica e lembra disso todos os dias! Obrigada tá Ricardo?!

Aos meus amigos, que sempre me incentivaram e torceram por mim. Vocês facilitaram minha caminhada, contribuindo com muitos momentos felizes.

Agradeço ao CNPQ pela bolsa a mim concedida inicialmente e à FAPERJ pela concessão da bolsa FAPERJ nota 10.

Agradeço também à Comissão do XI Congresso Brasileiro de Controle de Infecção e Epidemiologia Hospitalar, pela indicação ao prêmio de melhor trabalho científico.

A Deus, mais uma vez obrigada, por colocar tantas pessoas especiais em minha vida.

RESUMO

“CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA À MUPIROCINA EM *Staphylococcus haemolyticus* DE ORIGEM NOSOCOMIAL”

Natália do Carmo Ferreira

Orientadora: Marcia Giambiagi-deMarval

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

A mupirocina é um antimicrobiano tópico com excelente atividade contra *Staphylococcus* spp. Esse fármaco tem sido utilizado com êxito no tratamento de infecções cutâneas, na erradicação do estado de portador nasal de *Staphylococcus aureus* em profissionais de saúde e pacientes e tem sido valioso no controle de surtos por amostras de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA). No entanto, o uso indiscriminado deste antimicrobiano tem contribuído para o crescente aparecimento de amostras resistentes. Tem sido sugerido que *Staphylococcus haemolyticus*, espécie que apresenta a maior taxa de amostras resistentes aos antimicrobianos entre os *Staphylococcus* coagulase-negativos (SCN), possa atuar como reservatório de genes de resistência e contribuir para a disseminação desses genes para outras espécies estafilocócicas. O presente trabalho consiste na caracterização fenotípica e molecular da resistência à mupirocina em *S. haemolyticus* e no primeiro relato da transferência da resistência à mupirocina de *S. haemolyticus* para *S. aureus*, reforçando a hipótese de que este SCN possa contribuir para a disseminação da resistência a mupirocina. As amostras analisadas nesse trabalho foram isoladas de hemoculturas em pacientes do Hospital Naval Marcílio Dias. Primeiramente, foi realizada uma triagem para a detecção da resistência à mupirocina em 75 amostras de *S. haemolyticus*. Foram detectadas 9 amostras resistentes, através do método de difusão em disco utilizando discos de 5 e 200 µg de mupirocina. Embora o gene *ileS-2*, responsável pela resistência à mupirocina tenha sido detectado nas 9 amostras, foi observada a presença de 2 grupos de plasmídios distintos, correspondentes aos grupos amostrais Mup^R (resistentes a altos níveis de mupirocina) e Mup^{RM} (resistência mediana para mupirocina), os quais diferiram no valor da concentração mínima inibitória (CMI), nas regiões flangeadoras do gene *ileS-2* e também na capacidade de transferência do plasmídio. Através dos experimentos de conjugação, observou-se a habilidade do plasmídio Mup^{RM} ser auto-transferível, enquanto o plasmídio Mup^R, mostrou-se apenas transferível quando mobilizado por um outro plasmídio conjugativo. A análise genotípica através de eletroforese em campo pulsado (PFGE) mostrou que as 9 amostras resistentes à mupirocina pertenciam a pulstipos relacionados, onde as 3 amostras Mup^{RM} foram indistinguíveis e as 6 amostras Mup^R foram classificadas em diferentes subtipos e tipos.

Palavras-chave: mupirocina, *Staphylococcus haemolyticus*, plasmídio, IS257, conjugação, mobilização.

ABSTRACT

“CHARACTERIZATION OF MUPIROCIN RESISTANCE IN *Staphylococcus haemolyticus* OF NOSOCOMIAL ORIGIN”

Natália do Carmo Ferreira

Orientadora: Marcia Giambiagi-deMarval

Mupirocin is topically used as an antimicrobial agent with excellent activity against *Staphylococcus* spp. This drug has been used successfully to treat skin infections, and eradicate *Staphylococcus aureus* nasal carriage in healthcare workers and patients. It has also been valuable in controlling outbreaks of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) samples. However, indiscriminate use of this antimicrobial has contributed to the increasing emergence of resistant strains. It has been proposed that *Staphylococcus haemolyticus*, species with the largest rate of isolates resistant to antimicrobials among coagulase-negative staphylococci (CNS), can act as a reservoir of resistance genes and contribute to their dissemination to other staphylococci. This work consists in the phenotypical and molecular characterization of resistance to mupirocin in *S. haemolyticus*. Our work is the first report to detect the transfer of mupirocin resistance from *S. haemolyticus* to *S. aureus*, reinforcing the hypothesis that SCN may contribute to the spread of resistance to mupirocin. The samples analyzed in this study were isolated from blood cultures in patients from the Marcilio Dias Naval Hospital. Seventy-five strains were tested for mupirocin susceptibility using disk diffusion method and 9 resistant samples were detected. Although the *ileS-2* gene responsible for mupirocin resistance was detected in those 9 samples, we observed 2 distinct groups of plasmids, corresponding to groups Mup^R (high-level mupirocin resistance) and Mup^{RM} (medium mupirocin resistance), which differ in minimal inhibitory concentration (MIC) values, in the regions flanking of the *ileS-2* gene and also in the ability to transfer the plasmid. Through conjugation experiments, we observed the ability of the plasmid Mup^{RM} to be self-transferable, while the plasmid Mup^R, proved to be transferable only when mobilized by another conjugative plasmid. Genotypic analysis by Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) showed that 9 mupirocin resistant isolates belong to the related PFGE types in which the 3 isolates Mup^{RM} were indistinguishable and the other 6 Mup^R isolates were classified into distinct PFGE subtypes and types.

Keywords: mupirocin, *Staphylococcus haemolyticus*, plasmid, IS257, conjugation, mobilization.

SUMÁRIO

Resumo	vii
Abstract	viii
Lista de siglas e abreviaturas	ix
Lista de tabelas	xii
Lista de ilustrações	xiii
1. Introdução	1
1.1. <i>Staphylococcus</i> spp.	1
1.1.1. Aspectos gerais	1
1.1.2. <i>Staphylococcus</i> coagulase positivos	3
1.1.3. <i>Staphylococcus</i> coagulase negativos	3
1.2. Histórico da resistência antimicrobiana em <i>Staphylococcus</i> spp.	5
1.2.1. Mupirocina	6
1.3. Elemento IS257	10
1.4. Conjugação bacteriana	14
2. Objetivo	19
3. Materiais e métodos	20
3.1. Estirpes bacterianas	20
3.2. Condições de cultivo e armazenamento das estirpes	20
3.3. Meios de cultura	21
3.4. Soluções e tampões	21
3.5. Caracterização da susceptibilidade à mupirocina	22
3.5.1. Teste de difusão a partir de discos de mupirocina	22
3.5.2. Teste-E para mupirocina	23
3.6. Metodologia de PCR	24
3.6.1. Extração de DNA total com tiocianato de guanidina	24
3.6.2. Iniciadores utilizados	25
3.6.3. Preparo do padrão de massa molecular	25

3.6.4. Reação de polimerase em cadeia (PCR) para confirmação da identificação de <i>S. haemolyticus</i>	26
3.6.5. PCR para amplificação do gene <i>ileS-2</i> nas amostras resistentes e para detecção dos elementos flanqueadores IS257	26
3.6.6. PCR “multiplex” para detecção simultânea da resistência à mupirocina e meticilina	27
3.6.7. Eletroforese de DNA em gel de agarose	27
3.7. Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)	27
3.8. Caracterização dos plasmídios de resistência à mupirocina	28
3.8.1. Cura do plasmídio	28
3.8.2. Extração de DNA plasmidial	29
3.8.3. Eletroforese de DNA plasmidial em gel de agarose	29
3.8.4. Transferência do plasmídio de resistência à mupirocina através de conjugação sobre membrana filtrante	31
3.8.5. “Southern Blot” e hibridização	31
4. Resultados	33
4.1. Análise da susceptibilidade das amostras à mupirocina	32
4.2. Confirmação da identificação das amostras resistentes à mupirocina	33
4.3. Detecção do gene <i>ileS-2</i> , determinante da resistência à mupirocina	34
4.4. Determinação da CMI para mupirocina através do método do Teste-E	35
4.5. Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos das amostras resistentes à mupirocina	37
4.6. Genotipagem das amostras de <i>S. haemolyticus</i> resistentes à mupirocina através de eletroforese em campo pulsado (PFGE)	37
4.7. PCR “multiplex” para detecção dos genes <i>ileS-2</i> e <i>mecA</i>	39
4.8. Cura da resistência à mupirocina	40
4.9. Teste-E para mupirocina antes e após o processo de cura da resistência à mupirocina	40
4.10. Perda do gene <i>ileS-2</i> após o processo de cura	41
4.11. Eletroforese do DNA plasmidial das cepas Mup ^{RM} e Mup ^R	42
4.12. Detecção dos elementos IS257 nas regiões flanqueadores do gene <i>ileS-2</i>	43
4.13. Transferência da resistência à mupirocina de uma amostra de <i>S. haemolyticus</i> Mup ^{RM} para uma cepa de <i>S. aureus</i> por conjugação	49
4.14. Transferência da resistência à mupirocina de uma amostra de <i>S. haemolyticus</i> Mup ^R para uma cepa de <i>S. aureus</i> por conjugação	50
4.15. Transferência do plasmídio Mup ^R , após conjugação com pIP501, de <i>S. haemolyticus</i> para <i>S. aureus</i>	50

4.16. Transferência do plasmídio Mup ^R após conjugação com pIP501, de <i>S. haemolyticus</i> para <i>S. aureus</i>	51
4.17. PCR para detecção do gene <i>ileS-2</i> nas cepas transconjugantes	53
5. Discussão	54
6. Conclusões	60
7. Referências bibliográficas	61
8. Anexo	67

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Ap- Ampicilina

ATP- Adenosina trifosfato

BHI- “Brain Heart Infusion” (Infusão de cérebro e coração bovino)

Cef- Cefoxitina

Clin- Clindamicina

CLSI- “Clinical and Laboratory Standards Institute”

CMI- Concentração mínima inibitória

Cn- Cloranfenicol

DNA- “Deoxyribonucleic Acid” (Ácido Desoxirribonucléico)

dNTPs- Desoxirribonucleotídeos 5'-trifosfatados

EDTA- “Ethylene Diamine Tetraacetic Acid” (Ácido etileno diamino tetra-acético)

Em- Eritromicina

EUA- Estados Unidos da América

F- “Forward” (direto)

FC- Frequência de conjugação

g- Gravidade

Gen- Gentamicina

h- Hora(s)

HCl- Ácido clorídrico

Kb- Kilobases

M- Molar

mM- milimolar

min- Minuto(s)

mRNA- “messenger Ribonucleic Acid” (RNA mensageiro)

MRSA- “Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*” (*Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina)

Mup^I- Resistência a níveis intermediários de mupirocina

Mup^R- Resistência a altos níveis de mupirocina

Mup^{RM}- Resistência mediana à mupirocina

Mup^S- Sensibilidade à mupirocina

NaCl- Cloreto de sódio

Oxa- Oxacilina

PCR- “Polymerase Chain Reaction” (Reação de polimerase em cadeia)

Pen- Penicilina

pH- Potencial hidrogeniônico

PFGE- “Pulsed-Field Gel Electrophoresis” (Gel de eletroforese em campo pulsado)

p/v- Peso sobre volume

R - “Reverse” (reverso)

Rif- Rifampicina

RNA- “Ribonucleic Acid” (Ácido Ribonucléico)

SCN- *Staphylococcus* coagulase negativo(s)

SDS- “Sodium Dodecyl Sulfate” (Dodecil sulfato de sódio)

Subsp- Subespécie

Sulfa/trim- Sulfametoxazol/trimetoprim

Taq - *Thermus aquaticus*

TBE- Tampão Tris- ácido bórico- EDTA

Tc- Tetraciclina

TE- Tampão de Tris – EDTA

tRNA- RNA transportador

TSB- “Tryptone Soy Broth” (Caldo soja triptona)

TSST-1- “Toxic Shock Syndrome Toxin-1” (Toxina 1 da Síndrome do Choque Tóxico)

U- Unidade(s)

UV- Ultravioleta

V- Volts

Van- Vancomicina

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estirpes bacterianas utilizadas neste trabalho.	20
Tabela 2: Iniciadores utilizados nos experimentos de amplificação por PCR.	25
Tabela 3: Avaliação da susceptibilidade à mupirocina em estirpes de <i>S. haemolyticus</i> isoladas no Hospital Naval Marcílio Dias no período entre 2005 e 2008.	33
Tabela 4: Susceptibilidade antimicrobiana das estirpes resistentes à mupirocina.	37
Tabela 5: Porcentagens de cura da resistência à mupirocina.	40
Tabela 6: Frequência de conjugação de um plasmídio Mup ^{RM} de <i>S. haemolyticus</i> para <i>S. aureus</i> .	50
Tabela 7: Frequência de conjugação do plasmídio pIP501 de <i>E. faecalis</i> para <i>S. haemolyticus</i> .	51
Tabela 8: Frequência de conjugação dos plasmídios Mup ^R /pIP501 de <i>S. haemolyticus</i> para <i>S. aureus</i> .	52

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: A- Estrutura química da mupirocina (ácido pseudomônico A). B- Estrutura química do aminoácido isoleucina (ácido 2-amino 3-metil pentanóico).	7
Figura 2: Mecanismo de ação da mupirocina.	8
Figura 3: Elementos de transposição.	11
Figura 4: Mapa estrutural do plasmídeo pSK41 de <i>S. aureus</i> .	12
Figura 5: Mapas dos plasmídios da família do pJ3356.	13
Figura 6: Mecanismo de transferência de DNA por conjugação entre bactérias Gram-negativas.	15
Figura 7: Mecanismo de mobilização plasmidial.	17
Figura 8: Locais de anelamento dos iniciadores ao elemento IS257 e ao gene <i>ileS-2</i> .	25
Figura 9: Teste de difusão a partir de disco. A: estirpe sensível, MD20; B: estirpe resistente a níveis intermediários, MD22; C: estirpe resistente a altos níveis, MD19.	32
Figura 10: Eletroforese em gel de agarose - Amplificação de um fragmento espécie-específico do gene <i>mvaA</i> (271 pb) de <i>S. haemolyticus</i> .	33
Figura 11: Eletroforese em gel de agarose - Detecção de um <i>amplicon</i> de 237 pb correspondente ao gene <i>ileS-2</i> .	34
Figura 12: Teste-E para mupirocina.	36
Figura 13: Gel de eletroforese em campo pulsado – Perfil de restrição das estirpes com a enzima <i>SmaI</i> .	38
Figura 14: Eletroforese em gel de agarose - Amplificação por PCR <i>multiplex</i> dos fragmentos de 237 pb e 154 pb dos genes <i>ileS-2</i> e <i>mecA</i> .	39
Figura 15: Teste-E para mupirocina.	41
Figura 16: Eletroforese em gel de agarose - Detecção de um <i>amplicon</i> de 237 pb, correspondente ao gene <i>ileS-2</i> , nas estirpes originais e ausência de amplificação nas respectivas curadas.	42
Figura 17: A- Eletroforese de DNA plasmidial das estirpes Mup ^R , Mup ^{RM} e	43

MB196. **B-** Hibridização com sonda contendo o *ileS-2*.

Figura 18: Eletroforese em gel de agarose- Amplificação das regiões 44
flanqueadoras do gene *ileS-2*.

Figura 19: Hipótese de arranjo das regiões flanqueadoras nas estirpes Mup^{RM}. 45

Figura 20: Eletroforese em gel de agarose de PCR- Amplificação das regiões 46
flanqueadoras do gene *ileS-2*.

Figura 21: Hipóteses de arranjo para as regiões flanqueadoras do gene *ileS-2* nas 47
estirpes Mup^R.

Figura 22: Eletroforese em gel de agarose – Amplificação das regiões entre duas 48
cópias do gene *ileS-2*.

Figura 23: Hipótese de arranjo das cópias do gene *ileS-2* das estirpes MD2 e 48
MD56.

Figura 24: Transferência da resistência à mupirocina através do processo de 49
conjugação.

Figura 25: Teste-E para mupirocina na estirpe MD46 antes e após a aquisição do 51
plasmídeo pIP501.

Figura 26: Teste-E para mupirocina para detecção da transferência do plasmídeo 52
Mup^R por mobilização pelo pIP501.

Figura 27: Eletroforese em gel de agarose – Detecção de um *amplicon* de 237 pb 53
do gene *ileS-2* nas estirpes transconjugantes.

1.1. *Staphylococcus* spp.

1. 1. Aspectos gerais

As espécies do gênero *Staphylococcus* pertencem à família *Staphylococcaceae*. Esse gênero é composto por bactérias em forma de cocos Gram-positivos, com 0,5 – 1,5 µm de diâmetro, que podem ocorrer isolados, aos pares, em tétrades, em pequenas cadeias contendo 3 a 4 células, ou irregulares, na forma de cachos. Esses micro-organismos são imóveis, resistentes à bacitracina, não formam esporos, são anaeróbios facultativos, produzem a enzima catalase (com exceção de *S. aureus* subsp. *anaerobius*), são capazes de crescer em até 10% de NaCl e sua temperatura ótima de crescimento se encontra entre 30 e 37°C. As colônias normalmente são opacas e podem ser brancas ou cremes e algumas vezes amareladas (HOLT *et al.*, 1994; BANNERMAN & PEACOCK, 2007).

O gênero *Staphylococcus* compreende 43 espécies e 24 subespécies (EUZÈBY, 2010), as quais estão amplamente difundidas na natureza e são encontradas principalmente na pele e mucosas de mamíferos e pássaros, como parte da microbiota anfibiônica desses animais. Geralmente esses micro-organismos mantêm uma relação comensal ou simbiótica com o seu hospedeiro. Entretanto, em casos de rompimento da barreira epitelial, baixa da imunidade do hospedeiro ou de inoculação por dispositivos invasivos, pode haver o desenvolvimento de infecções estafilocócicas (BANNERMAN & PEACOCK, 2007). Nessas condições, esses micro-organismos podem penetrar e colonizar sítios estéreis no hospedeiro, podendo estabelecer uma infecção, dependendo da capacidade desses micro-organismos de se aderirem ao hospedeiro ou à superfície do dispositivo invasivo, de evadirem das defesas do sistema imune, se multiplicarem e expressarem produtos que causam danos ao paciente. Devido a essas características, as bactérias pertencentes a este gênero são importantes agentes etiológicos em infecções hospitalares (VERHOEF, 1997).

Diversos fatores de virulência são responsáveis pelos sintomas e a gravidade das infecções estafilocócicas, tais como: a síntese da enzima coagulase, que promove a formação de coágulos de fibrina que se depositam sobre os cocos protegendo-os da ação das células do sistema imune do hospedeiro; as citocinas, que incluem as hemolisinas α ,

β , γ e δ , capazes de promover lise celular, principalmente de hemácias do hospedeiro; as enzimas com atividade nuclease, as proteases, lipases, hialuronidase e colagenase, que facilitam a invasão dos tecidos do hospedeiro; a proteína leucocidina, que promove lise de leucócitos; as toxinas esfoliativas, responsáveis pela descamação da pele; as enterotoxinas estafilocócicas, que causam intoxicação alimentar; a toxina da síndrome do choque tóxico 1 (TSST-1), responsável por choque sistêmico; e o biofilme, que promove a aderência das bactérias, protegendo-as contra a ação de antibióticos e contra o sistema imune, dificultando o tratamento (DINGES, ORWIN & SCHLIEVERT, 2000; CUCARELLA *et al.*, 2004; CUNHA, CALSOLARI & JUNIOR, 2007).

As infecções provocadas por *Staphylococcus* variam de infecções cutâneas, como impetigo, furúnculo, e abscessos subcutâneos; a infecções sistêmicas, como a síndrome da pele escaldada estafilocócica e a síndrome do choque tóxico (IWATSUKI *et al.*, 2006). A colonização por *Staphylococcus* pode ocorrer logo após o nascimento e esses micro-organismos podem fazer parte da microbiota ou podem causar diversos tipos de infecções, como as citadas anteriormente. Infecções estafilocócicas também são comuns em adultos, principalmente quando estes se encontram em ambiente hospitalar, onde a presença de feridas profundas e dispositivos médicos, como cateteres e próteses, fornecem o ambiente para o desenvolvimento de *Staphylococcus*. As doenças estafilocócicas nosocomiais são definidas como as que são adquiridas após a hospitalização do paciente ou realização de procedimento ambulatorial ou ainda, as que se manifestam após a alta do paciente, mas são diretamente relacionadas com a internação ou procedimento hospitalar. A incidência dessas doenças tem aumentado nas últimas décadas, em parte devido ao aumento do uso de dispositivos intravasculares e à alta prevalência de pacientes imunodebilitados (SHINEFIELD & RUFF, 2009).

A multirresistência aos antimicrobianos é uma característica comum observada em estirpes hospitalares estafilocócicas, e inclui além da resistência à oxacilina e a outros β -lactâmicos, a resistência aos aminoglicosídeos, cloranfenicol, eritromicina, quinolonas, sulfametoxazol/ trimetoprim e tetraciclina (MARANAN *et al.*, 1997). A capacidade de aquisição de resistência aos antimicrobianos pelos *Staphylococcus* é um dos fatores que contribui para que esses micro-organismos sejam reconhecidos como um dos principais problemas de saúde pública no mundo (DIEKEMA *et al.*, 2001).

As espécies do gênero *Staphylococcus* podem ser divididas em dois grandes grupos: os *Staphylococcus* coagulase positivos (SCP), que são capazes de produzir a coagulase, enzima que coagula o plasma, com a espécie *Staphylococcus aureus* como a

principal representante do grupo; e os *Staphylococcus* coagulase negativos (SCN), grupo onde é encontrada a maior parte das espécies do gênero, as quais não produzem a enzima coagulase (SMITH & JARVIS, 1999).

1.1.2. *Staphylococcus* coagulase positivos

Poucas espécies do gênero *Staphylococcus* são coagulase positivas, dentre elas destacam-se: *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. delphini*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans* e *S. hyicus* (KLOOS & BANNERMAN, 1995). Dentre elas, a espécie considerada mais patogênica e conseqüentemente, de maior importância em infecções humanas é *S. aureus* (BOYCE, 1996), tanto em infecções de origem comunitária quanto de origem hospitalar (SCANVIC *et al.*, 2001). Esse micro-organismo pode causar intoxicação alimentar, foliculite, impetigo, bacteriemia e osteomielite em humanos; e mastite, artrite e infecções do trato urinário em animais (MARTINS & CUNHA, 2007). Os estafilococos são facilmente transmitidos pelas mãos e luvas dos profissionais de saúde para os pacientes ou para o ambiente, sendo esta a principal rota de transmissão deste patógeno (SHINEFIELD & RUFF, 2009) e uma vez em seu hospedeiro, as narinas anteriores constituem o principal local de colonização estafilocócica, embora a colonização da orofaringe, trato gastrointestinal inferior e períneo ocorra frequentemente. A colonização assintomática, incluindo o estado de portador nasal de *S. aureus*, parece ser um fator de risco significativo para o desenvolvimento de infecção (SIMOR & DANEMAN, 2009). Cerca de 30% dos indivíduos sadios são carreadores nasais de *S. aureus* (ROGERS, FEY & RUPP, 2009). A relação entre colonização estafilocócica e o desenvolvimento de infecção é complexa. Estima-se que o risco de infecção em carreadores nasais de *S. aureus* aumente de 2 a 12 vezes quando comparado com indivíduos não portadores (SIMOR & DANEMAN, 2009).

Embora todas as estirpes de *S. aureus* sejam relevantes, aquelas que representam maior problema terapêutico, no âmbito das infecções hospitalares, são as estirpes de *S. aureus* resistentes à metilina (MRSA) (BOYCE *et al.*, 1994). Estirpes de MRSA são frequentemente resistentes a uma ampla variedade de agentes antimicrobianos, incluindo aminoglicosídeos, β -lactâmicos, lincosamidas, macrolídeos, quinolonas, tetraciclina, além de antissépticos, desinfetantes e metais pesados (BOYCE *et al.*, 1994; GRUBB, 1998).

1.1.3. *Staphylococcus coagulase negativos*

Os SCN constituem um grupo no qual é encontrada a maior parte das espécies do gênero *Staphylococcus* (KLOOS & BANNERMAN, 1994; JARLOV, 1999). Esses micro-organismos, até a década de 70, eram considerados habitantes não patogênicos da pele, sendo vistos apenas como contaminantes em estirpes clínicas (KLOOS & BANNERMAN, 1994). Entretanto, o aumento do número de pacientes imunocomprometidos ou em uso de procedimentos invasivos contribuiu para o aumento das taxas de isolamento de SCN e, a partir de então, esses micro-organismos passaram a ser reconhecidos como patógenos oportunistas nesses pacientes (BANNERMAN & PEACOCK, 2007) onde os SCN evoluem de comensais a patógenos, somente depois de um dano em uma barreira natural. No caso da pele, esse dano pode ocorrer por trauma, inoculação ou através da implantação de dispositivos médicos invasivos (OTTO, 2004).

Como um grupo, os SCN estão entre as bactérias mais frequentemente isoladas em laboratórios de microbiologia clínica e estão se tornando cada vez mais importantes devido à sua ação como patógenos em infecções adquiridas em hospitais (VON EIFF, PETERS & HEIFFMANN, 2002). Um dos fatores que podem explicar a frequente colonização por SCN na superfície dos dispositivos médicos invasivos, é a produção de polissacarídeos extracelulares, responsáveis pela formação de biofilme na superfície desses dispositivos (KLOOS & BANNERMAN, 1994). Em um biofilme as bactérias ficam envoltas por uma matriz extracelular que as protege contra a ação dos antibióticos e o ataque do sistema imune. Além da habilidade que alguns SCN possuem de formar biofilme, outros fatores específicos envolvidos na patogênese deste grupo vêm sendo descritos. Dentre eles, a produção de delta toxina, responsável pela formação de poros nas membranas dos eritrócitos, hemácias e outras células de mamíferos, a produção de lipases, proteases e outras exoenzimas que possivelmente contribuem para a sua persistência e para a lesão no tecido do hospedeiro (OTTO, 2004).

A espécie *Staphylococcus epidermidis* é a predominante em espécimes de origem humana, representando de 37 a 95% das estirpes isoladas, dentre os SCN (JARLOV, 1999). Esta espécie tem sido isolada de endocardites, infecções de sítio cirúrgico e do trato urinário, líquido cefalorraquidiano, infecções associadas a próteses articulares e a cateter intravascular (ROGERS, FEY & RUPP, 2009), sendo responsável por 50-70% das infecções relacionadas a cateteres (VON EIFF, PETERS & HEIFFMANN, 2002). Em bacteriemias, *S. epidermidis* é o principal micro-organismo

isolado (BANNERMAN, 2003), com mortalidade variando de 10 a 34% (KLOOS & BANNERMAN, 1999).

S. haemolyticus é a segunda espécie mais encontrada em infecções nosocomiais e, alguns pesquisadores têm reconhecido estirpes de *S. haemolyticus* como causa de infecções graves, tais como infecções de sítio cirúrgico ou associadas a próteses, peritonites, endocardites, bacteriemias e meningites (KLOOS & BANNERMAN, 1999; FALCONE *et al.*, 2007). A resistência a múltiplos fármacos tem sido documentada como uma característica entre estirpes de *S. haemolyticus* (SHITTU *et al.*, 2004). Dentre os SCN, essa espécie tem apresentado a maior taxa de estirpes resistentes aos antimicrobianos (SCHUENCK *et al.*, 2008) e os glicopeptídeos constituem o fármaco de escolha para o tratamento de infecções causadas por esses micro-organismos multirresistentes. No entanto, o aumento do uso dos glicopeptídeos, recentemente tem contribuído para a emergência de estirpes com susceptibilidade diminuída a esta classe de antibiótico, limitando as opções terapêuticas para o tratamento das infecções causadas por este patógeno multirresistente (NATOLI *et al.*, 2009).

O rápido aumento da frequência de isolamento de estirpes resistentes entre os SCN pode ser explicado pelo fato de algumas espécies desse gênero possuírem plasmídios em grande número, os quais podem ser transferidos entre diferentes espécies desse grupo e contribui para um alto índice de infecções hospitalares (KLOOS & BANNERMAN, 1994).

A facilidade de aquisição de genes de resistência por estirpes de SCN somada às opções terapêuticas limitadas disponíveis para o tratamento das infecções causadas por esses micro-organismos (ELTRINGHAM, 1997), tem contribuído para a rápida disseminação dessas estirpes inter e intra-hospitais, elevando o custo do tratamento de infecções causadas por essas bactérias (CARBON, 1999).

1.2. Histórico da resistência antimicrobiana em *Staphylococcus*

Desde a introdução de antimicrobianos na prática clínica, nos anos 40, os micro-organismos têm demonstrado uma notável habilidade em exibir diferentes mecanismos de resistência contra essas substâncias. A ampla utilização de antibióticos, tanto na comunidade quanto em hospitais, tem contribuído para o aparecimento da resistência bacteriana (WEY, 1995).

Na década de 40, com a introdução da penicilina no tratamento de infecções estafilocócicas, houve uma diminuição na taxa de mortalidade por *S. aureus*. Entretanto, no final da década de 40, nos hospitais da Inglaterra, mais de 50% das estirpes de *S. aureus* eram resistentes à penicilina, devido à produção de uma penicilinase (β -lactamase) (MATOUSKOVA & JANOUT, 2008). Em 1959, com a introdução das penicilinas semissintéticas, meticilina e oxacilina, ocorreu um grande avanço no tratamento das infecções estafilocócicas causadas por estirpes produtoras de penicilinas, diminuindo consideravelmente os índices de mortalidade por essas infecções (JOHN & BARG, 1996). Entretanto, o primeiro relato de *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) foi publicado em 1961, pouco depois do lançamento deste fármaco (HIRAMATSU *et al.*, 2001). De acordo com Martins & Cunha (2007), o principal problema da resistência à meticilina é que infecções causadas por MRSA são difíceis de serem tratadas, com esses micro-organismos em alguns casos, sendo sensíveis somente aos glicopeptídeos e fármacos experimentais. A vancomicina, pertencente à classe dos glicopeptídeos, permaneceu um agente ativo contra MRSA e SCN e, por este motivo, nos anos seguintes foi sendo cada vez mais utilizada. No entanto, a partir dos anos 90 até o presente, a emergência de estirpes resistentes à vancomicina também ocorreu em uma proporção significativa, com o primeiro relato de resistência em *Enterococcus* e, posteriormente, em SCN e *S. aureus* (MANFREDI & SABBATANI, 2010).

No grupo dos SCN, as espécies *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* representam uma grande preocupação no que diz respeito à resistência antimicrobiana, pois frequentemente são resistentes aos principais agentes antiestafilocócicos e são importantes causas de infecções associadas a dispositivos médicos invasivos (LECLERCQ, 2009).

A resistência a múltiplos fármacos é comum em *S. epidermidis* e ainda mais comum em *S. haemolyticus*. Menos de 30% de estirpes de *S. epidermidis* circulantes em ambiente hospitalar são sensíveis à oxacilina, e somente 40%, 45-60% e 45% são sensíveis à gentamicina, clindamicina e ciprofloxacino, respectivamente. A resistência aos glicopeptídeos, normalmente associada à resistência à meticilina, tem sido relatada em *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* (FLUIT *et al.*, 2001).

Além de apresentar papel potencial como patógenos, suspeita-se que os SCN, resistentes a múltiplos fármacos, atuem como reservatório de genes de resistência para *S. aureus*, dentre os quais, os genes *mecA* e *ileS-2*, determinantes da resistência à

meticilina e mupirocina, respectivamente (NUNES *et al.*, 1999; LECLERCQ, 2009). Corroborando essa hipótese, nosso grupo mostrou um ciclo no qual o plasmídeo pMG1, o qual possui determinantes gênicos relacionados com a resistência à mupirocina, foi transferido *in vitro* de *S. aureus* para *S. epidermidis* e deste para *S. aureus* (BASTOS *et al.*, 1999). Dados de estudos recentes conduzidos na França relatam que 3,5% dos pacientes estudados eram colonizados por *S. aureus* sensíveis à meticilina e SCN resistentes à meticilina, mostrando que as oportunidades para a transferência do gene *mecA* não são raras (LECLERCQ, 2009).

Diante desse quadro alarmante, com estirpes estafilocócicas multirresistentes disseminadas no ambiente hospitalar, e também na comunidade, aumenta a necessidade do uso de métodos alternativos para o tratamento e o controle de infecções causadas por esses micro-organismos (GILL *et al.*, 2005).

1.2.1. Mupirocina

A mupirocina (ácido pseudomônico A) é um antibiótico de ocorrência natural produzido pela fermentação da cultura de *Pseudomonas fluorescens*, que possui importante atividade contra cocos Gram-positivos (THOMAS *et al.*, 2010) e com uma estrutura química particular, formada por uma cadeia lateral de ácidos graxos ligada ao ácido mônico por uma ligação do tipo éster (Figura 1A). Essa estrutura mimetiza o esqueleto carbônico da isoleucina (Figura 1B), competindo assim com este aminoácido pelo sítio ativo da isoleucil-tRNA-sintetase bacteriana. Por causa desta inibição competitiva, não é catalisada a ativação do tRNA da isoleucina para a formação de isoleucil-tRNA, conseqüentemente não há incorporação deste aminoácido à cadeia polipeptídica nascente, interrompendo a síntese protéica bacteriana (Figura 2).

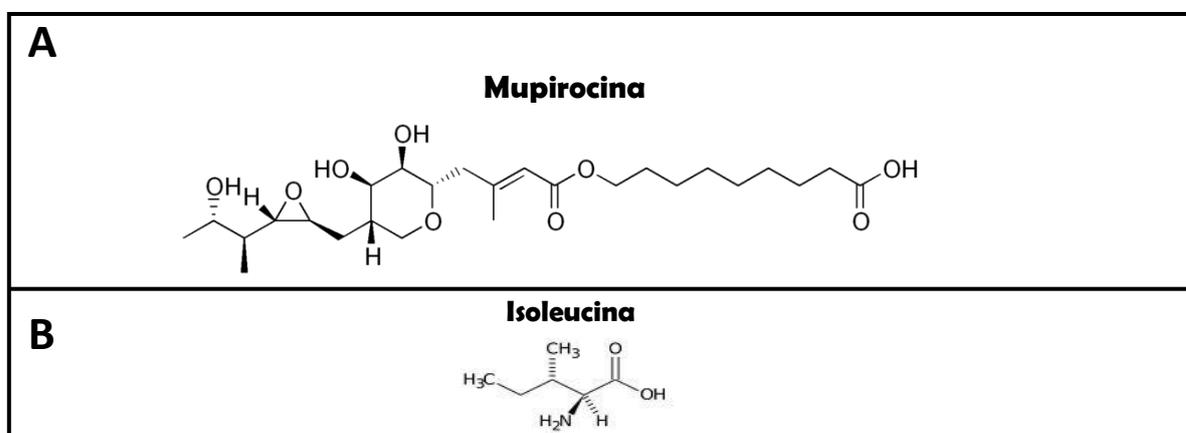


Figura 1: A- Estrutura química da mupirocina (ácido pseudomônico A). B- Estrutura química do aminoácido isoleucina (ácido 2-amino 3-metil pentanóico). Adaptado de VERMELHO, BASTOS & SÁ, 2008.

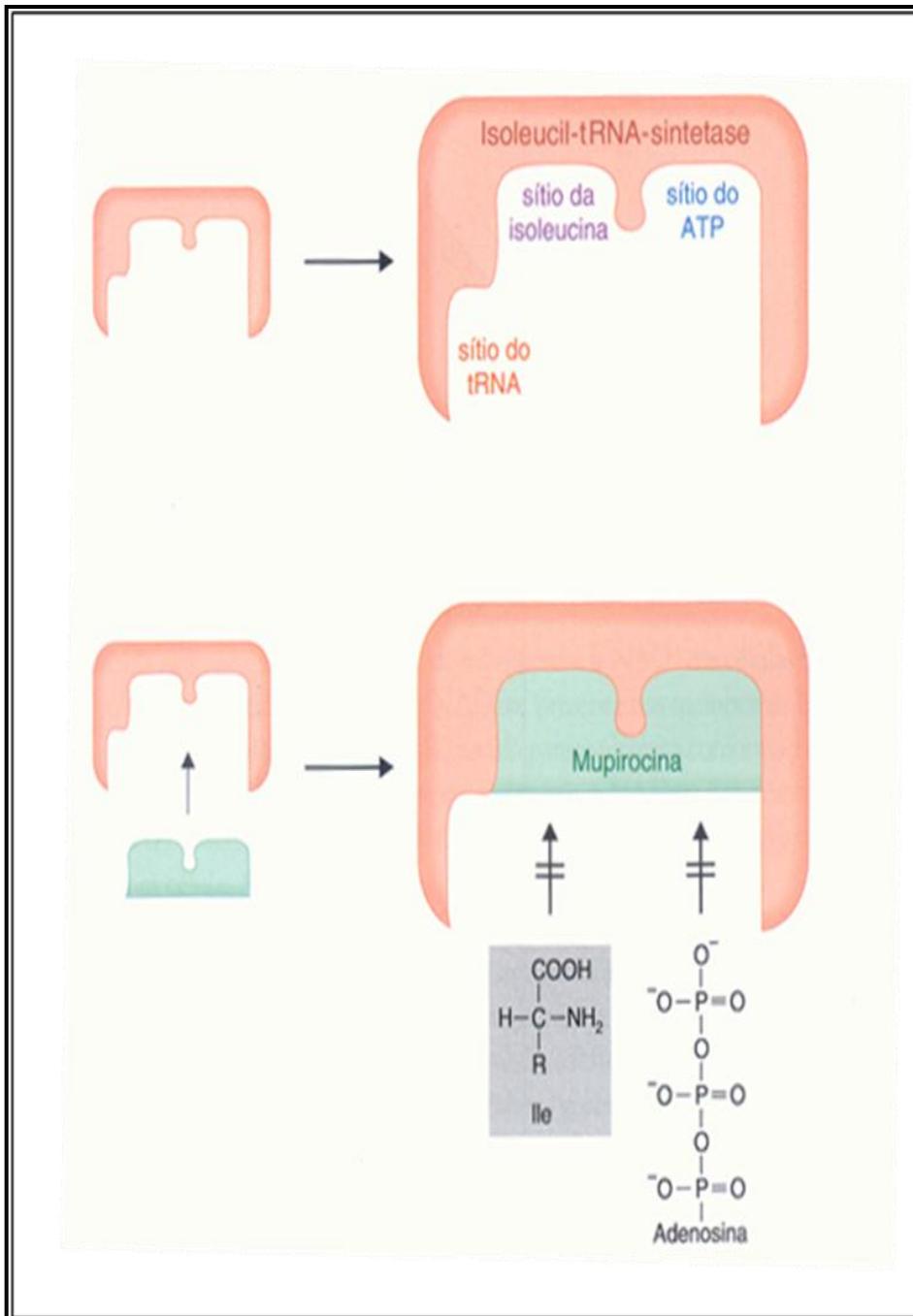


Figura 2: Mecanismo de ação da mupirocina (VERMELHO, BASTOS & SÁ, 2008).

A ação terapêutica da mupirocina é bastante específica, pois a afinidade pela isoleucil-tRNA sintetase de mamíferos é muito baixa, o que contribui para a ausência de toxicidade *in vivo*. O espectro de atividade antibacteriana inclui a maioria dos cocos Gram-positivos e alguns micro-organismos Gram-negativos, como *Neisseria* spp., *Haemophilus* spp. e *Mycoplasma* spp. No entanto, o uso clínico é direcionado, principalmente, aos cocos Gram-positivos (ELTRINGHAM, 1997). Além da sua baixa toxicidade, a mupirocina possui pouca atividade contra membros da microbiota saprófita da pele como corinebactérias, micrococos e *Propionibacterium* spp., que fazem parte dos mecanismos de defesa naturais contra infecções dermatológicas (SUTHERLAND *et al.*, 1985).

Estudos efetuados em animais e seres humanos mostraram que a mupirocina é bem absorvida após administração oral ou parenteral, entretanto, no plasma, possui uma meia-vida inferior a 30 min, o que invalida seu uso sistêmico. Esta meia-vida curta é decorrente da rápida hidrólise das ligações do tipo éster por ação de esterases hepáticas ou renais, que degradam a molécula até ácido mônico, um metabólito sem atividade antibacteriana, que é excretado pela via urinária (CASEWELL & HILL, 1985).

A mupirocina é considerada o melhor antimicrobiano tópico disponível e tem sido utilizada na prática clínica desde 1985, com o objetivo de eliminar o estado de carreador nasal de *S. aureus* em ambientes hospitalares, onde a colonização nasal por *S. aureus* é um fator de risco para o desenvolvimento de infecções estafilocócicas (ELTRINGHAM, 1997; COATES, BAX & COATES, 2009). Essa medida profilática tem como objetivo prevenir a infecção por *S. aureus* e controlar a disseminação deste patógeno (MONGKOLRATTANOTHAI *et al.*, 2009). A aplicação intranasal diária de mupirocina durante 5 dias, tem sido segura e bem tolerada, sendo capaz de erradicar a colonização nasal por *S. aureus* por pelo menos 4 semanas após o término do tratamento (SIMOR & DANEMAN, 2009).

Esse fármaco é comercializado em duas formas que contém a mesma concentração do princípio ativo (2%), mas diferem nas substâncias de base que o acompanham. A primeira a ser lançada no mercado (Bactroban®, GlaxoSmithKline), contém como base o polietilenoglicol, cuja ação irritativa desaconselha o seu uso em mucosas ou em lesões com perda da integridade da pele; esta composição também é contra indicada em feridas abertas ou queimaduras de pacientes com insuficiência renal, devido ao potencial nefrotóxico do polietilenoglicol absorvido (BRUNS *et al.*, 1982). O outro produto contendo mupirocina (Bactroban nasal®, GlaxoSmithKline),

comercializado em mais de noventa países, é um creme no qual o polietilenoglicol foi substituído por ingredientes inativos, tais como a parafina e uma mistura de ésteres de glicerina, que permitem seu uso em mucosas, feridas, queimaduras e impetigos, mesmo em nefropatas. Diferentes estudos mostraram que esta composição é altamente eficaz, segura e bem tolerada pelos pacientes (REAGAN, *et al.*, 1991).

Alternativamente à mupirocina, muitos agentes antimicrobianos têm sido usados com o objetivo de eliminar o estado de carreador nasal de *S. aureus*, tais como: bacitracina associada à polimixina B, bacitracina associada à rifampicina oral, clorexidina, gentamicina, neomicina, sulfadiazina de prata associada ao nitrato de cério e triclosan. Porém, muitos deles são ineficientes e resultam apenas na descolonização por um curto período de tempo ou são associados com efeitos adversos ou desenvolvimento de resistência ao agente utilizado, sendo a mupirocina o antibiótico tópico mais eficaz (SCHUENK *et al.*, 2004).

Entretanto, o uso indiscriminado e/ou prolongado da mupirocina tem resultado em um aumento do número de estirpes resistentes a altos níveis, principalmente entre SCN (HURDLE *et al.*, 2005). As estirpes resistentes à mupirocina são divididas em dois grupos: resistentes a baixos níveis ou níveis intermediários [Mup^I (CMI = 4-256 µg/mL)], resultantes de uma mutação na isoleucil-tRNA-sintetase nativa; e resistentes a altos níveis [Mup^R (CMI ≥ 512 µg/mL)], que se deve à aquisição do gene *ileS-2* ou *mupA*, o qual está associado a plasmídios de alto peso molecular (30 a 50 Kb). Este gene codifica uma isoleucil-tRNA sintetase alternativa, sem afinidade pela mupirocina (MONDINO *et al.*, 2003). Já foram detectadas estirpes resistentes a baixos níveis de mupirocina que possuíam uma cópia do gene *ileS-2* no cromossomo, adicionalmente ao gene *ileS-1*, que codifica a isoleucil-tRNA sintetase nativa; o que sustenta a hipótese do envolvimento do gene *ileS-2* com elementos de transposição (GIAMBIAGI-deMARVAL, SANTOS & BASTOS, 2005).

Os plasmídios que conferem resistência a altos níveis de mupirocina variam em tamanho, tendo sido observados plasmídios de 25 kb, carreando apenas o determinante gênico de resistência à mupirocina, e de 41,4 Kb, conferindo resistência ao cádmio, mupirocina, tetraciclina e trimetropim. Em alguns plasmídios, o gene *ileS-2* é flanqueado por uma sequência de inserção IS257, a qual pode estar presente em múltiplas cópias (ELTRINGHAM, 1997).

1.3. Elemento IS257

As sequências de inserção ou elementos IS constituem a forma mais simples dos elementos de transposição (Figura 3A) e carregam apenas genes relacionados com a sua mobilidade. Esses elementos são constituídos por uma molécula de DNA de fita dupla e nunca são encontrados de forma livre e autônoma no citoplasma das células, estando sempre associados a uma outra molécula de DNA, que pode ser o cromossomo, plasmídios ou DNA de bacteriófagos. As extremidades dos elementos IS são essenciais ao processo de transposição. Os genes presentes nessas extremidades codificam as transposases, que são endonucleases capazes de se ligar às repetições invertidas presentes nas extremidades do elemento e de causarem a sua transposição (MAHILLON & CHANDLER, 1998). Quando associados a outros elementos, os elementos IS podem mediar a transferência de informação genética intramolecular (quando a transposição ocorre de uma posição para outra dentro da mesma molécula de DNA) ou intermolecular (quando a transposição ocorre entre duas moléculas de DNA diferentes). Devido a essas características os elementos IS têm sido considerados uma ponte para a transferência de características adaptativas, tais como a resistência aos antibióticos, a virulência e novas capacidades metabólicas. Esses são apenas alguns dos efeitos dos elementos IS no genoma, onde eles também podem induzir a deleções, duplicações e rearranjos nas sequências de DNA. Em virtude desses efeitos os elementos IS são considerados fatores determinantes da plasticidade do genoma (TOUCHON & ROCHA, 2007).

Quando duas cópias de um elemento IS flanqueiam um segmento de DNA essa estrutura é capaz de agir em conjunto, tornando a região móvel. Essas estruturas são conhecidas como transpósons compostos (Figura 3 B). Esses transpósons possuem importante papel na disseminação da resistência aos antibióticos e na aquisição de genes (MAHILLON & CHANDLER, 1998) através de mecanismos que geralmente não requerem homologia de DNA entre o elemento IS e o local de inserção e, embora existam exemplos em que certos transpósons demonstram uma preferência por uma sequência de nucleotídeos em um determinado local de inserção, muitos outros não mostram preferência e se inserem em novos locais de maneira aleatória (BENNETT, 2008).

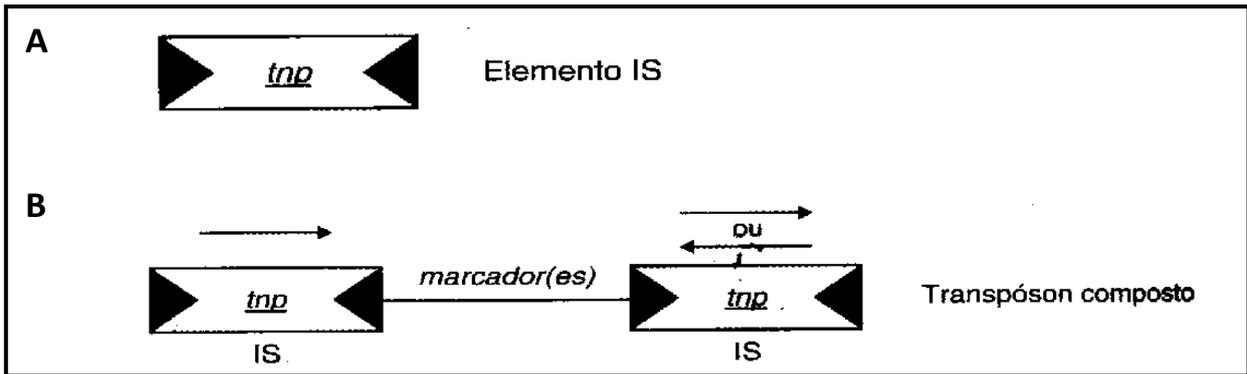


Figura 3: Elementos de transposição. **A-** Ilustração de um elemento IS, caracterizado por seu tamanho pequeno (geralmente menor do que 2 Kb). **B-** Representação de um transpóson composto formado por dois elementos IS presentes nas extremidades, flanqueando uma região central que contém um ou mais marcadores genéticos. Adaptado de VERMELHO, BASTOS & SÁ, 2008. *Tnp*- transpóson; IS- sequência de inserção.

Os elementos de inserção IS257, às vezes encontrado na forma de repetições diretas, são bastante frequentes em *Staphylococcus*. Esses elementos já foram encontrados em diversos plasmídios flanqueando genes de resistência (GILLESPIE *et al.*, 1987; MORTON *et al.*, 1995; NEEDHAM, NOBLE & DYKE, 1995). Uma das primeiras famílias de plasmídios descritas, contendo esses elementos foi a do pSK41, de *S. aureus*. Nesse plasmídio, os elementos IS257 flanqueiam o determinante da resistência para canamicina e gentamicina e fazem parte do transpóson Tn4001 (Figura 4).

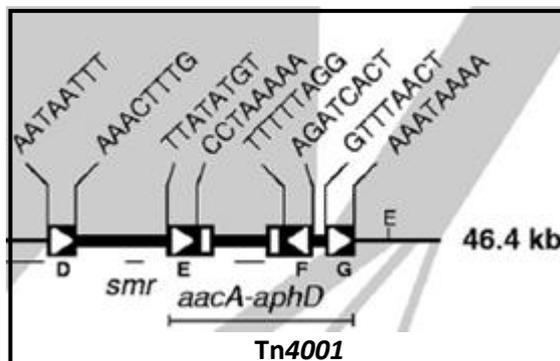


Figura 4: Estrutura parcial do plasmídio pSK41 de *S. aureus*. No plasmídio pSK41, os elementos IS257 (setas brancas) flanqueiam os determinantes de resistência aos

desinfetantes e antissépticos (região *smr*) e à canamicina e à gentamicina (região *aacA-aphD*). Adaptado de PÉREZ-ROTH *et al*, 2010.

Os elementos IS257 também têm sido frequentemente encontrados em plasmídios de resistência à mupirocina, flanqueando o gene *ileS-2* (MORTON *et al.*, 1995; NEEDHAM, NOBLE & DYKE, 1995; PÉREZ-ROTH *et al*, 2010). Das famílias de plasmídios que contém *ileS-2*, a primeira a ser descrita foi a do plasmídio pJ3356, de *S. aureus* (NEEDHAM *et al.*, 1994). Os mapas de restrição enzimática mostram que os componentes desta família se caracterizam pela presença de duplicações de genes (Figura 5), o que sugere que o elemento IS257 esteja envolvido nestes rearranjos em virtude de sua mobilidade. Assim, este poderia ser um mecanismo de rearranjo comum no aparecimento de novos plasmídios de resistência à mupirocina (NEEDHAM, NOBLE & DYKE, 1995).

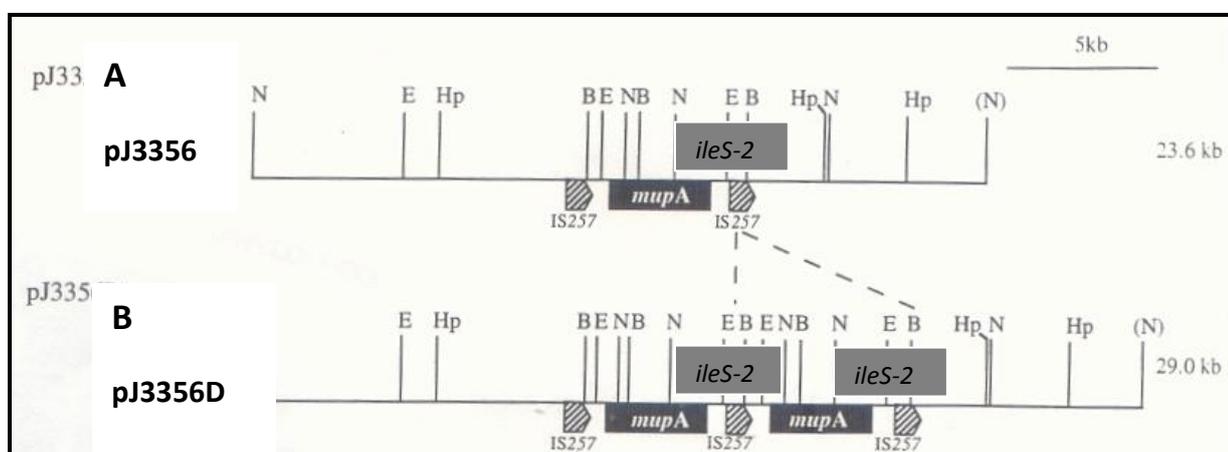


Figura 5: Estrutura parcial dos plasmídios da família do pJ3356. **A-** pJ3356 contendo uma cópia do *ileS-2*. **B-** pJ3356 D – plasmídio derivado de pJ3356, contendo uma cópia a mais do *ileS-2*. A linha tracejada indica eventos de duplicação e integração envolvendo os elementos IS257 (NEEDHAM, NOBLE & DYKE, 1995).

Ramsey e colaboradores (1996), após detectar o gene *ileS-2* no cromossomo de estirpes de *S. aureus* resistentes a níveis intermediários de mupirocina (Mup^I),

cogitaram a transposição desse gene a partir de um plasmídio, referindo como modelo o gene de resistência à gentamicina, que inicialmente considerado estritamente de localização plasmidial, foi posteriormente encontrado no cromossomo de várias estirpes de *Staphylococcus*.

Amplificações de regiões espaçadas entre uma cópia de IS257 e o gene *ileS-2* evidenciaram produtos de tamanhos variáveis (WOODFORD, 1998), sugerindo que a estrutura desses plasmídios possa constituir um modelo para a mobilidade de outros genes de resistência adquiridos por estafilococos (MORTON *et al.*, 1995). Foi proposto, que eventos mediados por IS257 sejam responsáveis pela heterogeneidade observada na localização do gene *ileS-2* (WOODFORD *et al.*, 1998). Esses elementos IS, às vezes com mais de uma cópia, favorecem a mobilidade de genes de resistência nos genomas bacterianos e assim, contribuem para a evolução dos plasmídios de estafilococos, incluindo os plasmídios de resistência à mupirocina (THOMAS & ARCHER, 1989).

Além dos mecanismos de transposição acima descritos, um outro mecanismo que contribui para a aquisição de genes de resistência é a conjugação, e por esse motivo, esse processo será discutido a seguir.

1.4. Conjugação bacteriana

A transferência horizontal de genes é um dos fatores que contribui para a disseminação de genes de resistência aos antimicrobianos. Embora a transformação e a transdução de plasmídios possam ser demonstradas *in vitro*, a conjugação parece ser o mecanismo mais importante na disseminação da resistência aos antibióticos na natureza.

A conjugação bacteriana é um exemplo de transferência horizontal de genes, através do qual, ocorre a transferência de material genético entre bactérias. Esse processo fornece uma rota para a rápida aquisição de novas informações genéticas (CURTISS, 1969; GOMIS-RÜTH & COLL, 2006).

A transferência de DNA através das membranas requer uma sofisticada maquinaria molecular que envolve a participação de várias proteínas no processamento e replicação do DNA, recrutamento celular e transporte de DNA e, ainda, proteínas das células doadora e receptora. Embora a conjugação bacteriana tenha sido descoberta na década de 40, só agora os mecanismos moleculares envolvidos neste processo estão sendo desvendados (GOMIS-RÜTH & COLL, 2006).

A conjugação é um processo unidirecional que permite a transferência de uma fita simples de DNA de uma célula doadora para uma célula receptora, através de um mecanismo que requer contato físico entre as células envolvidas. Após a transferência, a célula receptora torna-se um transconjugante e possui a capacidade de iniciar novos ciclos de conjugação (Figura 6). Através deste mecanismo altamente eficiente, algumas estirpes, que abrigam plasmídios conjugativos, podem disseminar essa nova informação para toda a população, em um curto período, permitindo a rápida propagação de genes de adaptação, de virulência e de resistência a fármacos (GOMIS-RÜTH & COLL, 2006).

A conjugação pode ser dividida didaticamente em três etapas: 1) a associação de diversas proteínas a uma região específica do DNA a ser transferido (formação do relaxossomo); 2) a formação do contato celular por um complexo protéico (conhecido como formação do par de acasalamento) e 3) a passagem do DNA da célula doadora para a receptora, seguida da replicação final do material genético nas duas células (Figura 6).

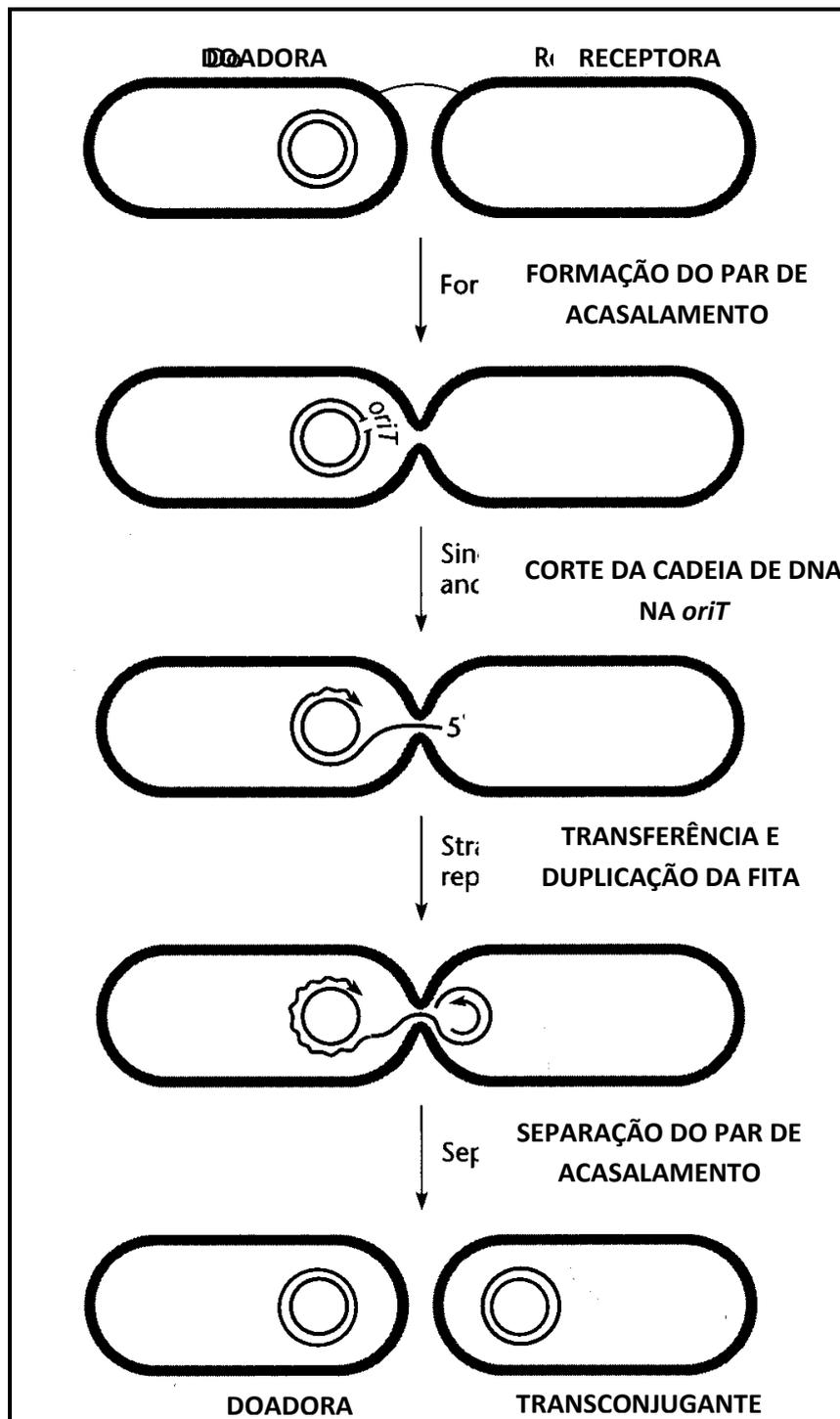


Figura 6: Mecanismo de transferência de DNA por conjugação entre bactérias Gram-negativas. Adaptado de SNYDER & CHAMPNESS, 2007.

Em linhas gerais, para que ocorra o início da conjugação é necessária a formação do contato celular, processo pelo qual as células doadora e receptora estabelecem uma conexão que permite a passagem de material genético (CURTISS, 1969). Em bactérias

Gram-negativas, a célula doadora apresenta uma estrutura denominada *pilus* sexual, que faz o reconhecimento da célula receptora. Após o reconhecimento, ocorre a retração do *pilus* e a aproximação das células, que então permanecem em íntimo contato, formando o par de acasalamento, que sinaliza para que ocorra o início da transferência de DNA. Em relação às Gram-positivas, o mecanismo pelo qual se estabelece o contato celular entre as células envolvidas na conjugação ainda não foi totalmente elucidado (SNYDER & CHAMPNESS, 2007; VERMELHO, BASTOS & SÁ, 2008).

O início da transferência de DNA se dá pelo reconhecimento de uma região específica do DNA, denominada região *oriT*, por endonucleases específicas. Essa região consiste em uma sequência de nucleotídeos plasmídeo-específica e geralmente apresenta características comuns, como a presença de repetições diretas ou invertidas (FRANCIA *et al.*, 2004). As endonucleases que reconhecem a *oriT* são codificadas pelos genes *tra*. Essas endonucleases promovem a clivagem da fita de DNA na *oriT*, originando a fita a ser transferida (fita T), dando início ao processo de transferência. O complexo formado pela ligação das endonucleases à *oriT* é chamado relaxossomo, pois o corte feito na fita de DNA resulta no relaxamento da tensão do DNA plasmidial superespiralado (NIKAIDO, 2009). Neste processo, participam fatores codificados pelo próprio plasmídeo conjugativo, como as proteínas Mob (de mobilização) e a região *oriT*, além de fatores da célula hospedeira (GROHMANN, MUTH & ESPINOSA, 2003).

Os plasmídios conjugativos possuem genes responsáveis por todas as etapas do processo de conjugação, desde a sua autoclivagem (antes da transferência) até a transferência propriamente dita e podem mobilizar qualquer DNA que contenha essa sequência *oriT*, incluindo DNA cromossômico e plasmídios mobilizáveis. Plasmídios mobilizáveis são aqueles que apresentam apenas genes responsáveis por sua autoclivagem, sendo dependentes dos plasmídios conjugativos para que sua transferência ocorra (GROHMANN, MUTH & ESPINOSA, 2003).

O processo de mobilização de um plasmídeo por um plasmídeo conjugativo encontra-se esquematizado na figura 7. Primeiramente, ocorre a formação de uma ponte entre a célula doadora e a célula receptora. Os genes envolvidos na formação dessa ponte encontram-se no operon *tra* do plasmídeo conjugativo. Esse plasmídeo comunica a formação da ponte não só para sua relaxase (uma das proteínas de mobilização), como também para a relaxase do plasmídeo mobilizável, presente na mesma célula. Com isso, a relaxase do plasmídeo mobilizável se liga à região *oriT* e promove sua clivagem, em seguida, a helicase promove a separação das fitas. Uma fita simples de DNA é

transferida para a célula receptora e após a transferência, ocorre a replicação dos plasmídios na célula receptora (SILVERMAN, 1997; SNYDER & CHAMPNESS, 2007). A síntese da cadeia complementar de DNA, após a transferência é feita pelas primases, que podem ser codificadas por plasmídios conjugativos ou por genes pertencentes à célula doadora (SNYDER & CHAMPNESS, 2007).

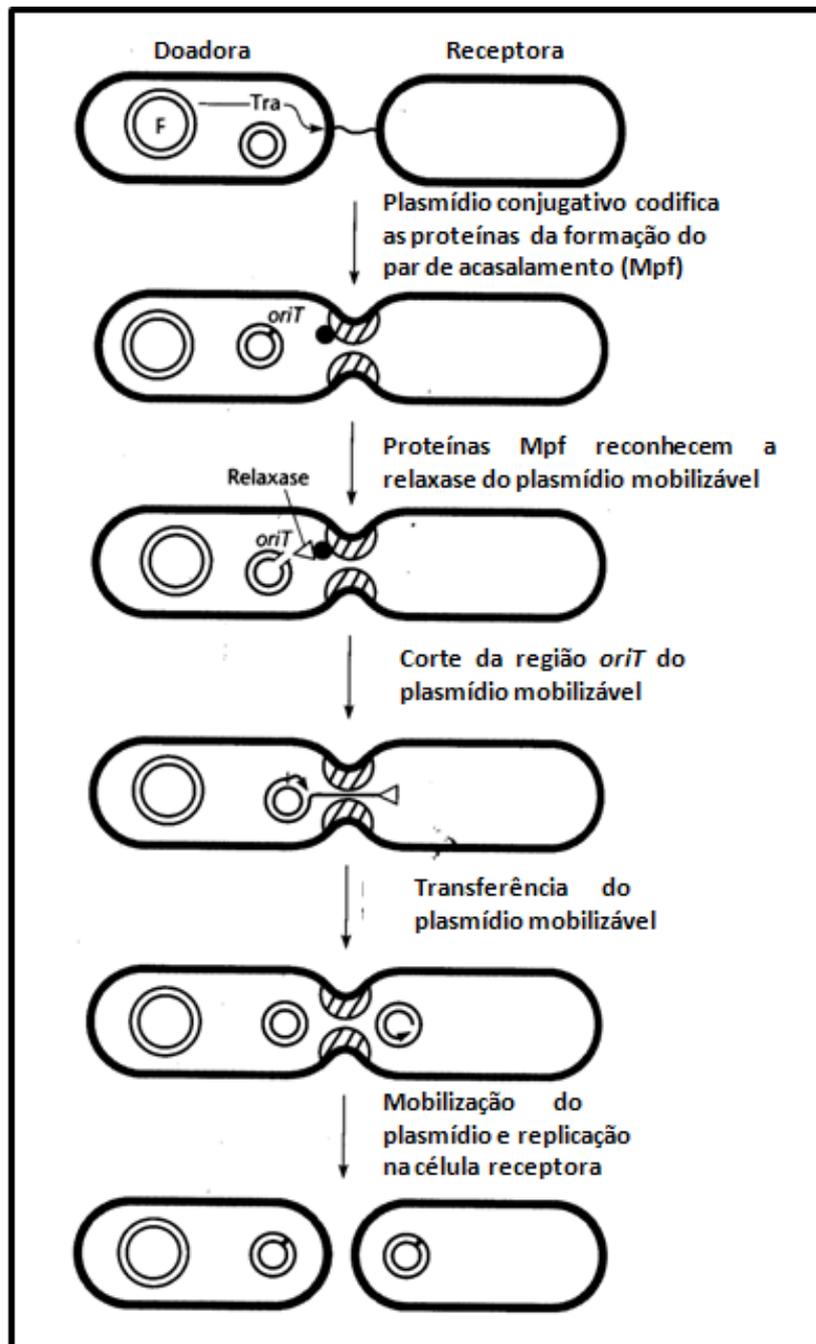


Figura 7: Mecanismo de mobilização plasmidial. Adaptado de SNYDER & CHAMPNESS, 2007).

O requisito necessário para que um plasmídeo possa ser mobilizado por um plasmídeo conjugativo, é que o plasmídeo mobilizável seja reconhecido pelas proteínas envolvidas na formação do par de acasalamento codificadas pelo plasmídeo conjugativo. Portanto, qualquer plasmídeo que possua sua própria relaxase pode se comunicar com as proteínas responsáveis pela formação do par de acasalamento e, então, ser mobilizado (SNYDER & CHAMPNESS, 2007).

O processo de conjugação *in vitro* já foi descrito para várias espécies estafilocócicas. O primeiro relato de transferência da resistência à mupirocina por conjugação foi feito em 1989, entre estirpes de *S. aureus* (RAHMAN, NOBLE & COOKSON, 1989). Posteriormente foram feitos relatos da transferência entre *S. haemolyticus* e *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* e *S. aureus* (no caso de *S. aureus* a estirpe utilizada como receptora não possuía sistema de restrição) (UDO, JACOB & MOKADAS, 1997) e *S. epidermidis* e MRSA, sugerindo que os SCN resistentes à mupirocina possam ser uma fonte do determinante *ileS-2* para MRSA (HURDLE *et al.*, 2005).

O nosso grupo caracterizou um plasmídeo denominado pMG1, responsável pela resistência a altos níveis de mupirocina, na primeira estirpe Mup^R isolada no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, da UFRJ. Este plasmídeo de 35 Kb, como dito anteriormente, foi transferido bidirecionalmente de *S. aureus* para *S. epidermidis* sugerindo que este último possa ser o reservatório do gene de resistência à mupirocina, sobretudo por ser um componente numericamente significativo da microbiota saprófita da pele e mucosa nasal (BASTOS *et al.*, 1999).

Visto que a mupirocina ainda é um antimicrobiano tópico muito eficaz na descolonização nasal de estirpes MRSA resultando na redução da incidência de infecções estafilocócicas e que o aumento da taxa de resistência à mupirocina implica no aumento do fracasso desta descolonização nasal, contribuindo para a permanência deste micro-organismo no ambiente hospitalar, são necessários estudos que auxiliem no entendimento da dinâmica de transferência de genes de resistência em populações de *Staphylococcus*.

2. OBJETIVO

O presente estudo teve como objetivo caracterizar estirpes nosocomiais de *S. haemolyticus*, quanto à resistência à mupirocina, diversidade clonal e diversidade de plasmídios responsáveis por esta resistência, assim como a sua capacidade de transferência para *S. haemolyticus* e *S. aureus*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Desenho do estudo

Foi realizado um estudo descritivo laboratorial que inicialmente consistiu na análise da susceptibilidade à mupirocina em 75 estirpes de *S. haemolyticus*. Em seguida, as estirpes resistentes foram caracterizadas quanto ao envolvimento de plasmídios nesta resistência e quanto à capacidade desses plasmídios serem transferidos para outras estirpes de estafilococos.

3.2. Estirpes bacterianas

As 75 estirpes clínicas de *S. haemolyticus* analisadas neste estudo foram isoladas de hemoculturas em pacientes no Hospital Naval Marcílio Dias, entre 2005 e 2008, onde foram identificadas através do sistema automatizado MicroScan WalkAway (Dade Behring, Inc, West Sacramento, CA, EUA). Essas estirpes serão designadas ao longo do trabalho com a sigla MD. A confirmação da identificação foi feita no presente estudo por PCR, conforme descrito no item 3.2.4. Cada estirpe foi armazenada em caldo TSB contendo 30% (v/v) de glicerol a -20°C.

3.3. Caracterização da susceptibilidade aos antimicrobianos

3.3.1. Teste de difusão a partir de disco

A susceptibilidade das 75 estirpes de *S. haemolyticus* à mupirocina foi analisada utilizando-se discos de 5 e 200 µg deste antimicrobiano. As estirpes resistentes à mupirocina foram selecionadas e então, verificou-se o perfil de susceptibilidade dessas estirpes frente aos discos dos seguintes antimicrobianos: ampicilina 10 µg, cefoxitina 30 µg, clindamicina 2 µg, cloranfenicol 30 µg, eritromicina 15µg, gentamicina 10 µg, oxacilina 1 µg, penicilina 10 U, rifampicina 16 µg, sulfametoxazol/trimetoprim 23,75 µg/ 1,25 µg, tetraciclina 30 µg e vancomicina 30 µg. Os discos utilizados foram fabricados pela CECON, São Paulo, Brasil.

As estirpes foram inicialmente semeadas em TSB por 18 h, a 37°C. O crescimento microbiano foi então diluído em salina 0,85% para obtenção do padrão de turvação equivalente a 0,5 da escala de Mc Farland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) e, em seguida, foi semeado em placa de ágar Müeller-Hinton, com auxílio de um *swab*, de forma a se obter um crescimento confluyente. Com o auxílio de uma pinça estéril, os discos foram depositados sobre o meio e a leitura dos halos de inibição foi feita após 18 h de

incubação, a 37°C. Os discos foram dispostos de forma a se ter uma distância de 2,5 cm entre eles. Foram colocados 4 discos por placa. As placas de ágar Müeller-Hinton utilizadas neste procedimento foram preparadas vertendo-se alíquotas de 25 mL deste meio sobre placas de Petri com 9 cm de diâmetro, de forma a se obter uma camada de 4 mm de altura.

A leitura dos halos ao redor dos discos de antimicrobianos foi realizada seguindo os critérios do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2010), exceto para mupirocina, visto que não há critérios para a realização do teste de susceptibilidade para este microbiano neste manual. Para a interpretação dos halos de susceptibilidade à mupirocina, foi utilizado o critério de Oliveira e colaboradores (2007), segundo o qual as estirpes são sensíveis quando apresentam halos ≥ 14 mm ao redor dos discos de 5 e 200 μg , resistentes a altos níveis (Mup^{R} : $\geq 512 \mu\text{g/mL}$) quando não exibem halos ao redor dos discos de 5 e 200 μg e são resistentes a níveis intermediários (Mup^{I} : 4-256 $\mu\text{g/mL}$) quando não exibem halo ao redor do disco de 5 μg e apresentam halo ≥ 14 mm ao redor do disco de 200 μg . Esses critérios foram estabelecidos para estirpes de *S. aureus* e devido à falta de outros critérios, foram utilizados neste estudo para caracterizar estirpes de *S. haemolyticus*.

3.2. Metodologia de PCR

A reação de polimerase em cadeia (PCR) foi realizada com os seguintes objetivos: confirmar a identificação das estirpes estudadas, detectar a presença do gene *ileS-2* nas estirpes resistentes à mupirocina e para verificar a presença de sequências IS257 nas regiões flanqueadoras do gene *ileS-2*.

3.2.1. Extração de DNA total com tiocianato de guanidina

Para a extração de DNA total, foi seguido o protocolo descrito por Souza e colaboradores (1996). As estirpes bacterianas foram crescidas em 3 mL de TSB a 37°C, por 18 h. Após esse período, 1,0 mL do inóculo foi transferido para um microtubo e a suspensão bacteriana foi centrifugada a 3000 x *g*/5 min. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi dissolvido em 1,0 mL de tampão TE 1x. A suspensão foi novamente centrifugada a 3000 x *g*/5 min, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi dissolvido em 100 μL de tampão TE 1x contendo 5 mg de lisozima (Amersham Pharmacia Biotech) e 5 μL de lisostafina (1 mg/mL – Sigma). Esta suspensão foi incubada por 37°C, por 1 h. Após esse tempo, foram adicionados 500 μL de

tiocianato de guanidina 5 M. Os microtubos foram agitados manualmente e, posteriormente, incubados à temperatura ambiente por 7 min. Essa etapa foi seguida por um resfriamento do lisado em gelo por 10 min e pela adição de 250 µL de acetato de amônio 7,5 M. Os microtubos foram invertidos várias vezes e incubados no gelo por 10 min. A essa solução, foram adicionados 500 µL de clorofórmio-álcool-isoamílico. Os microtubos foram agitados manualmente e, posteriormente, centrifugados a 12.500 x g/12 min. A fase aquosa foi então transferida para um novo microtubo e o DNA foi precipitado com 0,54 volumes de isopropanol (Merck) gelado. A solução foi invertida gentilmente várias vezes, até a visualização de um precipitado branco fibroso. Depois foi feita uma centrifugação a 12.500 x g/5 min e o sobrenadante foi, então, desprezado. O sedimento foi lavado com 1 mL de etanol 70% gelado. O sobrenadante foi, então, desprezado e o sedimento foi dissolvido em 50 µL de tampão TE 1x. O DNA obtido foi estocado a 4°C. A dosagem do DNA foi realizada através de comparação visual com o marcador de intensidade λ Hind.

3.2.2. Iniciadores utilizados

Os iniciadores utilizados nos experimentos de PCR encontram-se listados na tabela 1 e para facilitar o entendimento, foi feita uma ilustração das posições de anelamento desses iniciadores ao gene *ileS-2* e ao elemento IS257 (Figura 8).

Tabela 1: Iniciadores utilizados nos experimentos de amplificação por PCR.

Gene	Iniciador	Sequência de bases 5'→3'	Tamanho dos amplicons	Referência
<i>ileS-2</i>	M1	GTTTATCTTCTGATGCTGAG	237 pb	Nunes <i>et al.</i> , 1999
	M2	CCC CAG TTA CAC CGA TAT AA	Variável	Woodford <i>et al.</i> , 1998
	MupA _R	CTCTAATTCAACTGGTAAGCC		
IS257	1235 _R	TGGCGTATTGATGAGACGTACATC	Variável	Woodford <i>et al.</i> , 1998
	1234 _F	GGCATGGCGAAAATCCGTAG	Variável	
<i>mecA</i>	MRS1	TAGAAATGACTGAACGTC	154 pb	Del Vecchio <i>et al.</i> , 1995
	MRS2	TTGCGATCAATGTTACCGTAG		
<i>mvaA</i>	SH _F	GGTCGCTTAGTCGGAACAAT	271 pb	Schuenck <i>et al.</i> , 2008
	SH _R	CACGAGCAATCTCATCACCT		

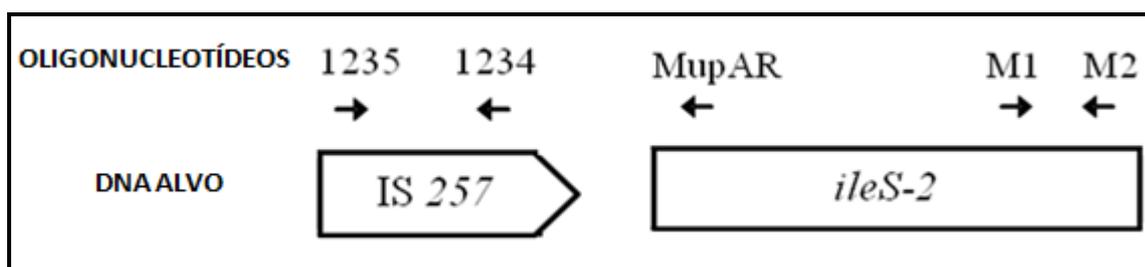


Figura 8: Locais de anelamento dos iniciadores ao elemento IS257 e ao gene *ileS-2*.

3.2.3. Preparo do padrão de massa molecular

Para um volume final de 20 μ L, 500 ng de DNA de λ foram adicionados a uma solução contendo tampão 1X da enzima e 10 U da enzima de restrição *Hind* III (Invitrogen). Esta solução foi incubada a 37°C por 2 h. A metade desta preparação foi utilizada como padrão para se determinar a concentração do DNA extraído, bem como, do produto do PCR obtido, através de análise visual em eletroforese em gel de agarose 0,8%.

3.2.4. Reação de polimerase em cadeia (PCR) para confirmação da identificação de *S. haemolyticus*

A identificação da espécie *S. haemolyticus* foi realizada utilizando-se os iniciadores espécie-específicos SH_F e SH_R (SCHUENCK *et al.*, 2008), para detecção de um fragmento de 271 pb correspondente ao gene *mvaA*, que codifica a enzima HMG-CoA redutase, uma enzima da via do mevalonato, importante para o metabolismo bacteriano. A amplificação foi realizada em um termociclador (PTC – 100; MJ Research, Inc), utilizando-se um volume total de 50 μ L para a reação composta de 100 ng de DNA (extraído conforme descrito no item 3.2.1), 200 μ M de cada desoxinucleotídeo trifosfatado [dATP, dGTP, dCTP e dTTP (Biotools)], 12 pmoles dos iniciadores SH_F e SH_R, 1,2 U de *Taq* DNA-polimerase (Biotools), tampão (20mM Tris-HCl pH8.4, 50 mM KCl e 2 mM MgCl₂, Biotools) e 30 μ L de óleo mineral.

Após realização de uma etapa de desnaturação inicial de 94°C por 3 min, foram realizados 30 ciclos de amplificação: desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 55°C por 1 min e extensão a 72°C por 2 min, seguido de uma etapa final de extensão, realizada a 72°C por 5 min.

3.2.5. PCR para amplificação do gene *ileS-2* e para detecção dos elementos flanqueadores IS257

Para a amplificação de um fragmento de 237 pb do gene *ileS-2*, responsável pela resistência a altos níveis de mupirocina, foi realizada uma PCR contendo uma solução com os quatro desoxinucleotídeos 5'- trifosfatados [2,5 mM de cada dNTP (Life Technologies)], 100 ng de DNA (extraído conforme descrito no item 3.2.1), 2,5 U de *Taq* DNA-polimerase (Pharmacia- Biotech), tampão [50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 9.0, 1,5 mM MgCl₂ (Biotools)], 50 pmoles dos iniciadores M1 e M2 e 30 µL de óleo mineral.

Para a amplificação das regiões entre o elemento IS257 e o gene *ileS-2*, além do iniciador M1, citado anteriormente, foram utilizados: *mupA_R*, 1234 (IS257_F) e 1235 (IS257_R). As combinações de iniciadores utilizados estão apresentadas nos itens 4.12.1. e 4.12.2. de Resultados.

O protocolo para amplificação do gene *ileS-2* foi realizado segundo Nunes e colaboradores (1999) e consistiu em uma etapa inicial de desnaturação a 92°C por 3 min, seguida por 30 ciclos de amplificação que foram realizados da seguinte forma: desnaturação a 92°C por 1 min, anelamento a 56°C por 1 min e extensão do DNA a 72°C por 1 min. A reação foi finalizada com uma extensão final a 72°C por 3 min. As reações foram feitas utilizando-se um termociclador com controle de temperatura programável (PTC – 100; MJ Research, Inc).

3.2.6. PCR *multiplex* para detecção simultânea da resistência à mupirocina e meticilina

Devido à importância clínica das estirpes de *Staphylococcus* resistentes à meticilina, foi realizada uma PCR *multiplex* para verificar se as estirpes resistentes à mupirocina também apresentavam o gene *mecA*, determinante da resistência à meticilina.

O protocolo para esta reação foi elaborado por Ferreira e colaboradores (2001) e foi realizado sob as mesmas condições descritas anteriormente (item 3.2.5), diferindo apenas nos iniciadores utilizados. Nesta reação, os iniciadores *MupA_R*, 1234 e 1235 foram substituídos pelos iniciadores MRS1 e MRS2.

3.2.7. Eletroforese de DNA em gel de agarose

Os produtos amplificados por PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose (Gibco BRL) (0,7%) preparado em TBE 1x. A corrida eletroforética foi realizada em uma cuba horizontal (Life Technologies – Horizon 11-14) a 90 V por 100 min. A coloração do gel foi realizada posteriormente, com a imersão do mesmo em uma solução de brometo de etídio na concentração final de 0,5 µg/mL, por 60 min. Após esse período, o gel foi observado utilizando um transiluminador ultravioleta e a imagem capturada em um fotodocumentador (Vilber Lourmat). Como padrão de DNA para a corrida eletroforética foi utilizado o padrão 1 kb DNA ladder (Biotools).

3.3. Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)

O protocolo a seguir foi descrito por Nunes e colaboradores (2005). Para verificar o perfil de restrição do DNA cromossômico frente à enzima *SmaI*, as estirpes foram cultivadas em ágar sangue a 37°C, por 48 h e, posteriormente, 5 colônias isoladas foram inoculadas em 5 mL de caldo TSB e incubadas durante 4 h, a 37°C em banho de imersão. Em seguida, 1 mL desta suspensão foi centrifugado (7000 x g/5 min) e o sedimento foi suspenso em 250 µL de tampão PIV. A esta suspensão foi adicionado o mesmo volume de agarose de baixo ponto de fusão (“Low Melting Point Agarose”, IBI Technical, New Heaven, EUA) a 2%, dissolvida em tampão PIV e mantida a 58°C. Após homogeneização, a agarose foi distribuída em moldes que foram mantidos a 4 °C por cerca de 10 min. Posteriormente, os blocos de agarose foram colocados em 2 mL de solução de lise EC contendo 63.500 U de lisozima (Sigma-Aldrich) e 96 U de lisostafina (Sigma-Aldrich Company) e foram incubados a 37°C, sob agitação lenta, durante 18 h. Após este período, os tubos foram resfriados a 4°C e a solução foi substituída por 2 mL de solução ESP contendo 0,1 mg/mL de proteinase K (Sigma-Aldrich Company). Essa solução foi incubada a 50°C em banho de imersão, sob leve agitação, durante 18 h. Ao final desta fase, os blocos de agarose foram mantidos em nova solução ESP (sem adição de proteinase) a 4°C. A digestão do DNA cromossômico foi realizada em um bloco de agarose que foi lavado 5 vezes em tampão TE 1x, a 37°C, sendo as 4 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 µL do tampão NEB Buffer 4 da enzima de restrição *SmaI* (New England Biolabs, Ipswich, Inglaterra) 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 *SmaI* e incubado

a 25°C durante 18 h. Posteriormente, foi removida a solução contendo a enzima e o bloco de agarose foi fundido a 70°C e aplicado no gel de agarose (Invitrogen) a 1% 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 23 h, a 6 V/cm, 13°C, com ângulo de 120°. O gel foi corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) por 40 min e descorado por 1 h com água destilada. Posteriormente, a imagem foi capturada sob luz ultravioleta em um fotodocumentador (Vilber Lourmat). Como padrão de tamanho molecular de DNA foi utilizado o marcador 50-1000 kb Lambda Ladder PFGE Marker (New England Biolabs). Os padrões de bandas foram analisados através da comparação visual entre os perfis de fragmentação do DNA genômico das estirpes e foram classificados de acordo com os critérios de Van Belkum e colaboradores (2007).

3.4. Caracterização dos plasmídios de resistência à mupirocina

3.4.1. Cura do plasmídio

Como descrito por Udo, Pearman & Grubb (1994), primeiramente foi feito o pré-inóculo das estirpes resistentes a mupirocina em caldo TSB, a 37°C, por 18 h. Em seguida, foram feitos repiques em 3 mL de caldo TSB a 43°C, durante 4 dias consecutivos, sempre na ausência de fármacos seletivos e utilizando 30 µL da cultura do dia anterior como pré-inóculo. A partir do último inóculo, foram feitas diluições seriadas em salina 0,85% e, em seguida, as diluições 10⁻⁴ e 10⁻⁵ foram semeadas em placas contendo TSB sólido, de modo a se obter uma “placa mãe” contendo colônias isoladas, para a posterior semeadura, em “réplica”, em placas de TSB contendo 256 µg/mL de mupirocina. As placas foram incubadas a 37°C, por 18 h, a fim de verificar a proporção de células sensíveis a este antimicrobiano após o procedimento de cura.

3.4.2. Extração de DNA plasmidial

As extrações foram realizadas conforme descrito por Giambiagi-deMarval *et al.*, 1990.

As estirpes foram crescidas em 3 mL de caldo TSB contendo 512 µg/mL de mupirocina, a 37°C, por 18 h e lavadas com 400 µL de tampão TE 1x, através de centrifugação em microcentrífuga, a 12.000 x g/5 min. O sedimento foi suspenso em 400 µL de tampão de lise, contendo solução de lisostafina (SIGMA) na concentração

final de 12 ng/mL. Após incubação de 1 h, a 37°C, foi adicionada pronase (SIGMA) a 1 µg/µL final e solução de SDS (Pharmacia Biotech) a 2% final, durante 10 min, a 37°C. As estirpes foram aquecidas a 65°C por 5 min, e em seguida, foi adicionado KCl (MERCK) a 0,4 M final e o lisado foi resfriado em gelo por 20 min. Os microtubos foram centrifugados em microcentrífuga, a 12.000 x g/10 min. Os sobrenadantes foram coletados, divididos em dois novos microtubos, e precipitados com dois volumes de etanol gelado (MERCK). Os microtubos foram mantidos a -20°C por uma noite. Uma nova centrifugação a 12.000 x g foi realizada, em microcentrífuga refrigerada por 20 min. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi lavado com etanol 70% e novamente centrifugado a 12.000 x g em microcentrífuga por 5 min. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado de cada estirpe foi eluído em 30 µL de tampão TE 1x.

3.4.3. Transferência do plasmídeo de resistência à mupirocina através de conjugação sobre membrana filtrante

Com o objetivo de verificar a capacidade do plasmídeo de resistência à mupirocina ser transferido para outras estirpes de estafilococos, foram selecionadas duas estirpes doadoras para os experimentos de conjugação (uma representante do grupo Mup^R e uma Mup^{RM}). Os experimentos de conjugação foram realizados de acordo com o método descrito por Projan e Archer (1989). As estirpes doadoras e receptoras (tabela 2) foram repicadas em meios sólidos de modo a se obter um “tapete” de células para que se pudesse então, preparar a partir dos mesmos, suspensões celulares, em salina 0,85%, com concentração aproximada de 10⁹ células/mL. Foram centrifugadas em microcentrífuga, uma alíquota de 1 mL da suspensão doadora e duas alíquotas de 1 mL da receptora, a 10.000 x g/5 min. Após desprezar os sobrenadantes, um dos sedimentos da suspensão da receptora foi centrifugado com 1mL da doadora, nas mesmas condições descritas acima, obtendo-se desta forma, o conjugado. A massa celular referente a cada estirpe foi vertida em um filtro de nitrocelulose depositado na superfície da placa de BHI correspondente (uma placa com um filtro para cada estirpe. Após incubação durante 18 h a 37°C, as massas celulares dos filtros foram suspensas em 1 mL de solução salina, e alíquotas de 100 µL foram espalhadas em toda superfície de 3 placas de BHI contendo a mistura de fármacos adequada, capaz de selecionar os transconjugantes.). As suspensões da doadora e da receptora (cada uma em uma placa) foram semeadas em placas contendo a combinação de antimicrobianos (essas placas foram utilizadas como controle negativo). A

observação foi feita após 48 h de incubação, a 37°C. A contagem de unidades formadoras de colônias (UFCs) permitiu inferir a quantidade de transconjugantes por mL de conjugado.

O cálculo das frequências de conjugação foi efetuado relacionando as concentrações (em UFC/mL) dos transconjugantes obtidos, com a concentração das bactérias doadoras. A concentração destas últimas foi calculada inoculando 100 µL das diluições 10⁻⁷ e 10⁻⁸ da suspensão da bactéria doadora em meio BHI sólido isento de antimicrobianos e efetuando a contagem das UFCs. A seguir encontram-se os antimicrobianos utilizados e suas respectivas concentrações: cloranfenicol: 10 µg/mL, mupirocina: 150 µg/mL, novobiocina: 5 µg/mL e rifampicina: 5 µg/mL.

As diferentes combinações de antimicrobianos utilizadas estão descritas no item Resultados. As placas onde foram inoculadas as suspensões da doadora e da receptora (uma em cada placa) foram usadas como controle negativo. Após 48 h de incubação a 37°C, foram realizadas as leituras e, nos casos de transferência por conjugação, foi observado o crescimento de transconjugantes nas placas onde foram inoculadas as suspensões com o conjugado e nas placas-controle houve ausência de crescimento.

As frequências de conjugação (FC) foram calculadas pela relação entre a concentração de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) do transconjugante e a concentração de UFC da estirpe doadora, como descrito pela fórmula a seguir:

$$FC = \frac{\text{UFC do transconjugante/mL}}{\text{UFC da bactéria doadora/mL}}$$

Tabela 2: Estirpes bacterianas utilizadas nos experimentos de conjugação.

Estirpes	Descrição	Referência
<i>Enterococcus faecalis</i> I60	Estirpe doadora do plasmídio pIP501 (Cn ^R) utilizada no experimento de conjugação	EVANS & MACRINA, 1983
<i>S. aureus</i> RN2677	Estirpe utilizada como receptora nos experimentos de conjugação	KORNBLUM <i>et al.</i> , 1986
<i>S. aureus</i> MB196	Estirpe utilizada como marcador de tamanho por abrigar plasmídios de 4, 10 e 27 kb	GIAMBIAGI-deMARVAL, 1990

<i>S. haemolyticus</i> MD46	Estirpe doadora do plasmídio de resistência à mupirocina - representante do grupo Mup ^R	Este trabalho
<i>S. haemolyticus</i> MD57	Estirpe doadora do plasmídio de resistência à mupirocina - representante do grupo Mup ^{RM}	Este trabalho

Cn- cloranfenicol

3.4.4. Teste-E para mupirocina

O Teste-E foi realizado nas estirpes Mup^I e nas estirpes transconjugantes a fim de determinar a concentração mínima inibitória (CMI) para mupirocina nessas estirpes. O procedimento utilizado foi realizado segundo recomendações do fabricante (AB Biodisk).

O procedimento para o preparo e semeadura das placas foi realizado como descrito anteriormente (item 3.5.1). Após a semeadura das placas, foi depositada no centro da placa, com o auxílio de uma pinça estéril, uma única fita de teste E para mupirocina. As placas foram incubadas por 18 h, a 37°C.

A leitura dos halos de inibição foi realizada de acordo com o critério de interpretação de Finlay e colaboradores (1997), segundo o qual, são resistentes as estirpes que possuem uma CMI $\geq 8 \mu\text{g/mL}$.

3.4.5. Eletroforese de DNA plasmidial em gel de agarose

O gel de agarose foi preparado como descrito anteriormente (item 3.2.7), na concentração de 0,7% e a corrida eletroforética foi realizada a 40 V por 22 h. Foram aplicados 25 μL do DNA plasmidial obtido como descrito no item 3.9.3.

3.4.6. “Southern Blot”

Essa técnica foi empregada com o objetivo de verificar a localização do gene *ileS-2*, através da utilização de uma sonda específica para esse gene. A metodologia utilizada foi descrita por Sambrook, Fritsch & Maniatis (1989). Após a corrida eletroforética do DNA plasmidial, os géis foram tratados com solução de desnaturação por 45 min e, posteriormente, com solução neutralizante por 45 min, sob leve agitação e efetuando-se uma lavagem com água destilada entre ambas as etapas. A transferência do

DNA para membrana de nitrocelulose (Hybond-C extra, Amershan Life Science) foi feita utilizando o tampão SSC 10X para eluir o DNA do gel para membrana, durante 18 h. Após este período, as membranas foram enxugadas entre duas folhas de papel de filtro e colocadas para a fixação do DNA, em forno a 80°C, por 2 h.

Posteriormente, os sacos plásticos contendo as membranas foram adicionados de solução de pré-hibridização e incubados em banho-maria a 58°C, por 18h.

Após este período, foi adicionada a sonda desnaturada, marcada pela técnica de marcação randômica, utilizando-se o nucleotídeo radioativo ^{32}P -dCTP e o sistema comercial “Ready to Go-DBA labelling Beads” (-dCTP; Amersham Pharmacia Biotech), de acordo com as instruções do fabricante. A hibridização foi efetuada nas mesmas condições utilizadas na pré-hibridização.

Após 3 lavagens por 15 min em SSC 0,1X e SDS 0,1% a 58°C, as membranas foram colocadas a -70°C para a impressão de um filme de raio X (Kodak). O filme foi revelado 24 h após a exposição. Quando não havia sinais na autorradiografia após esse período, um novo filme de raio X era colocado e uma nova exposição a -70°C era feita e o tempo de exposição era aumentado gradativamente, para 3, 5 e 7 dias de exposição.

4- RESULTADOS

4.1. Análise da susceptibilidade das estirpes à mupirocina

Com o objetivo de se analisar uma população de *S. haemolyticus* quanto à resistência à mupirocina, 75 estirpes nosocomiais foram submetidas ao teste de difusão a partir de disco, utilizando-se discos contendo 5 e 200 µg deste fármaco. Com base nos critérios estabelecidos por Oliveira e colaboradores (2007), conforme descrito em Materiais e Métodos item 3.5.1, foram encontradas 6 estirpes resistentes a altos níveis (MD2, MD19, MD34, MD45, MD46 e MD56), 3 resistentes a níveis intermediários (MD22, MD33 e MD57) e 66 sensíveis à mupirocina.

Na figura 9 encontram-se os halos exibidos pelos três grupos encontrados, Mup^R, Mup^I e Mup^S, e na tabela 3, o tamanho desses halos em milímetros.

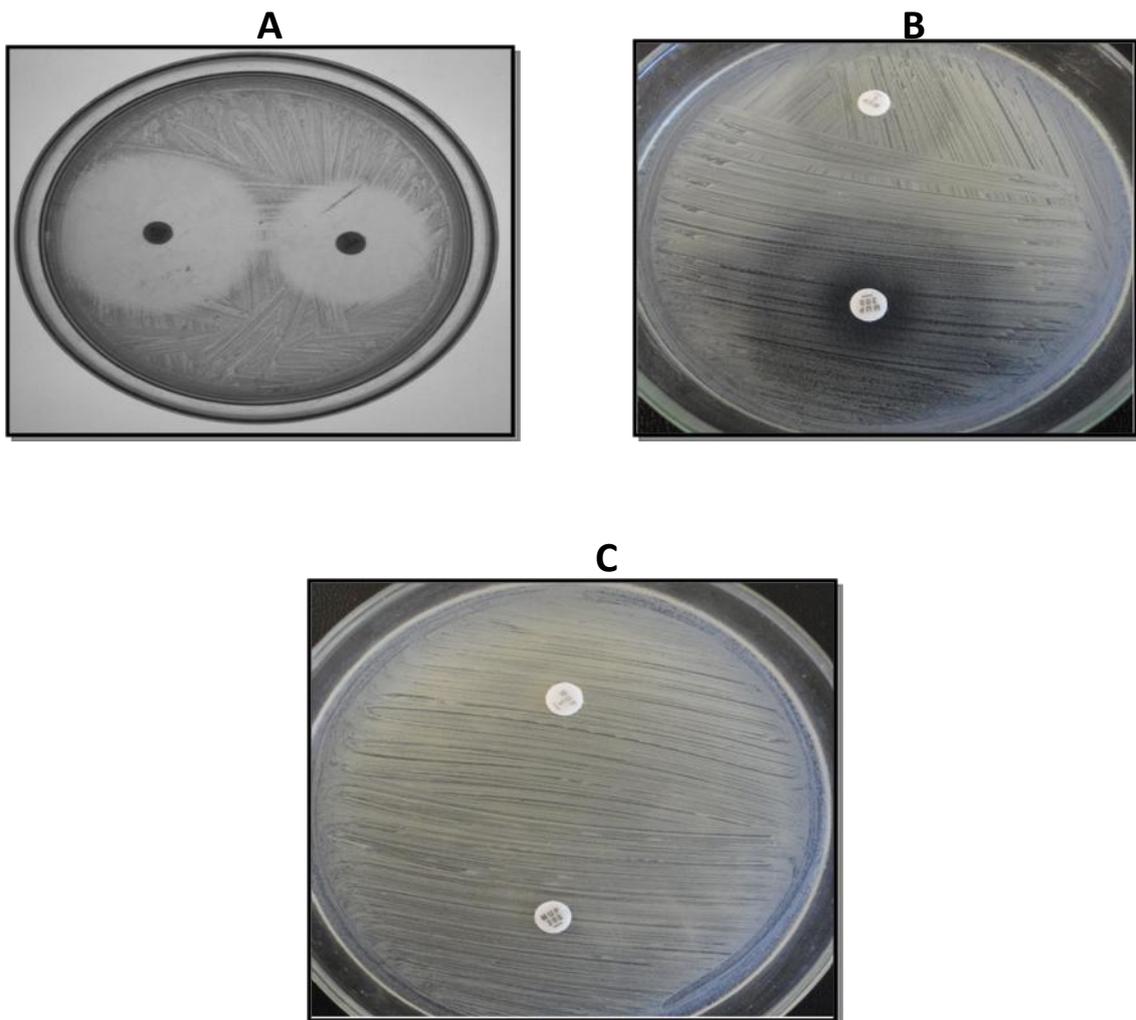


Figura 9: Teste de difusão a partir de disco. A: estirpe sensível, MD20; B: estirpe resistente a níveis intermediários, MD22; C: estirpe resistente a altos níveis, MD19.

Tabela 3: Avaliação da susceptibilidade à mupirocina em 75 estirpes de *S. haemolyticus* isoladas no Hospital Naval Marcílio Dias no período entre 2005 e 2008.

N ° de estirpes	Diâmetro dos halos (mm)		Interpretação	%
	5 µg	200 µg		
6	0	0	Mup ^R	8
3	0	14 - 17	Mup ^I	4
66	27-33	34 - 47	Mup ^S	88

4.2. Confirmação da identificação das estirpes resistentes à mupirocina

Para se confirmar a identificação prévia por automação, realizada no hospital de origem, as estirpes resistentes à mupirocina foram submetidas a uma PCR utilizando os iniciadores espécie-específicos SH_F e SH_R (Tabela 2). Duas estirpes Mup^S (MD3 e MD4) foram utilizadas como controles positivos. Todas as estirpes analisadas amplificaram um fragmento de tamanho esperado, de 271 pb, do gene *mvaA* de *S. haemolyticus* (Figura 10), confirmando que as estirpes analisadas neste trabalho pertencem a essa espécie.

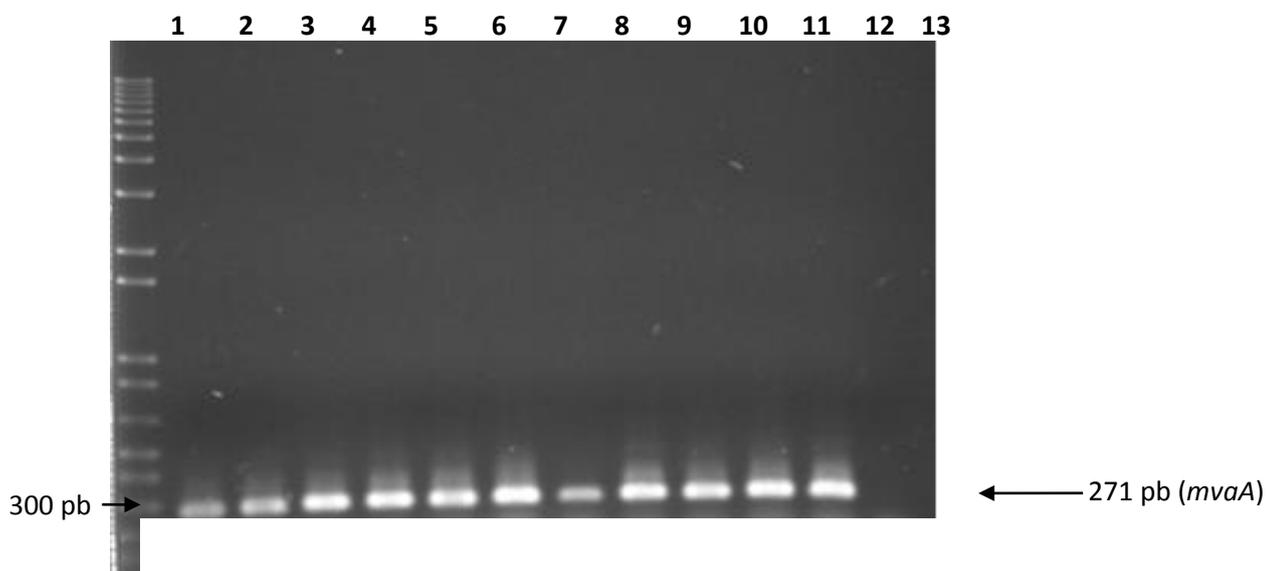


Figura 10: Eletroforese em gel de agarose - Amplificação de um fragmento espécie-específico do gene *mvaA* (271 pb) de *S. haemolyticus*. 1: Padrão de tamanho molecular 1 kb (DNA ladder - Biotools), 2: MD3 Mup^S, 3: MD4 Mup^S, 4: MD22 Mup^{RM}, 5:

MD33 Mup^{RM}, 6: MD57 Mup^{RM}, 7: MD2 Mup^R, 8: MD19 Mup^R, 9: MD34 Mup^R, 10: MD45 Mup^R, 11: MD46 Mup^R, 12: MD56 Mup^R, 13: controle negativo sem DNA.

4.3. Detecção do gene *ileS-2*, determinante da resistência à mupirocina

Com a finalidade de se correlacionar a presença do gene *ileS-2* com a resistência à mupirocina, o DNA das estirpes foi submetido à amplificação através de PCR utilizando-se os iniciadores M1 e M2 descritos em Materiais e Métodos (tabela 2). Três estirpes Mup^S foram utilizadas como controle negativo.

Após a corrida eletroforética, foi detectado um *amplicon* de 237 pb, correspondente ao *ileS-2*, nas estirpes Mup^R como esperado (Figura 11). Surpreendentemente também foi detectada a presença deste gene nas estirpes Mup^I, uma vez que o gene *ileS-2* é característico de estirpes Mup^R, com poucos relatos na literatura da presença deste gene no cromossomo de estirpes Mup^I de *S. aureus*.

Estes resultados controversos mostraram a necessidade de determinar a CMI das estirpes a fim de classificá-las corretamente.

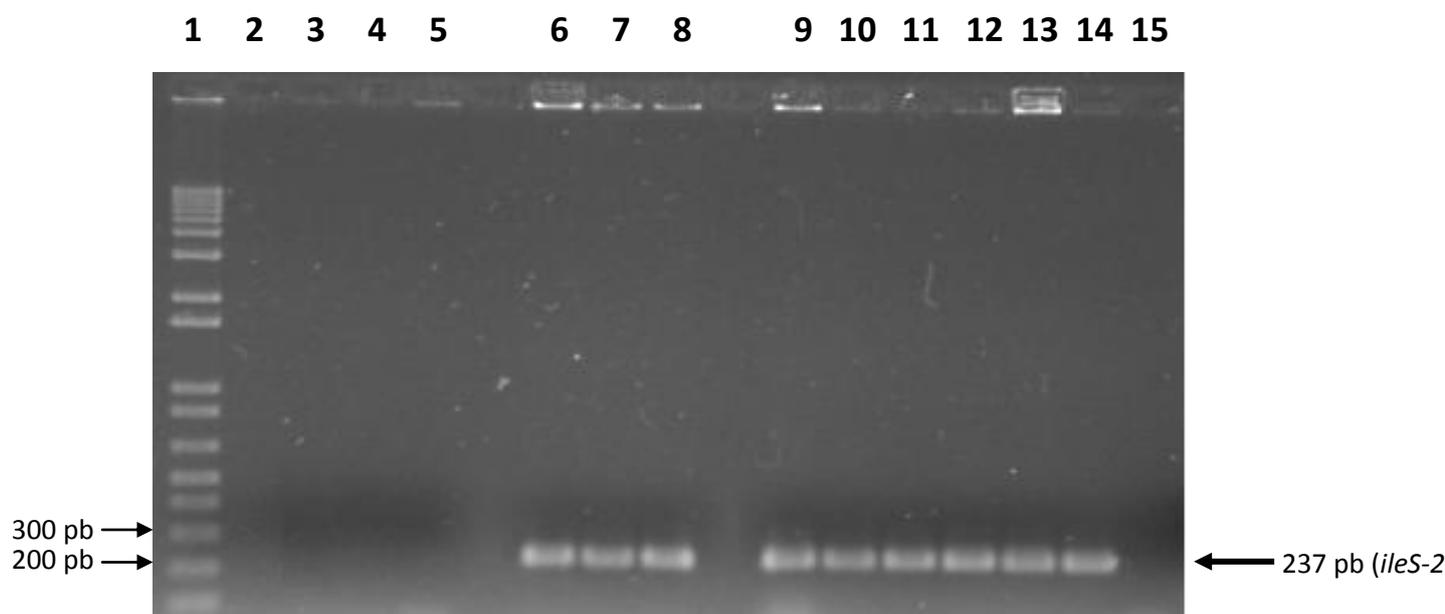


Figura 11: Eletroforese em gel de agarose - Detecção de um *amplicon* de 237 pb correspondente ao gene *ileS-2*. 1: Padrão de tamanho molecular 1kb (DNA ladder), 2: MD3 Mup^S, 3: MD4 Mup^S, 4: MD5 Mup^S, 5: MD6 Mup^S, 6: MD22 Mup^I, 7: MD33 Mup^I, 8: MD57 Mup^I, 9: MD2 Mup^R, 10: MD19 Mup^R, 11: MD34 Mup^R, 12: MD45 Mup^R, 13: MD46 Mup^R, 14: MD56 Mup^R, 15: controle negativo sem DNA.

4.4. Determinação da CMI para mupirocina através do método do Teste-E nas estirpes Mup^I

Devido ao resultado surpreendente da detecção do gene *ileS-2* nas estirpes Mup^I, foi realizado o Teste-E para mupirocina nessas estirpes a fim de determinar a CMI para esse antimicrobiano nessas estirpes. Como controle foi utilizada uma estirpe representante dos grupos Mup^R e Mup^S (Figura 12). Através desse teste, foi possível verificar que as estirpes anteriormente classificadas como Mup^I [8-256 µg/mL (item 4.1.)], apresentaram uma CMI > 256 µg/mL. Assim observamos que as estirpes não poderiam ser classificadas como Mup^I e sim, como Mup^R. Entretanto, uma vez que estas três estirpes apresentaram halo de inibição em torno do disco de 200 µg pelo teste de difusão, diferentemente das estirpes Mup^R, foi possível visualizar a presença de dois grupos de estirpes resistentes com CMI diferenciadas. Assim, a partir daqui, as estirpes inicialmente denominadas Mup^I foram denominadas Mup^{RM} (resistência mediana para mupirocina). Deve ser ressaltado que a determinação da CMI através da técnica de microdiluição em placa deverá ser realizada para determinar com acurácia os níveis mínimos de mupirocina necessários para inibir este grupo de estirpes.

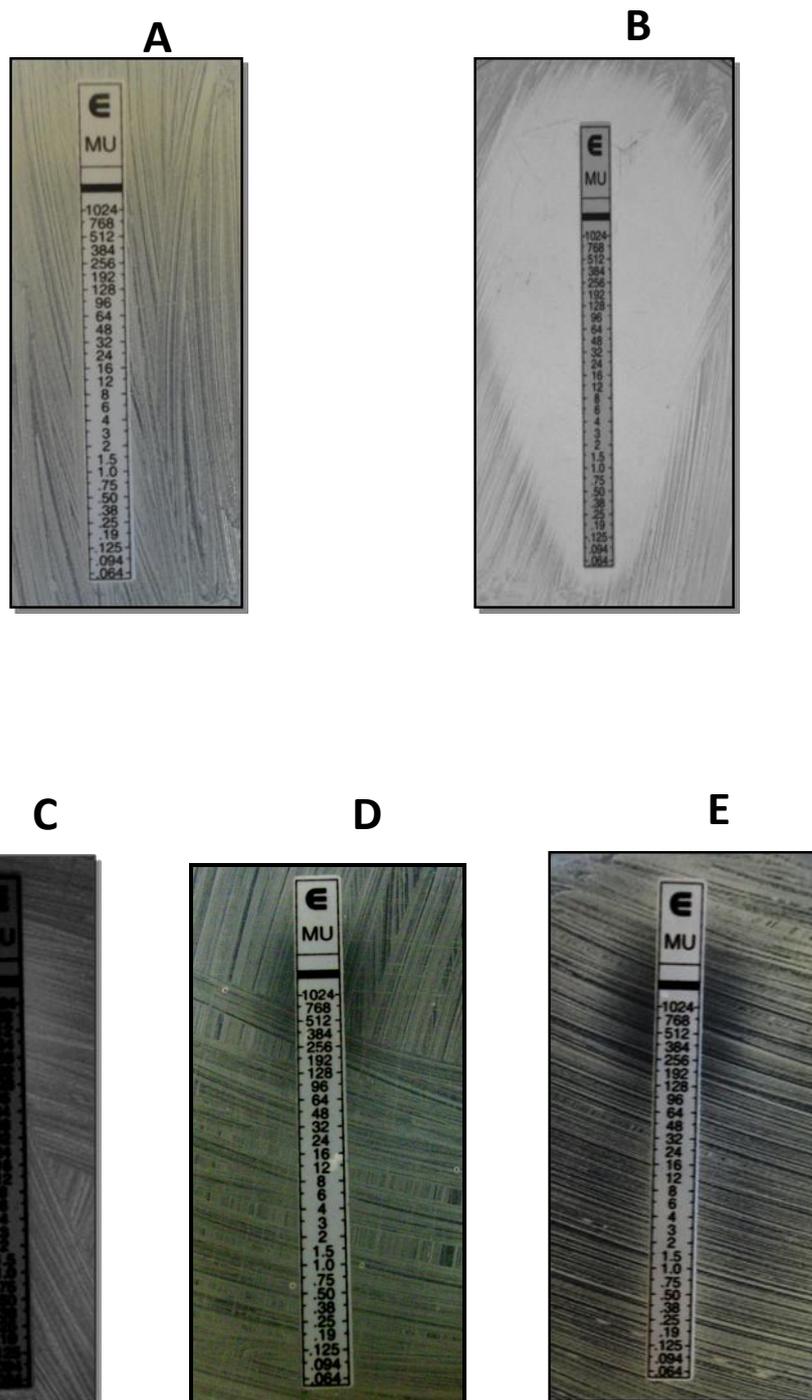


Figura 12: Teste-E para mupirocina. **A-** Estirpe MD46 Mup^R, **B-** Estirpe MD3 Mup^S, **C-**Estirpe MD22 Mup^{RM}, **D-** Estirpe MD33 Mup^{RM}, **E-** Estirpe MD57 Mup^{RM}. A estirpe MD3 Mup^S foi utilizada para se comparar a diferença do halo entre uma estirpe Mup^S e uma estirpe Mup^{RM}.

4.5. Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos das estirpes resistentes à mupirocina

A fim de se verificar o perfil de susceptibilidade das estirpes resistentes à mupirocina frente a outros antimicrobianos de uso frequente na prática clínica, foi realizado o teste de difusão a partir de disco com antimicrobianos utilizados na prática clínica. Os resultados obtidos encontram-se na tabela 4 e revelam um perfil de resistência à maioria dos antimicrobianos testados.

Tabela 4: Susceptibilidade antimicrobiana das estirpes resistentes à mupirocina.

Estirpes	Ap	Cef	Clin	Cn	Em	Gen	Oxa	Pen	Rif	Su/trim	Tc	Van
MD2 Mup ^R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	S	S	S
MD19 Mup ^R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	S
MD34 Mup ^R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	S
MD45 Mup ^R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R	S	S
MD46 Mup ^R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S	S	S
MD56 Mup ^R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R	S	S
MD22 Mup ^{RM}	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R	S	S
MD33 Mup ^{RM}	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R	S	S
MD57 Mup ^{RM}	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R	S	S

Antimicrobianos: Ap- ampicilina, Cef- cefoxitina, Clin- clindamicina, Cn- cloranfenicol, Em- eritromicina, Gen- gentamicina, Oxa- oxacilina, Pen- penicilina, Rif- rifampicina, Su/trim- sulfametoxazol/trimetropim Tc- tetraciclina, Van- vancomicina.

4.6. Genotipagem das estirpes de *S. haemolyticus* resistentes à mupirocina através de eletroforese em campo pulsado (PFGE)

Com o objetivo de se estimar a similaridade genotípica entre as estirpes resistentes à mupirocina, foi realizada a eletroforese em campo pulsado. Através dessa

técnica foi possível observar diferentes padrões de fragmentação do DNA cromossômico (Figura 13) e estabelecer uma relação entre as estirpes estudadas. De acordo com os critérios de Van Belkum e colaboradores (2007) as estirpes que não diferem entre si em nenhuma banda são ditas indistinguíveis e foram denominadas tipo A, ao qual pertencem as 3 estirpes Mup¹. As estirpes que diferem do tipo predominante, neste caso o tipo A, em até 4 bandas são classificadas como subtipos e foram designadas A₁, A₂ e A₃, correspondente às estirpes MD46 (2 bandas diferentes), MD2 (3 bandas diferentes) e MD34 (4 bandas diferentes), respectivamente. Já as estirpes que apresentam mais de 5 bandas diferentes em relação ao tipo A são classificadas em um tipo diferente. Portanto, a estirpe MD45 foi designada como tipo B e a estirpe MD56 foi classificada como subtipo B₁, por apresentar 4 bandas diferentes em relação ao tipo B. A estirpe MD19, por apresentar um perfil de fragmentação diferente dos tipos A e B foi classificada em um novo tipo, o C.

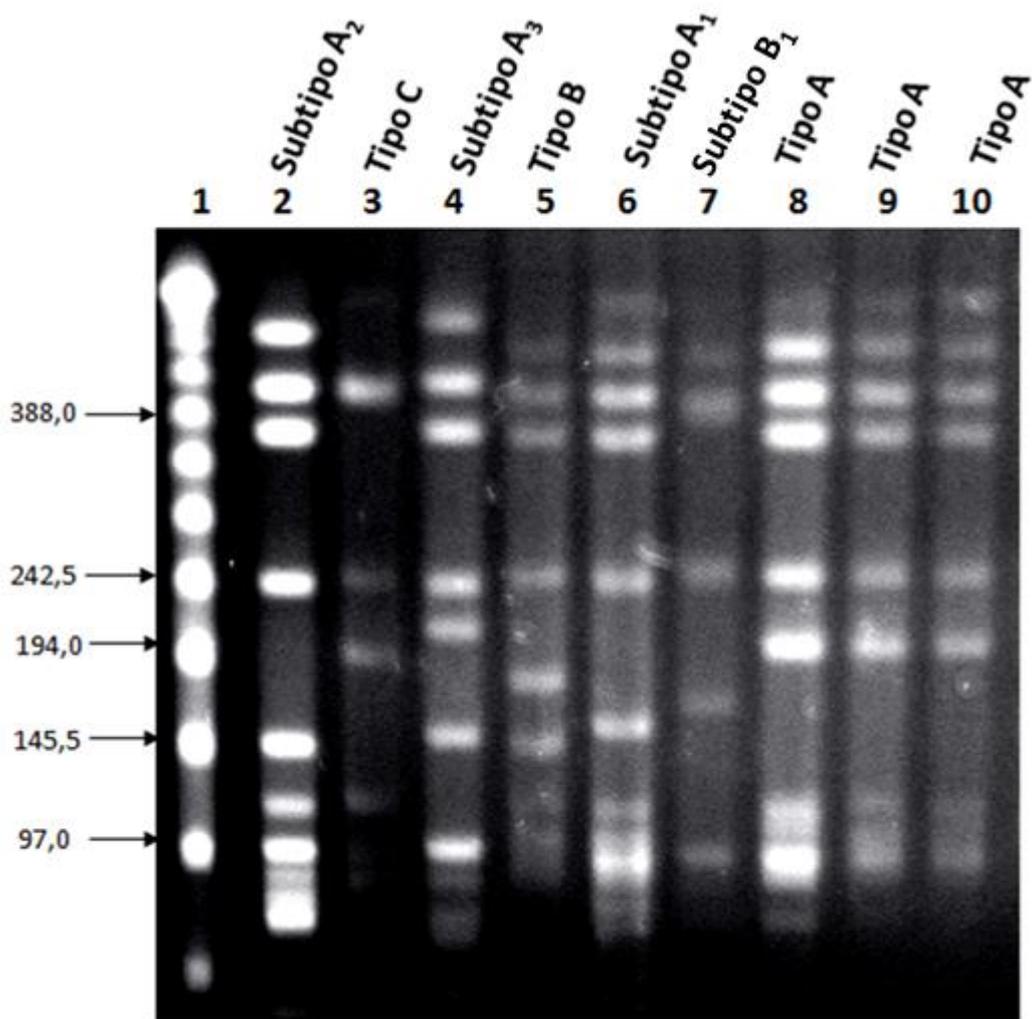


Figura 13: Gel de eletroforese em campo pulsado – Perfil de restrição das estirpes com a enzima *Sma*I. 1: Padrão de tamanho molecular Lambda Ladder PFG Marker, 2: MD2 Mup^R, 3: MD19 Mup^R, 4: MD34 Mup^R, 5: MD45 Mup^R, 6: MD46 Mup^R, 7: MD56 Mup^R, 8: MD22 Mup^{RM}, 9: MD33 Mup^{RM}, 10: MD57 Mup^{RM}.

4.7. PCR *multiplex* para a detecção dos genes *ileS-2* e *mecA*

Com o objetivo de se identificar, em um único teste, estirpes de *S. haemolyticus* contendo os determinantes da resistência à mupirocina e meticilina, as estirpes Mup^R e Mup^{RM}, foram submetidas a uma PCR *multiplex* utilizando-se os iniciadores M1 e M2, MRS1 e MRS2 descritos em Materiais e Métodos (Tabela 2) para detecção dos genes *ileS-2* e *mecA*, respectivamente.

Através do PCR *multiplex* foi possível observar a presença de dois *amplicons* sendo um de 154 pb, referente ao gene *mecA* e outro de 237 pb, referente ao gene *ileS-2* em todas as estirpes Mup^R (Figura 14A) e Mup^{RM} (Figura 14B).

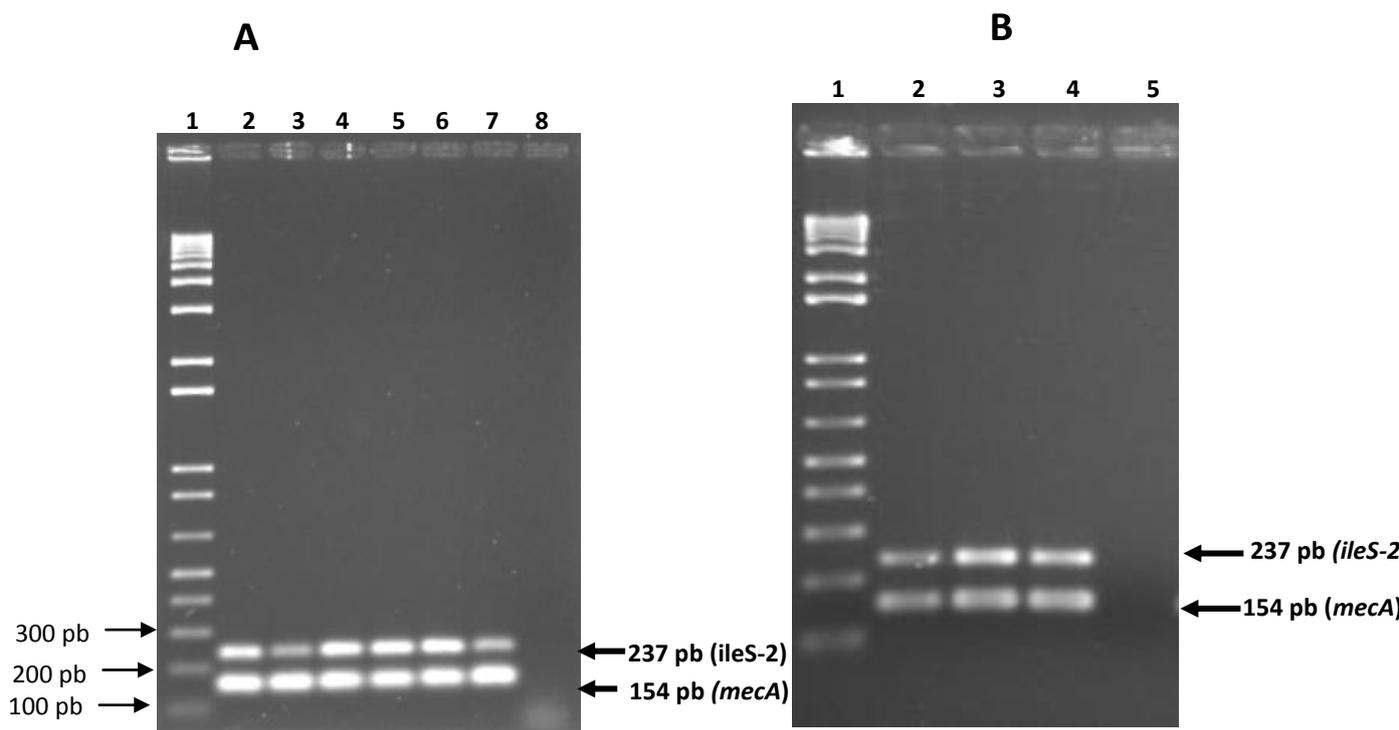


Figura 14: Eletroforese em gel de agarose - Amplificação por PCR *multiplex* dos fragmentos de 237 pb e 154 pb dos genes *ileS-2* e *mecA*, respectivamente. A - 1: Padrão de tamanho molecular 1 kb (DNA ladder); 2: MD2 Mup^R, 3: MD19 Mup^R, 4: MD34

Mup^R, 5: MD45 Mup^R, 6: MD46 Mup^R, 7: MD56 Mup^R, 8: controle negativo sem DNA. **B** - 1: Padrão de 1 kb (DNA Ladder), 2: MD22 Mup^{RM}, 3: MD33 Mup^{RM}, 4: MD57 Mup^{RM}, 5: controle negativo sem DNA.

4.8. Cura da resistência à mupirocina

Com a finalidade de determinar se a resistência à mupirocina seria de natureza plasmidial nas estirpes resistentes, foi realizado o processo de cura através de tratamento com calor, conforme descrito em Materiais e Métodos, item 9.1. Através deste experimento, em 7 das 9 estirpes analisadas, foram obtidas diferentes porcentagens de cura, variando de 1 a 10% e nenhuma colônia curada foi detectada nas estirpes MD2 e MD46 (Tabela 5). A perda da resistência a mupirocina através do tratamento ao calor, sugere a localização plasmidial do gene *ileS-2* nas estirpes onde foi possível se obter a cura da resistência à mupirocina.

Tabela 5: Porcentagens de cura da resistência à mupirocina.

Estirpe	Nº de colônias repicadas	Nº de colônias curadas	Porcentagem de cura (%)
MD2 Mup ^R	200	0	0
MD19 Mup ^R	100	1	1
MD34 Mup ^R	100	3	3
MD45 Mup ^R	100	5	5
MD46 Mup ^R	200	0	0
MD56 Mup ^R	100	3	3
MD22 Mup ^{RM}	100	10	10
MD33 Mup ^{RM}	100	9	9
MD57 Mup ^{RM}	100	9	9

4.9. Teste-E para mupirocina antes e após o processo de cura da resistência à mupirocina

Para se confirmar a perda da resistência à mupirocina, uma colônia curada representante de cada grupo, Mup^{RM} e Mup^R, foi selecionada como protótipo e submetida ao Teste-E para mupirocina. Através desse teste foi possível observar que as estirpes curadas tornaram-se sensíveis à mupirocina após tratamento com calor (Figura 15), sugerindo a natureza plasmidial desta resistência nas estirpes estudadas.

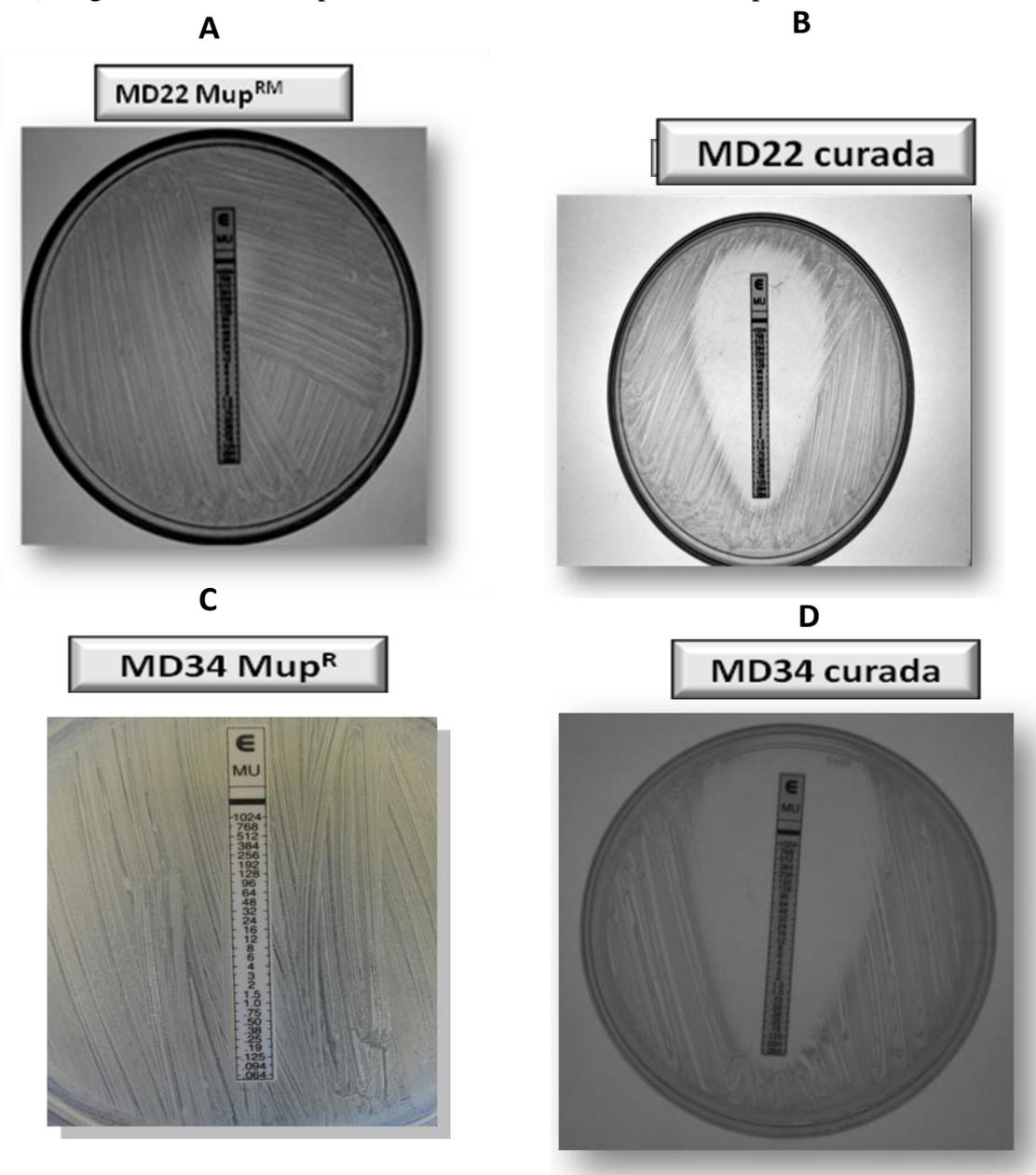


Figura 15: Teste-E para mupirocina. **A-** Estirpe MD22 Mup^{RM} antes do processo de cura, **B-** estirpe MD22 curada da resistência à mupirocina, **C-** estirpe MD34 Mup^R antes do processo de cura, **D-** estirpe MD34 curada da resistência à mupirocina.

4.10. Perda do gene *ileS-2* após o processo de “cura”

Os resultados dos experimentos de “cura” foram complementados por PCR, onde o DNA das estirpes curadas foi submetido a PCR utilizando os iniciadores M1-M2, descritos em Materiais e Métodos (Tabela 2), para verificar se houve a perda do gene *ileS-2* após o processo de cura. Uma estirpe original de cada grupo, Mup^R e Mup^{RM}, foi utilizada como controle positivo em cada reação.

A análise por PCR permitiu detectar um *amplicon* de 237 pb correspondente ao gene *ileS-2* nas estirpes mães e a ausência de amplificação nas respectivas curadas, mostrando que este gene está envolvido com a resistência à mupirocina tanto nas estirpes Mup^R (Figura 16A) quanto nas estirpes Mup^{RM} (Figura 16B), reforçando a localização plasmidial deste gene.

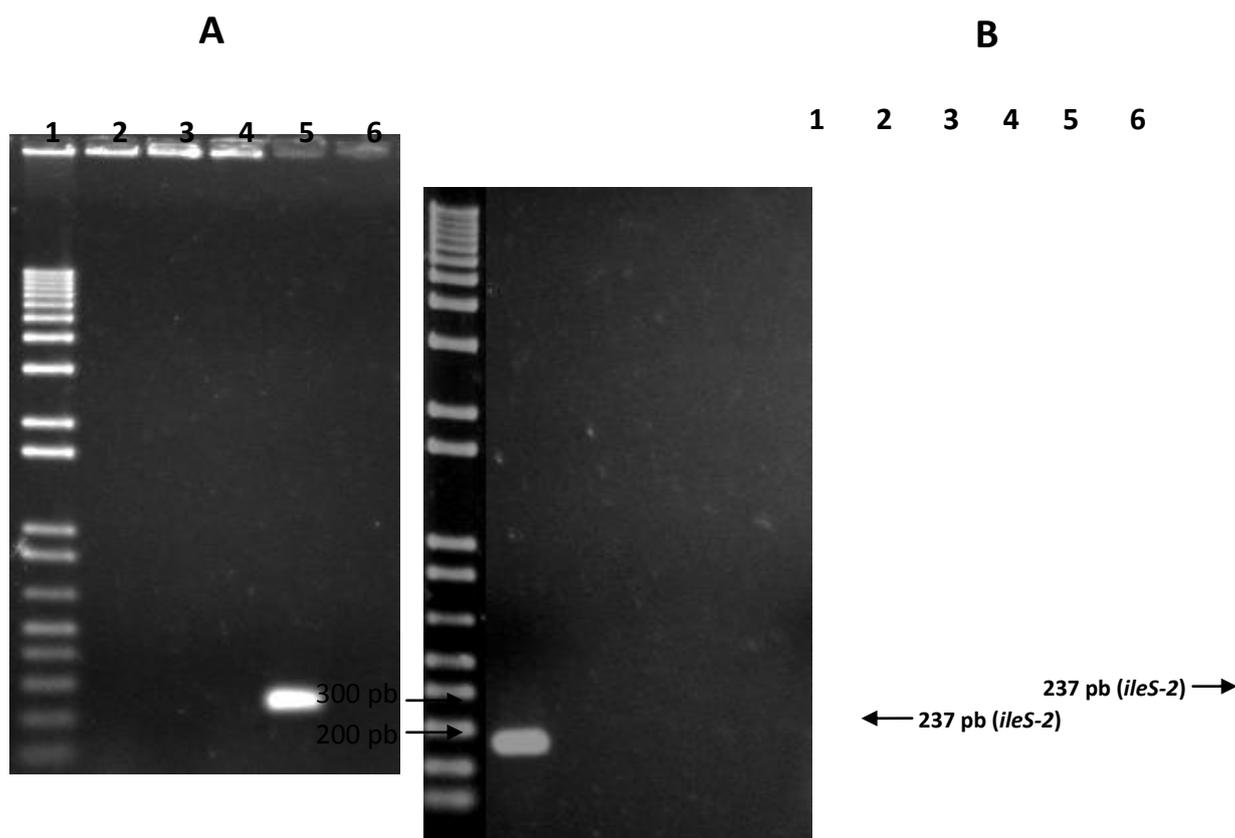


Figura 16: Eletroforese em gel de agarose - Detecção de um *amplicon* de 237 pb, correspondente ao gene *ileS-2*, nas estirpes originais e ausência de amplificação nas respectivas curadas. A- 1: Padrão de tamanho molecular 1kb (DNA Ladder), 2: MD19 curada, 2: MD34 curada, 3: MD45 curada, 4: MD19 Mup^R (controle positivo), 6:

controle negativo sem DNA. **B-** 1: Padrão de tamanho molecular 1kb (DNA Ladder), 2: MD22 Mup^{RM} (controle positivo), 3: MD22 curada; 4: MD33 curada; 5: MD57 curada; 6: controle negativo sem DNA.

4.11. Eletroforese do DNA plasmidial das estirpes Mup^{RM} e Mup^R

Com a finalidade de correlacionar a resistência à mupirocina com a presença de um plasmídio, foi realizada a eletroforese do DNA plasmidial das estirpes Mup^R e Mup^{RM}.

A eletroforese mostrou a presença das formas OC (relaxada, em círculo aberto) e CCC (círculo covalentemente fechado) dos plasmídios de resistência à mupirocina (Figura 17A). Para se confirmar a localização plasmidial do gene *ileS-2*, o DNA das estirpes Mup^R e Mup^M foi transferido para uma membrana de nitrocelulose e submetido à hibridização com uma sonda contendo as sequências do gene *ileS-2* (Figura 17B). A hibridização foi verificada nas estirpes Mup^R e Mup^{RM}, tanto nas formas OC quanto nas formas CCC dos plasmídios de resistência à mupirocina. Na figura 17, coluna 10, encontra-se a estirpe MB196 que foi utilizada como controle negativo, uma vez que essa estirpe é sensível à mupirocina. Os sinais de hibridização ao nível do DNA cromossômico podem ter ocorrido devido a rupturas no DNA plasmidial e co-migração desse DNA juntamente com o DNA cromossômico durante a corrida eletroforética.

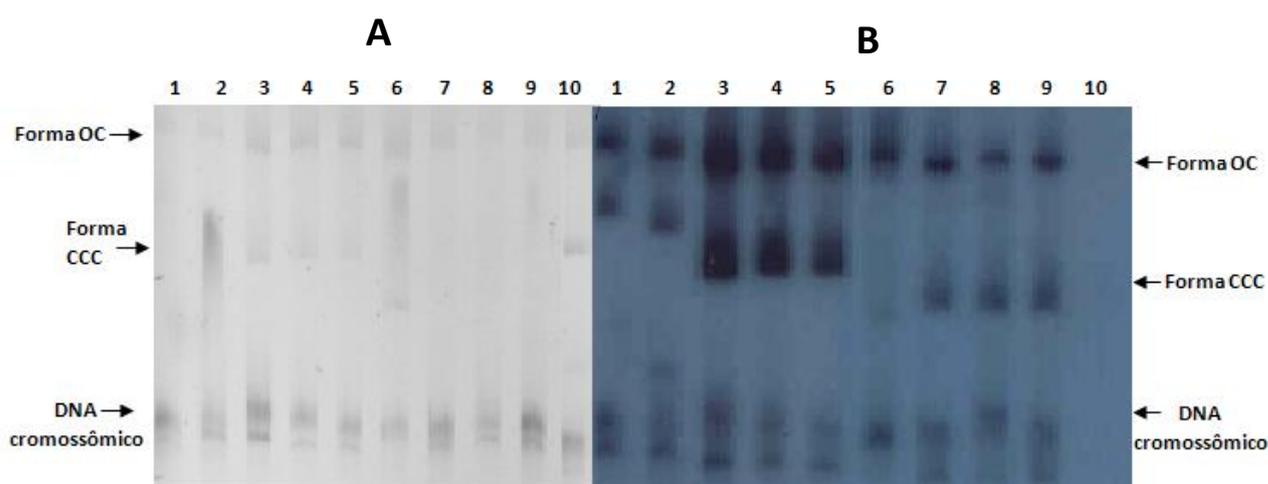


Figura 17: **A-** Eletroforese de DNA plasmidial das estirpes Mup^R, Mup^{RM} e MB196. 1: MD2 Mup^R, 2: MD19 Mup^R, 3: MD34 Mup^R, 4: MD45 Mup^R, 5: MD46 Mup^R, 6: MD56 Mup^R, 7: MD22 Mup^{RM}, 8: MD33 Mup^{RM}, 9: MD57 Mup^{RM}, 10: MB196. **B-** Hibridização com sonda contendo o *ileS-2*. A estirpe MB196 foi utilizada

como controle negativo para a hibridização com a sonda contendo o *ileS-2*, uma vez que essa estirpe é sensível à mupirocina.

4.12. Detecção dos elementos IS257 nas regiões flangeadoras do gene *ileS-2*

Com o objetivo de se verificar a presença de elementos IS257 nas regiões flangeadoras do determinante de resistência à mupirocina, foram realizadas quatro reações de PCR para a amplificação das regiões entre as extremidades do gene *ileS-2* e as cópias do elemento IS257 flangeadoras deste gene. Para facilitar a compreensão, os resultados das estirpes Mup^{RM} e Mup^R foram apresentados separadamente.

4.12.1. Estirpes Mup^{RM}

A análise da região flangeadora do gene *ileS-2* nas estirpes Mup^{RM} revelou *amplicons* entre as extremidades deste gene e o elemento IS257 (Figura 18). Esses resultados indicam a presença de sequências IS257 repetidas e diretas flangeando o gene *ileS-2* conforme apresentado na figura 18.

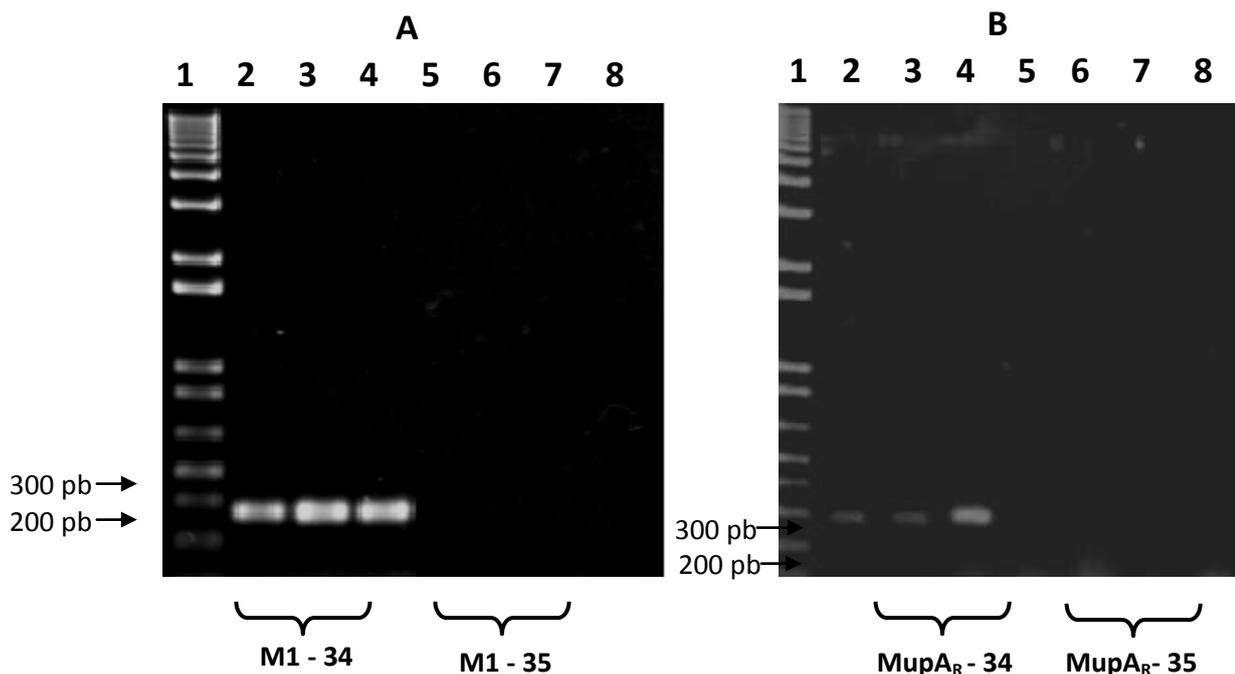


Figura 18: Eletroforese em gel de agarose- Amplificação das regiões flangeadoras do gene *ileS-2*. **A-** Estirpes Mup^{RM} com os iniciadores M1-1234 (colunas 2 - 4) e M1-1235 (colunas 5- 7). **B-** Estirpes Mup^{RM} com os iniciadores MupA_R-1234 (colunas 2 - 4) e MupA_R - 1235 (colunas 5-7). 1: Padrão de tamanho molecular 1kb (DNA ladder); 2: MD22; 3: MD33; 4: MD57; 5: MD22; 6: MD33; 7: MD57; 8: controle negativo sem DNA.

A partir dos resultados obtidos uma proposta de arranjo foi criada (Figura 19), mas para a completa elucidação da organização dos elementos IS257 nas regiões flangeadoras do gene *ileS-2*, é necessário o sequenciamento dessas regiões.



Figura 19: Hipótese de arranjo das regiões flangeadoras nas estirpes Mup^{RM} ilustrando a presença do elemento IS257 em ambas extremidades do gene *ileS-2* como repetições diretas.

4.12.2. Estirpes Mup^R

Diferentemente dos resultados homogêneos obtidos na análise das estirpes Mup^{RM}, um perfil heterogêneo foi observado nas regiões flangeadoras do gene *ileS-2* nas estirpes Mup^R (Figura 20). Nessas estirpes foram detectados *amplicons* de tamanhos diferentes, indicando uma diversidade de plasmídios nas estirpes Mup^R.

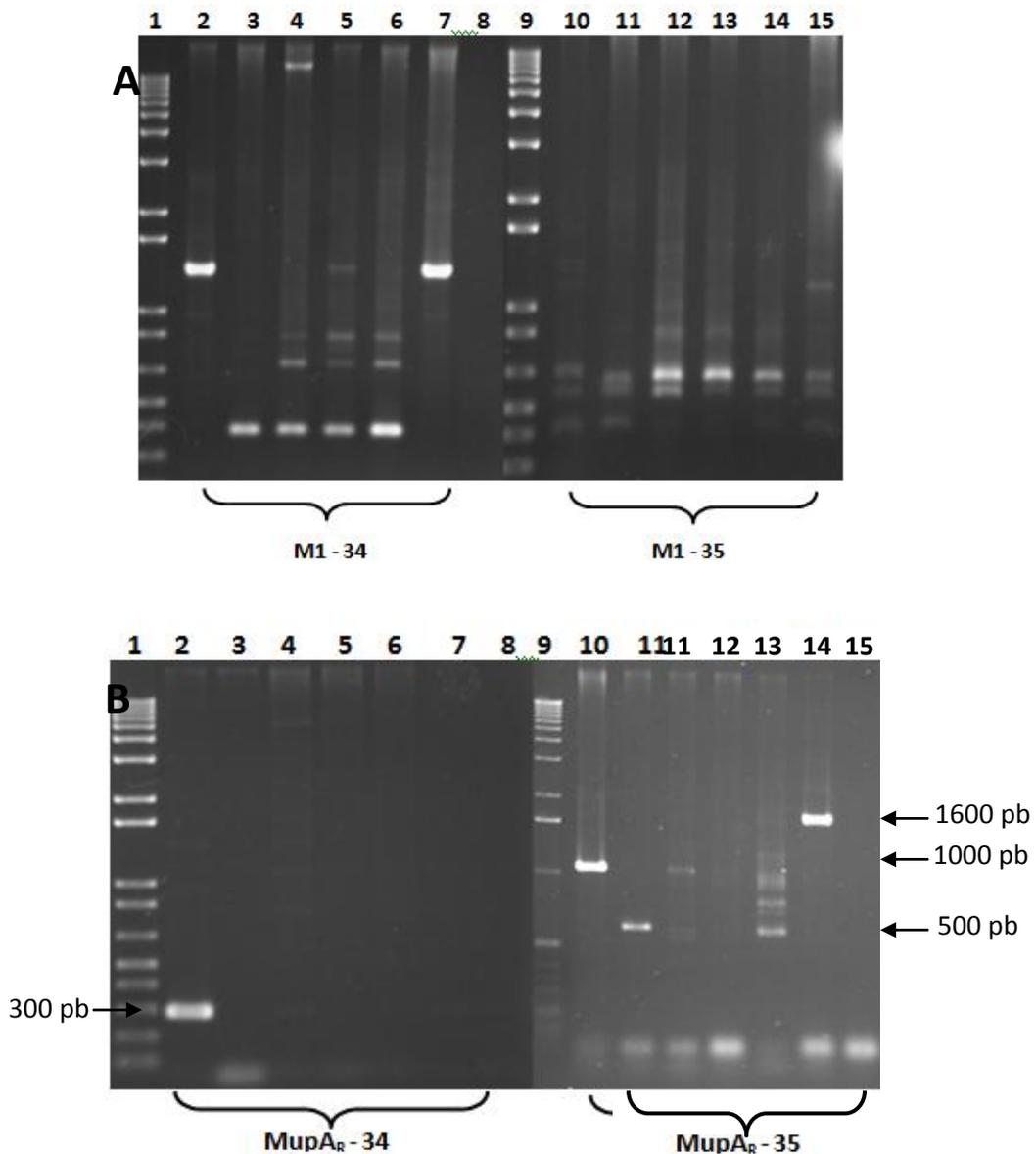


Figura 20: Eletroforese em gel de agarose de PCR- Amplificação das regiões flanqueadoras do gene *ileS-2*. **A-** Estirpes Mup^R com os iniciadores M1-34 (colunas 2 - 7) e M1-35 (colunas 10 - 15). **B-** Estirpes Mup^R com os iniciadores MupA_R-34 (colunas 2 - 7) e MupA_R - 35 (colunas 10 - 15). 1: Padrão de tamanho molecular 1kb (DNA ladder); 2: MD2; 3: MD19; 4: MD34; 5: MD45; 6: MD46; 7: MD56; 8: controle negativo sem DNA; 9: Padrão de tamanho molecular 1 kb (DNA ladder); 10: MD2; 11: MD19; 12: MD34; 13: MD45; 14: MD46; 15: MD56.

Devido à diferença de tamanho dos *amplicons* detectados nas estirpes Mup^R, foram propostos diferentes arranjos nas extremidades 5' e 3' do gene *ileS-2*, como mostrado na figura 21.

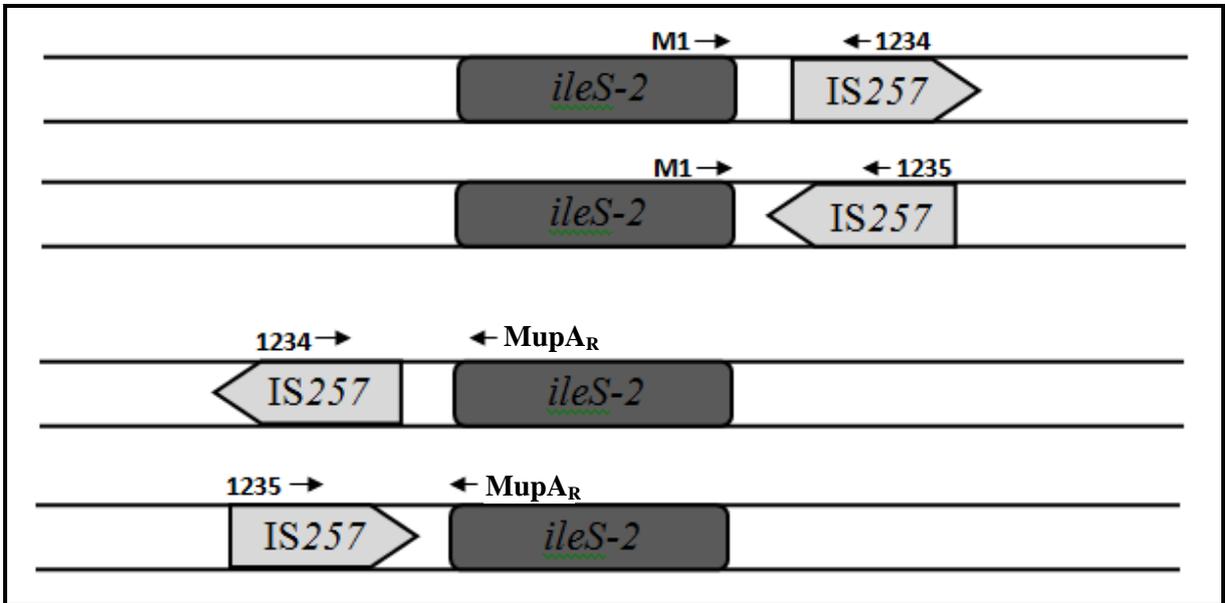


Figura 21: Hipóteses de arranjo para as regiões flanqueadoras do gene *ileS-2* nas estirpes Mup^R.

Uma vez que nas estirpes MD2 e MD56 Mup^R foram detectados *amplicons* maiores do que nas outras estirpes (Figura 20A, colunas 2 e 7; Figura 20B, colunas 10 e 15) o que sugere uma distância maior do gene *ileS-2* ao IS257, foi levantada a hipótese de haver mais de uma cópia do gene *ileS-2* nessas estirpes. Para verificar essa possibilidade, foram realizadas duas reações de PCR utilizando-se os iniciadores M1 e M1 e M1-MupA_R, pois esses iniciadores se anelam ao *ileS-2* e a detecção de um *amplicon* estaria relacionada com a presença de pelo menos duas cópias deste gene. Através dessas reações foi possível verificar que as estirpes MD2 e MD56 possuem uma cópia adicional do determinante *ileS-2* (Figura 22), o que explicaria o maior distanciamento do elemento IS257 do gene *ileS-2* nessas estirpes. Nenhum *amplicon* foi detectado nas outras estirpes analisadas.

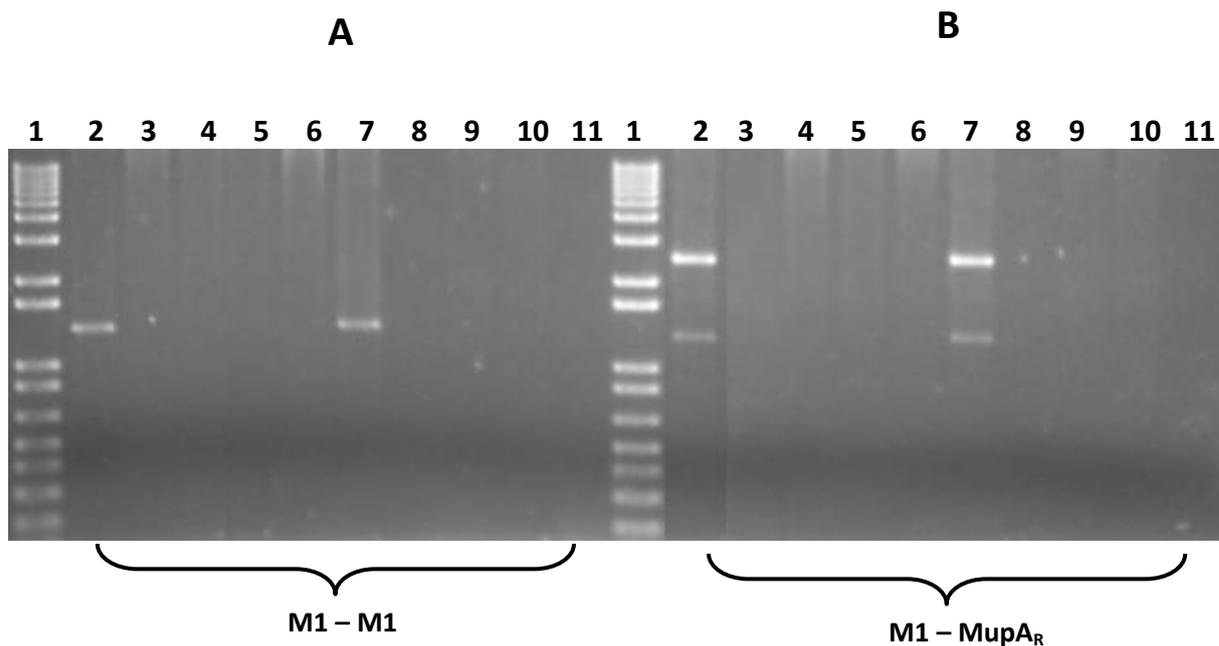


Figura 22: Eletroforese em gel de agarose – Amplificação das regiões entre duas cópias do gene *ileS-2*. **A-** Iniciadores M1- M1. **B-** Iniciadores M1 – MupA_R. 1: Padrão de tamanho molecular 1kb (DNA ladder), 2: MD2 Mup, 3: MD19 Mup^R, 4: MD34 Mup^R, 5: MD45 Mup^R, 6: MD46 Mup^R, 7: MD56 Mup^R, 8: MD22 Mup^{RM}, 9: MD33 Mup^{RM}, 10: MD57 Mup^{RM}, 11: controle negativo sem DNA.

Através desse resultado foi possível propor uma hipótese para o arranjo dos genes *ileS-2* nas estirpes MD2 e MD56 (Figura 23).



Figura 23: Hipótese de arranjo das cópias do gene *ileS-2* das estirpes MD2 e MD56, nas quais foram detectadas pelo menos três cópias deste gene.

4.13. Transferência da resistência à mupirocina de uma estirpe de *S. haemolyticus* Mup^{RM} para uma estirpe de *S. aureus* por conjugação

Com o objetivo de testar a capacidade da espécie *S. haemolyticus* transferir o determinante da resistência à mupirocina, foi realizado o processo de conjugação. Nesse experimento, a estirpe MD57 Mup^{RM} foi escolhida como protótipo de seu grupo e foi testada sua capacidade de transferir a resistência à mupirocina para uma estirpe de *S. aureus* resistente à rifampicina e novobiocina. Nesse experimento, a estirpe *S. haemolyticus* MD57 (Figura 24A) foi utilizada como doadora e a estirpe *S. aureus* RN2677 (Figura 24B) foi utilizada como receptora. Os transconjugantes (Figura 24C) obtidos foram selecionados em placas contendo mupirocina (150µg/mL), novobiocina (5µg/mL) e rifampicina (5µg/mL). O cálculo da frequência de conjugação (número de transconjugantes por célula doadora) encontra-se na tabela 6.

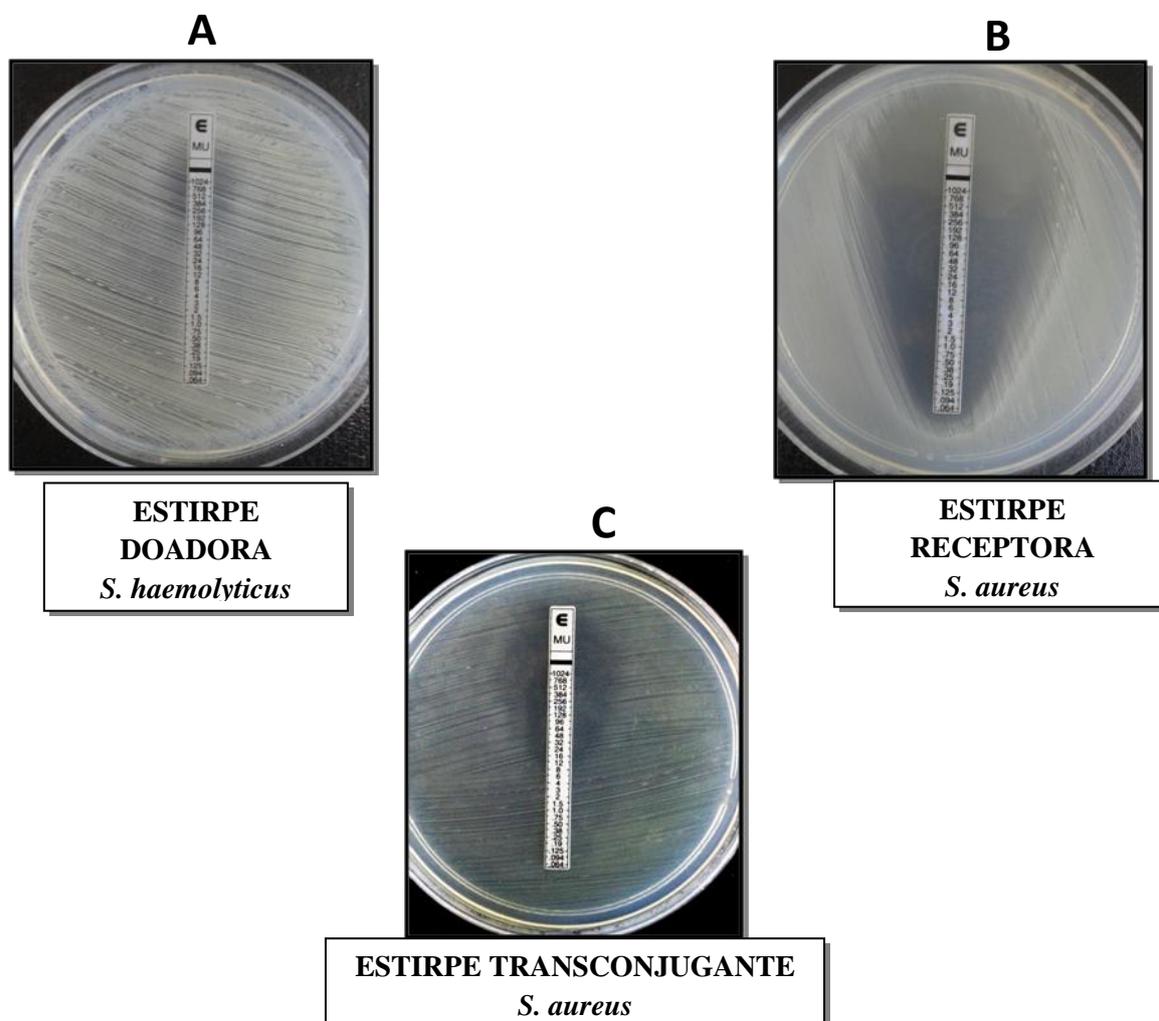


Figura 24: Transferência da resistência à mupirocina através do processo de conjugação. **A-** estirpe doadora MD57 Mup^{RM}, **B-** estirpe receptora RN2677, **C-** estirpe transconjugante (com susceptibilidade diminuída à mupirocina).

Tabela 6: Frequência de conjugação de um plasmídio Mup^{RM} de *S. haemolyticus* para *S. aureus*.

Estirpe doadora	Estirpe receptora	Antimicrobianos Seletivos	Frequência de conjugação
<i>S. haemolyticus</i> MD57	<i>S. aureus</i> RN2677	Mupirocina, novobiocina e rifampicina	9,4 x 10 ⁻⁷

4.14. Transferência da resistência à mupirocina de uma estirpe de *S. haemolyticus* Mup^R para uma estirpe de *S. aureus* por conjugação

A capacidade de transferência da resistência à mupirocina também foi testada utilizando-se a estirpe MD46 Mup^R como doadora e a estirpe RN2677 de *S. aureus* resistente à rifampicina e novobiocina como receptora. Entretanto, após 3 experimentos de conjugação, nenhuma estirpe transconjugante foi obtida. Após as 3 tentativas sem sucesso, foi levantada a hipótese desse plasmídio vir a ser transferido por mobilização.

4.15. Transferência do plasmídio pIP501 para a estirpe MD46 Mup^R

Para testar a capacidade do plasmídio Mup^R ser mobilizado por um outro plasmídio, foi necessário introduzir um plasmídio conjugativo na estirpe MD46. Assim, inicialmente foi realizado um experimento de conjugação no qual a estirpe *Enterococcus faecalis* I60, que abriga o plasmídio conjugativo pIP501 (determinante da resistência ao cloranfenicol), foi utilizada como doadora e a estirpe MD46 Mup^R foi utilizada como receptora. Os transconjugantes obtidos foram selecionados em placas contendo cloranfenicol (10µg/mL) e mupirocina (150µg/mL). A frequência de conjugação encontra-se na tabela 7.

Posteriormente, a estirpe MD46 com o plasmídio pIP501 foi utilizada como estirpe doadora, com o objetivo de testar se o plasmídio Mup^R pode ser mobilizado por outro plasmídio. Após a transferência do plasmídio pIP501, a estirpe MD46 original (Figura 25A) passou a apresentar CMI reduzida para mupirocina frente ao Teste-E (Figura 25B).

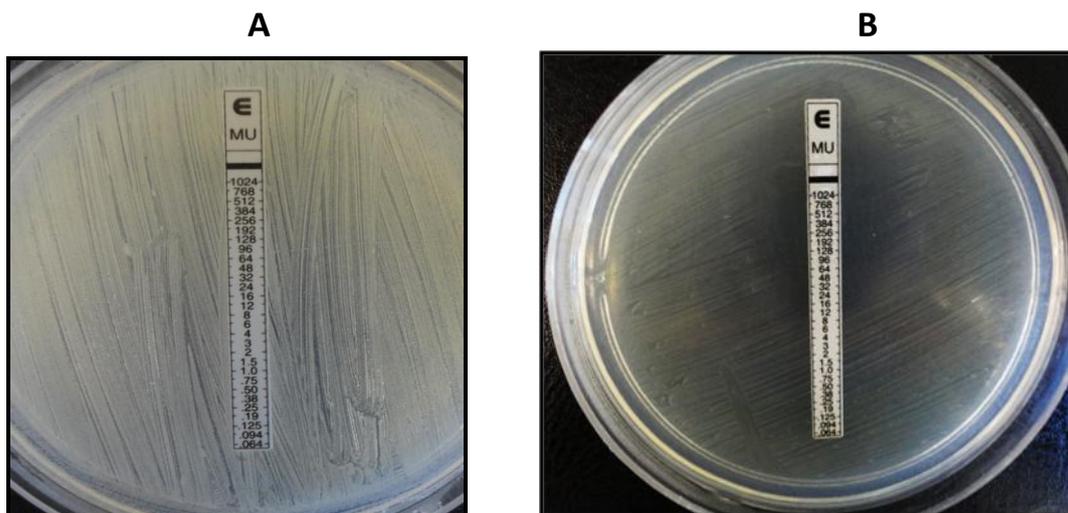


Figura 25: Teste-E para mupirocina. A - Estirpe MD46 original. B – Estirpe MD46 após aquisição do plasmídio pIP501.

Tabela 7: Frequência de conjugação do plasmídio pIP501 de *E. faecalis* para *S. haemolyticus*.

Estirpe doadora	Estirpe receptora	Antimicrobianos Seletivos	Frequência de conjugação
<i>E. faecalis</i> I60	<i>S. haemolyticus</i> MD46 Mup ^R	Cloranfenicol e mupirocina	$1,4 \times 10^{-7}$

4.16. Transferência do plasmídio Mup^R após conjugação com pIP501, de *S. haemolyticus* para *S. aureus*

Para verificar se o plasmídio Mup^R pode ser mobilizado por outro plasmídio, após a transferência do pIP501 para a estirpe MD46 Mup^R, foi realizado outro experimento de conjugação, no qual a estirpe MD46 Mup^R/pIP501 [resistente à mupirocina e cloranfenicol (Figura 26A)] foi utilizada como doadora e a estirpe RN2677 [resistente à rifampicina e novobiocina (Figura 26B)] foi utilizada como receptora, na tentativa de transferir o plasmídio Mup^R. Os transconjugantes (Figura 26C) obtidos foram selecionados em placas contendo cloranfenicol (10µg/mL), mupirocina (150µg/mL), novobiocina (5µg/mL) e rifampicina (5µg/mL). A frequência de conjugação encontra-se na tabela 8.

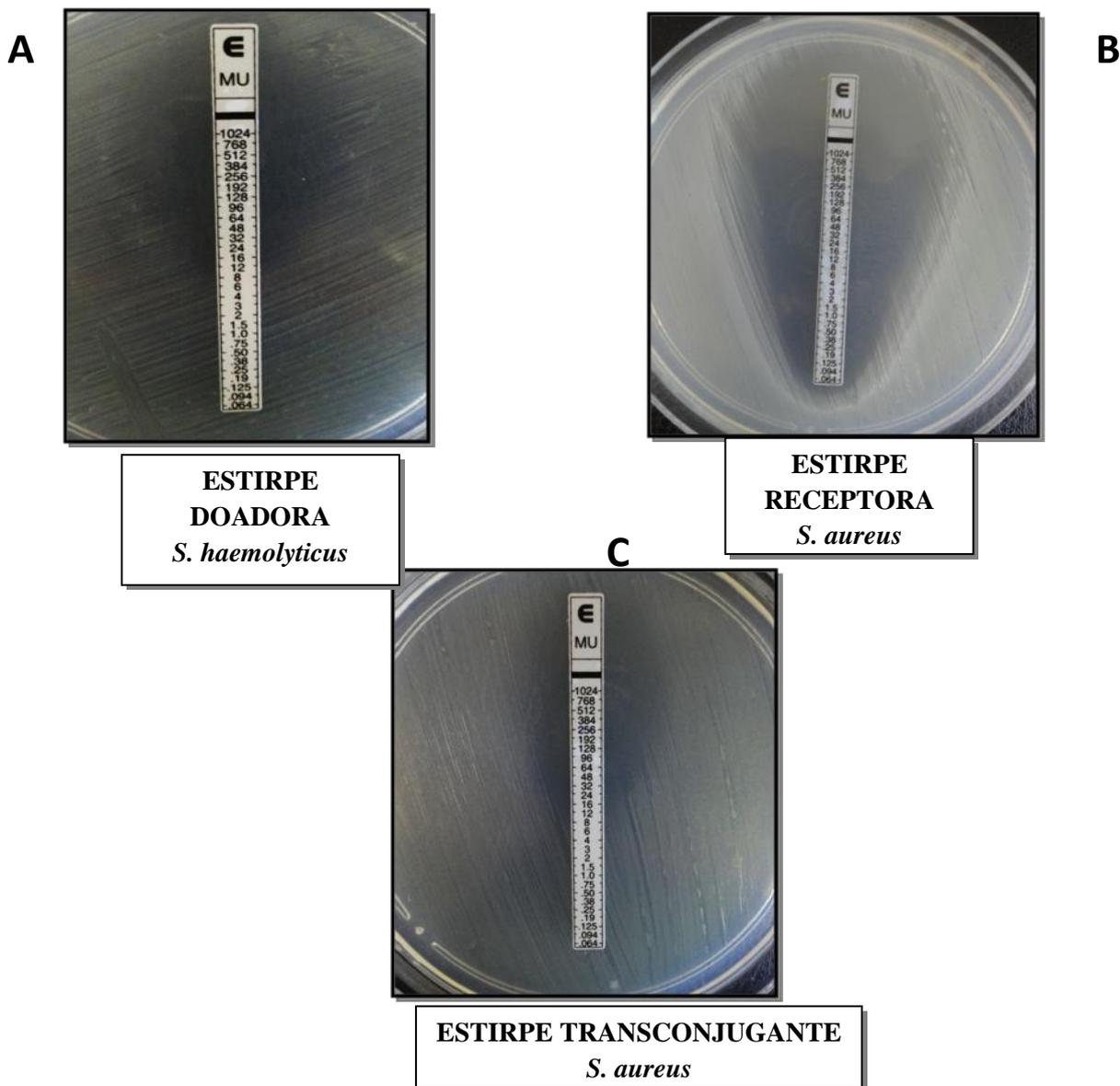


Figura 26: Teste-E para mupirocina. Transferência do plasmídio Mup^R por mobilização pelo pIP501. **A-** Estirpe doadora *S. haemolyticus* MD46/pIP501, **B-** estirpe receptora *S. aureus* RN2677, **C-** estirpe transconjugante (com susceptibilidade diminuída à mupirocina).

Tabela 8: Frequência de conjugação dos plasmídios Mup^R/pIP501 de *S. haemolyticus* para *S. aureus*.

Estirpe doadora	Estirpe receptora	Antimicrobianos Seletivos	Frequência de conjugação
<i>S. haemolyticus</i> MD46 Mup ^R /pIP501	<i>S. aureus</i> RN2677	Cloranfenicol, mupirocina, novobiocina e rifampicina	$2,0 \times 10^{-7}$

4.17. PCR para detecção do gene *ileS-2* nas estirpes transconjugantes

Com o objetivo de se detectar a presença do gene *ileS-2* nas estirpes transconjugantes foi realizada uma PCR utilizando-se os iniciadores M1 e M2 descritos em Materiais e Métodos (tabela 2). As estirpes doadoras MD57Mup^{RM} e MD46 Mup^R foram utilizadas como controles positivos e a estirpe receptora RN2677 foi utilizada como controle negativo. Foi detectado um *amplicon* de 237 pb nas estirpes doadoras e nas estirpes transconjugantes (Figura 27). Os resultados obtidos evidenciaram a transferência da característica da resistência à mupirocina em todas as estirpes transconjugantes analisadas.



Figura 27: Eletroforese em gel de agarose – Detecção de um *amplicon* de 237 pb do gene *ileS-2* nas estirpes transconjugantes. 1: Padrão de tamanho molecular 1kb (DNA ladder), 2: estirpe doadora MD57 Mup^{RM}, 3: transconjugante RN2677/Mup^{RM}, 4: transconjugante RN2677/Mup^{RM}, 5: estirpe receptora RN2677, 6: estirpe I60 (doadora do pIP501), 7: transconjugante MD46/pIP501, 8: transconjugante MD46/ pIP501, 9: MD46 Mup^R, 10: transconjugante RN2677/Mup^R/ pIP501, 11: transconjugante RN2677/Mup^R/pIP501, 12: negativo.

5. DISCUSSÃO

A espécie *S. haemolyticus* desempenha um importante papel em infecções adquiridas em hospitais e relacionadas a dispositivos médicos invasivos. Além disso, essa espécie apresenta a maior taxa de estirpes resistentes aos antimicrobianos entre os SCN, o que limita as opções terapêuticas disponíveis e faz com que as infecções causadas por esse micro-organismo se tornem mais um problema nas instituições de saúde (FREDHEIM *et al.*, 2009). Além disso, tem se discutido que os SCN, resistentes a múltiplos fármacos, incluindo os *S. haemolyticus*, atuam como reservatório de genes de resistência para *S. aureus*, dentre os quais, o gene *mecA*, determinante da resistência à meticilina (LECLERCQ, 2009).

Em virtude da importância clínica de estirpes de *S. haemolyticus* e da existência de poucos trabalhos a respeito da resistência à mupirocina nessa espécie descritos na literatura, o presente estudo visou caracterizar essa resistência em estirpes nosocomiais de *S. haemolyticus*. Para tanto, foi realizada uma triagem para a resistência à mupirocina em estirpes nosocomiais de *S. haemolyticus* do Hospital Naval Marcílio Dias isoladas de hemocultura no período de 2005 a 2008. Uma vez que não existe uma recomendação do CLSI quanto ao teste de susceptibilidade para mupirocina (CLSI, 2010), para essa etapa de triagem foi utilizada a estratégia dos laboratórios de Microbiologia Clínica para a detecção de estirpes resistentes à mupirocina, a qual consiste na triagem pelo método de difusão a partir de disco utilizando-se o disco contendo 5 µg de mupirocina. Contudo, o teste com disco de 5 µg de mupirocina permite classificar a estirpe avaliada apenas como susceptível (halos ≥ 14 mm) ou resistente a altos níveis do antimicrobiano [halos de inibição com diâmetro ≤ 13 mm (Mup^R: CMI ≥ 512 µg/mL)], de acordo com os critérios de interpretação elaborados por Fuchs e colaboradores (1990). No entanto, uma vez que as estirpes Mup^I (CMI 8 - 256 µg/mL) podem ser eliminadas pela utilização correta do antimicrobiano na concentração local adequada (DOEBBELING *et al.*, 1993), faz-se necessária a determinação correta do tipo de resistência envolvido. Para tanto, além do disco de 5 µg, também foi utilizado o disco de 200 µg de mupirocina, como preconizado por Oliveira e colaboradores (2007) para *S. aureus*, a fim de detectar estirpes resistentes a altos níveis e a níveis intermediários. De acordo com os critérios estabelecidos por esses pesquisadores, das 75 estirpes analisadas, 3 mostraram-se resistentes a níveis intermediários e 6 a altos

níveis de mupirocina e foram selecionadas para este estudo. No entanto, a detecção do gene *ileS-2* nas estirpes Mup^I foi um resultado inesperado, uma vez que raramente esse gene foi relatado no cromossomo de estirpes de *S. aureus* resistentes a níveis intermediários de mupirocina, sendo encontrado de forma predominante em estirpes Mup^R. Então, para confirmar a CMI das estirpes pertencentes ao grupo Mup^I, foi realizado o método do Teste-E, o qual revelou que tais estirpes apresentavam uma CMI > 256 µg/mL e, portanto deveriam ser classificadas como Mup^R. Entretanto, quando comparadas com uma estirpe Mup^R pelo método do Teste-E para mupirocina, foi possível detectar dois grupos de resistência com CMI diferente e, por isso, as estirpes anteriormente classificadas como Mup^I, foram denominadas Mup^{RM} (resistência mediana para mupirocina). É importante ressaltar que o critério de Oliveira e colaboradores (2007), utilizado para a interpretação dos resultados obtidos no teste de difusão a partir de discos de 5 e 200 µg para mupirocina, foram estabelecidos para *S. aureus*, e na falta de outro critério, foi utilizado nesse trabalho para classificar estirpes de *S. haemolyticus*. No entanto, foi possível verificar que tal critério não distingue de forma satisfatória estirpes Mup^I em *S. haemolyticus*, reforçando a necessidade de novos critérios para determinação da susceptibilidade à mupirocina em SCN, assim como preconizado por Oliveira e colaboradores (2007). Por esse motivo, o Teste-E para mupirocina foi utilizado de maneira complementar, visando uma classificação definitiva. O Teste-E® é apresentado na literatura como um método de boa acurácia para a determinação da susceptibilidade à mupirocina (FINLAY, MILLER & POUPARD, 1997), mas possui valor financeiro elevado quando comparado aos discos de 5 e 200 µg de mupirocina usados no teste de difusão a partir de disco e, por esse motivo, não foi utilizado na etapa de rastreamento, seu uso foi resguardado para a confirmação da CMI apenas nas estirpes Mup^I e transconjugantes. No entanto, faz-se necessária a determinação da CMI para mupirocina através do método de microdiluição em caldo, já que este método é considerado padrão-ouro para determinação da CMI dos antimicrobianos.

As estirpes de *S. haemolyticus* analisadas através do teste de difusão a partir de disco foram previamente identificadas pelo sistema automatizado MicroScan WalkAway (Dade Behring, Inc, West Sacramento, CA, EUA) no hospital de origem. As estirpes resistentes à mupirocina selecionadas tiveram sua identificação confirmada no presente estudo por PCR espécie-específico através da amplificação do gene *mvaA*, que codifica a enzima HMG-CoA redutase, uma enzima da via do mevalonato, importante

para o metabolismo bacteriano (SCHUENCK *et al.*, 2008). Através da análise genotípica dessas estirpes pelo método de PFGE, utilizando-se os critérios de interpretação de Van Belkum e colaboradores (2007), foi possível verificar que as estirpes pertencentes ao grupo Mup^{RM}, que inclui as estirpes MD22, MD33 e MD57 foram indistinguíveis entre si quanto ao perfil de fragmentação de DNA genômico e, portanto, foram classificadas como tipo A, tipo predominante. Esses resultados contribuem para a sugestão de que o plasmídeo Mup^{RM} possa ser idêntico nas três estirpes, uma vez que os resultados das ampliações das regiões flangeadoras do gene *iles-2* não mostraram nenhuma diferença nas estirpes pertencentes a este grupo, reforçando a similaridade entre elas. Por outro lado, uma diversidade no perfil de fragmentação de DNA genômico foi detectada nas estirpes Mup^R, assim como observado através da análise das regiões flangeadoras do gene *iles-2*, que mostraram uma diversidade nessas regiões. Os resultados obtidos através do PFGE, permitiu classificar as estirpes Mup^R em diferentes tipos e subtipos, reforçando a hipótese de diversidade plasmidial nessas estirpes.

Como descrito na literatura, as estirpes resistentes à mupirocina, possuíam o gene *ileS-2*, o que pôde ser verificado através da amplificação de um fragmento de 237 pb correspondente a este gene, segundo o protocolo estabelecido em nosso laboratório por Nunes e colaboradores (1999). Entretanto, esse gene foi detectado tanto nas estirpes Mup^R quanto nas estirpes Mup^{RM}. Nossos resultados reafirmam os achados de vários autores, mostrando que o gene *ileS-2*, por ser altamente diferenciado do gene *ileS-1*, tem sequências específicas que permitem identificá-lo rapidamente através de métodos moleculares de hibridização (CONNOLLY, NOBLE & PHILLIPS, 1993; RAHMAN, NOBLE & DYKE, 1993; HOGDSON *et al.*, 1994) e de amplificação por PCR (NUNES *et al.*, 1999). De fato, quando utilizamos a sonda com sequências específicas de *ileS-2* verificamos hibridização no DNA plasmidial tanto nas formas OC quanto nas formas CCC das estirpes Mup^{RM} e Mup^R. O sinal de hibridização observado no DNA cromossômico provavelmente ocorreu devido a rupturas sofridas no DNA plasmidial durante a técnica de extração, que resultou na co-migração com o DNA cromossômico, visto que como dito anteriormente, as sequências do gene *ileS-2* são altamente diferenciáveis do gene *ileS-1* cromossomial e, portanto, não há possibilidade de hibridização desse gene com a sonda utilizada. Reforçando esta afirmação observamos que o cromossomo do controle negativo, estirpe Mup^S, que contém o gene *ileS-1*, na figura 17B, não apresentou nenhuma hibridização.

Do ponto de vista metodológico, em comparação com os métodos fenotípicos, nossos resultados reafirmam a rapidez e a acurácia da variância *multiplex* da PCR para detectar simultaneamente os genes *ileS-2* e *mecA*, e, paralelamente, a eficácia, simplicidade, rapidez e baixo custo (NUNES *et al.*, 1999; FERREIRA *et al.*, 2003).

Os resultados de “cura” da resistência à mupirocina nas estirpes Mup^{RM} e Mup^R sugerem que esta estaria associada à presença de plasmídios nessas estirpes, uma vez que as estirpes curadas mostraram-se sensíveis à mupirocina quando analisadas pelo método do Teste-E e também, quando o DNA dessas estirpes foi submetido à PCR verificou-se a perda do determinante *ileS-2*, indicando a perda da resistência à mupirocina após o processo de “cura”. As estirpes não curadas, MD2 e MD46, deverão ter um maior número de colônias testadas, embora a hibridização com sonda para o gene *ileS-2*, tenha mostrado o envolvimento de um plasmídio de alto peso molecular com a resistência à mupirocina.

A análise da região flanqueadora do gene *ileS-2*, através de PCR para amplificação da região entre a extremidade deste gene e o elemento IS257 mais próximo, revelou *amplicons* de diferentes tamanhos nas estirpes Mup^R analisadas, assim como descrito por Woodford e colaboradores (1998). Esses resultados sugerem uma variedade na localização do gene *ileS-2* nos plasmídios Mup^R, o que indica uma diversidade plasmidial que pode ser resultado de eventos de recombinação ou transposição envolvendo os elementos IS257 (WOODFORD *et al.*, 1998). Resultados semelhantes foram encontrados em nosso laboratório ao se analisar 3 estirpes de *S. haemolyticus* resistentes a altos níveis de mupirocina (FERREIRA *et al.*, manuscrito em preparação). Resultados diferentes foram observados nas estirpes Mup^{RM}, as quais mostraram *amplicons* do mesmo tamanho, quando analisadas as regiões entre o gene *ileS-2* e o elemento IS257 mais próximo, reforçando uma semelhança entre estes plasmídios. A análise dessas 3 estirpes por PFGE revelou que através deste método, elas são consideradas indistinguíveis, de acordo com os critérios de Van Belkum e colaboradores (1998), o que contribui para a sugestão de que o plasmídio presente nestas estirpes seja semelhante, sugerindo a transmissão vertical desse plasmídio.

A capacidade conjugativa de plasmídios de resistência à mupirocina foi demonstrada em diversos trabalhos (RAHMAN *et al.*, 1990; DYKE *et al.*; 1991; BASTOS *et al.*, 1999; HURDLE *et al.*, 2005). Entretanto, não há relatos na literatura de transferência de resistência à mupirocina envolvendo estirpes clínicas de *S. haemolyticus* e *S. aureus*. O único relato de transferência da resistência à mupirocina

por conjugação envolvendo estirpes de *S. haemolyticus* e *S. epidermidis* foi descrito por Udo e colaboradores (1997). Entretanto, tal transferência só foi conseguida quando se utilizou uma estirpe manipulada em laboratório, a qual não possuía sistema de restrição de DNA exógeno, visto que, após quatro tentativas sem sucesso utilizando-se estirpes clínicas de *S. aureus* como receptora, nenhum transconjugante foi obtido. Tentativas realizadas em nosso laboratório evidenciaram a transferência da resistência à mupirocina entre *S. aureus* e *S. epidermidis*, mas nenhum transconjugante foi obtido quando se utilizou *S. haemolyticus* como estirpe receptora (BASTOS *et al.*, 1999).

Esse trabalho contém o primeiro relato da transferência da resistência à mupirocina de *S. haemolyticus* para *S. aureus*, sugerindo a capacidade desse SCN ser um hospedeiro natural de plasmídios de resistência à mupirocina. As diferenças observadas entre as CMI das estirpes originais e das transconjugantes, devem-se a características da célula receptora e não aos plasmídios, uma vez que cada plasmídio foi transferido para uma mesma estirpe mantida em laboratório (PROJAN & ARCHER, 1989).

O plasmídio de resistência à mupirocina da estirpe Mup^{RM} MD57, selecionada para os experimentos de conjugação, mostrou-se auto-transferível, enquanto o plasmídio da estirpe Mup^R MD46, após três tentativas de conjugação não mostrou essa capacidade. Por esse motivo, testou-se a capacidade desse plasmídio Mup^R ser mobilizado por um outro plasmídio e, para tanto, foi transferido o plasmídio conjugativo Cn^R pIP501 para a estirpe Mup^R, a qual passou a ter a capacidade conjugativa, indicando que nessa estirpe o plasmídio embora não seja auto-transferível, é mobilizável. Resultados similares foram obtidos por Udo e Sarkoo (2010) que após utilizar três estirpes de *S. aureus* resistentes a altos níveis de mupirocina como doadoras, não conseguiram a transferência desta resistência por conjugação. A transferência só foi possível após a conjugação das estirpes doadoras com o plasmídio conjugativo de *S. aureus* pWBG636, o qual mobilizou o plasmídio Mup^R e, desta forma, permitiu a transferência da resistência à mupirocina.

Plasmídios que abrigam o gene *ileS-2* desempenham um importante papel na disseminação da resistência à mupirocina e estão associados a problemas clínicos e epidemiológicos (PÉREZ-ROTH *et al.*, 2010). O plasmídio pMG1 descrito por Bastos e colaboradores (1999) foi responsável pela resistência a altos níveis de mupirocina na primeira estirpe MRSA resistente à mupirocina isolada no Hospital Universitário do Rio de Janeiro. Os plasmídios de resistência à mupirocina descritos na literatura variam em

tamanho, na capacidade de serem transferidos, curados e quanto ao polimorfismo dos fragmentos de restrição com a enzima *EcoRI* (COOKSON, 1998). Já foram relatados plasmídios de 25 kb, carreando apenas a resistência à mupirocina e de 41,4kb, conferindo resistência à mupirocina, trimetoprim, tetraciclina e cádmio (ELTRINGHAM, 1997).

Devido à facilidade e rapidez pelas quais genes de resistência à mupirocina são transferidos através de plasmídios conjugativos e o potencial reservatório para esses plasmídios em SCN, qualquer aumento no uso de mupirocina estaria favorecendo um aumento do número de estirpes resistentes a este antimicrobiano.

Tentativas a fim de se controlar a ocorrência de infecções hospitalares estão direcionadas para a identificação precoce de estirpes resistentes e para a adoção de metodologias que evitem a propagação destes microrganismos a partir de indivíduos colonizados e/ou infectados. Essas metodologias incluem o emprego de medidas educacionais entre os profissionais de saúde, isolamento de pacientes colonizados e/ou infectados por estirpes resistentes e o uso criterioso de antimicrobianos (TOMASZ *et al.*, 1994).

Tendo em vista que a maior prevalência de *S. haemolyticus* seja em casos de endocardites ou infecções associadas a dispositivos médicos invasivos, o uso da mupirocina não é direcionado para o tratamento de infecções causadas por este microrganismo, visto que este antimicrobiano é um agente tópico. No entanto, dados obtidos nesse trabalho sugerem que *S. haemolyticus* possa ser um reservatório de genes desta resistência e atuar na disseminação desses determinantes entre *Staphylococcus* spp. Pode-se finalmente concluir que, a fim de se prevenir a disseminação de plasmídios de resistência à mupirocina entre estirpes de *Staphylococcus* spp., a implementação de medidas quanto à utilização de mupirocina e a triagem correta de estirpes que apresentam resistência a este antimicrobiano devem ser adotadas.

6. CONCLUSÕES

Nossos resultados permitem concluir que:

- 1- O critério de interpretação do método de difusão em disco para mupirocina estabelecido para *S. aureus* não se aplica em *S. haemolyticus*, indicando a necessidade de novos critérios para a correta classificação da resistência à mupirocina em SCN;
- 2- O gene *ileS-2* é responsável pela resistência à mupirocina nas estirpes Mup^{RM} e Mup^R;
- 3- A resistência à mupirocina nas estirpes Mup^{RM} e Mup^R está associada à presença de um plasmídio de alto peso molecular;
- 4- As estirpes Mup^R analisadas apresentam uma diversidade plasmidial a qual pode ser resultado de eventos de recombinação e transposição envolvendo os elementos IS257;
- 5- As estirpes Mup^{RM} apresentam o mesmo perfil genotípico e plasmidial, o que sugere a transmissão vertical do plasmídio de resistência à mupirocina nessas estirpes;
- 6- Os experimentos de conjugação mostraram que o plasmídio Mup^{RM} é conjugativo e pode ser transferido para estirpes susceptíveis à mupirocina;
- 7- O plasmídio Mup^R embora não seja auto-transferível, pode ser mobilizado por outro plasmídio presente na mesma célula;

COATES, T.; BAX, R. & COATES A. **Nasal decolonization of *Staphylococcus aureus* with mupirocin: strengths, weaknesses and future prospects.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 64(1): 9-15. 2009.

CONNOLLY, S.; NOBLE, W. C. & PHILLIPS, I. **Mupirocin resistance in coagulase-negative staphylococci.** Journal of Medical Microbiology. 39: 450-453. 1993.

COOKSON, B. D. **The emergence of mupirocin resistance: a challenge to infection control and antibiotic prescribing practice.** Journal of Antimicrob. Chemotherapy. 41: 11-18. 1998.

CUCARELLA, C.; TORMO, M. A.; UBEDA, C.; TROTONDA, M. P.; MONZON, M.; PERIS, C.; AMORENA, B.; LASA, I.; PENADES, J.R. **Role of biofilm-associated protein Bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*.** Infection and Immunity. 72: 2177-2185. 2004.

CUNHA, M.L.R.S.; CALSOLARI, R.A.O. & JUNIOR, J.P.A. **Detection of enterotoxin and toxic shock syndrome toxin 1 genes in *Staphylococcus*, with emphasis on coagulase-negative staphylococci.** Microbiology and Immunology. 51 (4): 381-390. 2007.

CURTISS, R. **Bacterial conjugation.** Annual Review of Microbiology. 23:69-136. 1969.

DAVIS, K.A.; STEWART, J.J., CROUCH H.K., FLOREZ, C.E. & HOSPENTHAL, D.R. **Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) nares colonization at hospital admission and its effect on subsequent MRSA infection.** Clinical Infectious Diseases. 39: 776-782. 2004.

DEL VECCHIO, V. G.; PETROZIELLO, J. M.; GRESS, M. J.; McCLESKEY, F. K.; MELCHER, G. P.; CROUCH, H. K. & LUPSKI, J. R. **Molecular genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* via fluorophore-enhanced repetitive sequence PCR.** Journal of Clinical Microbiology. 33: 2141-2144. 1995.

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

DINGES, M. M.; ORWIN, P. M. & SCHLIEVERT, P. M.; **Exotoxins of *Staphylococcus aureus*.** Clinical Microbiology Reviews. 13 (1): 16-34. 2000.

DOEBBELING, B. N.; BREBEMAN, D. L.; NEU, H. C. & ALI, R. **Elimination of *Staphylococcus aureus* nasal carriage in health care workers: analysis of six clinical trials with calcium mupirocin ointment.** Clinical Infectious Diseases. 17: 466-474. 1993.

DYKE, K. G.; CURNOCK, S. P.; GOLDING, M. & NOBLE, W. C. **Cloning of the gene conferring resistance to mupirocin in *Staphylococcus aureus*.** FEMS Microbiology Letters. 61: 195-198. 1991.

ELTRINGHAM, I. **Mupirocin resistance and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA).** Journal of Hospital Infection. 35(8):1-8. 1997.

EUZÉBY, J.P. **List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature – Genus *Staphylococcus***.
<http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html>. 25/05/2010.

EVANS, RR. P. Jr. & MACRINA, F. L. **Streptococcal R plasmid pIP501: endonuclease site map, resistance determinant location, and construction of novel derivatives**. *Journal of Bacteriology*. 154: 1347-1355. 1983.

FALCONE, M.; CAMPANILE, F.; GIANNELLA, M.; BORBONE, S.; STEFANI, S. & VENDITTI M. ***Staphylococcus haemolyticus* endocarditis: clinical and microbiologic analysis of 4 cases**. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 57 (2007) 325–331. 2007.

FERREIRA, R. B. R.; IÓRIO, N. L. P.; MALVAR, K. L. ; NUNES, A. P. F.; FONSECA, L. S. & SANTOS, K. R. N. **Coagulase-negative staphylococci: Comparison of phenotypic and genotypic oxacillin susceptibility test and evaluation of Agar screening test by using different concentrations of oxacillin**. *Journal of Clinical Microbiology*. 41(8): 3609-3614. 2003.

FINLAY, J. E.; MILLER, L. A. & POUPARD, J. A. **Interpretive criteria for testing susceptibility of staphylococci to mupirocin**. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1137-1139. 1997.

FLUIT, A. C.; VERHOEF, J.; SCHMITZ, F. J. EUROPEAN SENTRY PARTICIPANTS. **Frequency of isolation and antimicrobial resistance of gram-negative and gram-positive bacteria from patients in intensive care units of 25 European University hospitals participating in the European arm of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program 1997-1998**. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 20: 617-625. 2001.

FRANCIA, M. V.; VARSAKI, A.; GARCILLÁN-BARCIA, M. P.; LATORRE, A.; DRAINAS, C. & DE LA CRAUZ, F. **A classification scheme for mobilization regions of bacterial plasmids**. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Review*. 28:79-100. 2004.

FREDHEIM, E. G. A.; KLINGENBERG, C.; ROHDE, H.; FRANKENBERGER, S.; GAUSTAD, P.; FLAEGSTAD, T. & SOLLID, J. E. **Biofilm formation by *Staphylococcus haemolyticus***. *Journal of Clinical Microbiology*. 1172-1180. 2009.

FUCHS, P.C.; JONES, R.N. & BARRY, A. **Interpretative criteria for disk diffusion susceptibility testing of mupirocin, a topical antibiotic**. *Journal of Clinical Microbiology*. 28: 608-609. 1990.

FYNLAY, J. E.; MILLER, L. A. & POUPARD, J. A. **Interpretative criteria for testing susceptibility of staphylococci to mupirocin**. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 41(5): 1137-1139. 1997.

GIAMBIAGI-deMARVAL, M.; MAFRA, M. A.; PENIDO, E. G. C. & BASTOS, M. C. F. **Distinct groups of plasmids correlated with bacteriocin production in *Staphylococcus aureus***. *Journal of General Microbiology*. 136: 1591-1599. 1990.

GIAMBIAGI-deMARVAL, M.; SANTOS, K. R. N. & BASTOS, M. C. F. **Mupirocin resistance: our experience in multiresistant staphylococcal strains isolated in Brazil**. *Res. Adv. Microbiol.* 5, 2005.

GILL, S.R.; FOUTS, D.E.; ARCHER, G.L.; MONGODIN, E.F.; DEBOY, R.T.; RAVEL, J.; PAULSEN, I.T.; KOLONAY, J.F.; BRINKAC, L.; BEANAN, M.; DODSON, R.J.; DAUGHERTY, S.C.; MADUPU,

R.; ANGIUOLI, S.V.; DURKIN, A.S.; HAFT, D.H.; VAMATHEVAN, J.; KHOURI, H.; UTTERBACK, T.; LEE, C.; DIMITROV, G.; JIANG, L.; QIN, H.; WEIDMAN, J.; TRAN, K.; KANG, K.; HANCE, I.R.; NELSON, K.E. & FRASER, C.M. **Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcusepidermidis* strain.** Journal of Bacteriology. 187 (7): 2426-2438. 2005.

GILLESPIE, M. T.; LYON, B. R.; LOO, L. S. L., MATHEWS, P. R.; STEWART, P. R. & SKURRAY, R. A. **Homologous direct repeat sequences associated with mercury, methicillin, tetracycline and trimethoprim resistance determinants in *Staphylococcus aureus*.** Federation of European Microbiology Societies Microbiology Letters. 43(2):165-171. 1987.

GOMIS-RÜTH, F. X. & COLL, M. **Cut and move: protein machinery for DNA processing in bacterial conjugation.** Current Opinion in Structural Biology. 16(6): 744-752. 2006.

GROHMANN, E.; MUTH, G. & ESPINOSA, M. **Conjugative plasmid transfer in Gram-positive bacteria.** Microbiology and Molecular Biology Reviews. 67: 277- 301. 2003.

GRUBB, W.B. **Genetics of MRSA.** Reviews in Medical Microbiology. 9: 153-162. 1998.

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

HOGDSON, J. E.; CURNOCK, S. I.; DYKE, K. G. H.; MORRIS, R.; SYLVESTER, D. R. & GROSS, M. S. **Molecular characterization of the gene encoding high-level mupirocin resistance in *Staphylococcus aureus* J2870.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 38: 1205-1208. 1994.

HOLT, G.H.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T. & WILLIAMS, S.T. **Gram-positive cocci.** In: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* – 9th ed. Williams & Wilkins, Baltimore, USA p.532-558. 1994.

HURDLE, J. G.; O'NEILL, A. J.; MODY, L.; CHOPRA, I. & BRADLEY, S. F. **In vivo transfer of high-level mupirocin resistance from *Staphylococcus epidermidis* to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with failure of mupirocin prophylaxis.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 56: 1166-1168. 2005.

IWATSUKI, K.; YAMASAKI, O.; MORIZANE, S. & OONO T. **Staphylococcal cutaneous infections: invasion, evasion and aggression.** Journal of Dermatological Science 42: 203-214. 2006.

JANSSEN, D.A.; ZARINS, L.T.; SCHABERG, D.R.; BRADLEY, S.F.; TERPENNING, M.S. & KAUFFMAN, C.A. **Detection and characterization of mupirocin resistance in *Staphylococcus aureus*.** Antimicrobial. Agents and Chemotherapy. 37 (9): 2003-2006. 1993.

JARLOV, J. O. **Phenotypic characteristics of coagulase-negative staphylococci: typing and antibiotic susceptibility.** Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica. 107, 1S-42S. 1999.

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

strains with low-level mupirocin resistance. Journal of Clinical Microbiology. 47(12): 4158-4160. 2009.

MORTON, T. M.; JOHNSTON, J. L.; PATTERSON, J. & ARCHER, G. L. **Characterization of a conjugative staphylococcal mupirocin resistance plasmid.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 39(6): 1272-1280. 1995.

NATOLI, S.; Fontana, C.; Favaro, M.; Bergamini, A.; Testore, G.; Minelli, S.; Bossa, M. C.; Casapulla, M.; Broglio, G.; Beltrame, A.; Cudillo, L.; Cerretti, R. & Leonardis, F. **Characterization of coagulase-negative staphylococcal isolates from blood with reduced susceptibility to glycopeptides and therapeutic options.** BioMedCentral Infectious Disease. 9:83. 2009.

NEEDHAM, C.; RAHMAN, M.; DYKE, K. G. H. & NOBLE, W. C. **An investigation of plasmids from *Staphylococcus aureus* that mediate resistance to mupirocin and tetracycline.** Microbiology. 140:2577-2583. 1994.

NEEDHAM, C.; NOBLE, W. C. & DYKE, K. G. H. **The staphylococcal insertion sequence IS257 is active.** Plasmid. 34: 198-205. 1995.

NIKAIDO, H. **Multidrug resistance in bacteria.** Annual Review of Biochemistry. 78: 119–146. 2009.

NUNES, E.L.C.; SANTOS, K.R.N.; MONDINO, P.J.J.; BASTOS, M.C.F. & GIAMBIAGI-deMARVAL, M. **Detection of *ileS-2* gene encoding mupirocin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by multiplex PCR.** Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 34: 77-81. 1999.

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

OLIVEIRA, N.E.; CARDOZO, A.P.; MARQUES, E.A.; SANTOS, K.R.N. & GIAMBIAGI-deMARVAL, M. **Interpretative criteria to differentiate low-and high-level mupirocin resistance in *Staphylococcus aureus*.** Journal of Medical Microbiology. 56 (Pt7):937-9. 2007.

OTTO, M. **Virulence factors of the coagulase-negative staphylococci.** Frontiers in Bioscience. 9: 841-863. 2004.

PÉREZ-ROTH, E.; KWONG, S.M.; ALCOBA-FLOREZ, J.; FIRTH, N. & MÉNDEZ-ÁLVAREZ, S. **Complete nucleotide sequence and comparative analysis of pPR9, a 41.7-kilobase conjugative staphylococcal multiresistance plasmid conferring high-level mupirocin resistance.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 54(5): 2252-2257. 2010.

PROJAN, S. J. & ARCHER, G. L. **Mobilization of the relaxable *Staphylococcus aureus* plasmid pC221 by the conjugative plasmid pGO1 involves three pC221 loci.** Journal of Bacteriology. 171(4): 1841-1845. 1989.

RAHMAN, M.; NOBLE, W. C. & DYKE, K. G. H. **Probes for the study of mupirocin resistance in staphylococci.** Journal of Medical Microbiology. 39: 446-449. 1993.

RAMSEY, M. A.; BRADLEY, S. F., KAUFFMAN, C. A. & MORTON, T. A. **Identification of chromosomal location of *mupA* gene, encoding low-level mupirocin resistance in staphylococcal isolates.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 40: 2820-2823. 1996.

REAGAN D. R.; DOEBBELING, B. N.; PFALLER, M. A.; SHEETZ, C. T.; HOUSTON, A. K.; HOLLIS, R. J. & WENZEL, R. P. **Elimination of coincident *S. aureus* nasal and hand carriage with intranasal application of mupirocin calcium ointment.** Annals of Internal Medicine. 114: 101-106. 1991.

ROGERS, K. L.; FEY, P. D. & RUPP, M. E. **Coagulase-negative staphylococcal infections.** Infectious Disease Clinics of North America. 23:73-98. 2009.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F. & MANIATIS. **Molecular cloning. A laboratory manual.** New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.

SCANVIC, A.; DENIC, F.; GAILLON, S.; GIRY, P.; ANDREMONT, A. & LUCET, J. **Duration of colonization by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* after hospital discharge and risk factors for prolonged carriage.** Clinical and Infectious Disease. 32:1393-1398. 2001.

SCHUENCK, R.P.; DADALTI, P.; SILVA, M.G.; FONSECA, L.S. & SANTOS, K.R.N. **Oxacillin- and mupirocin- resistant *Staphylococcus aureus*: *in vitro* activity of silver sulphadiazine and cerium nitrate in hospital strains.** Journal of Chemotherapy. 16(5):453-8. 2004.

SCHUENCK, R. P.; PEREIRA, E. M.; IORIO, N. L. & DOS SANTOS K. R. **Multiplex PCR assay to identify methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus*.** Federation of European Microbiological Societies Immunology and Medical Microbiology. 52(3): 431-435. 2008.

SHINEFIELD, H.R. & RUFF, N.L. **Staphylococcal infections: a historical perspective.** Infectious Disease Clinics of North America. 23: 1-15. 2009.

SHITTU, A.; LIN, J.; MORRISON, D. & KOLAWOLE, D. **Isolation and molecular characterization of multiresistant *Staphylococcus sciuri* and *Staphylococcus haemolyticus* associated with skin and soft-tissue infections.** Journal of Medical Microbiology. 53: 51-55. 2004.

SILVERMAN, P. M. **Towards a structural biology of bacterial conjugation.** Molecular Microbiology. 23(3): 423-429. 1997.

SIMOR, A.E. & DANEMAN N. ***Staphylococcus aureus* decolonization as a prevention strategy.** Infectious Disease Clinics of North America. 23:133-151. 2009.

SMITH, T. & JARVIS, W. **Antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus*.** Microbes and Infection. 1: 795-805. 1999.

SNYDER, L. & CHAMPNESS, W. **Molecular Genetics of Bacteria.** ASM Press, Washington, D.C. 3ª edição. 2007.

SOUZA, A. M.; SANCHES, I.S.; VAN BELKUM, A.; VAN LEEUWEN, W.; VERBRUGH, H. & DE LENCASTRE, H. **Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Portuguese hospitals by multiple genotyping methods.** Microbial Drug Resistance. **2**: 331-341. 1996.

SOUZA, A. M.; SANCHES, I. S.; VAN BELKUM, A.; VAN LEEUWEN, W.; VERBRUGH, H. & DE LENCASTRE, H. **Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Portuguese hospitals by multiple genotyping methods.** Microbial Drug Resistance. **2**: 331-41. 2006.

SUTHERLAND R.; BOON, R. J.; GRIFFIN, K. E.; MASTERS, P.J.; SLOCOMBE, B. & WHITE A. R. **Antibacterial activity of mupirocin (pseudomonic acid), a new antibiotic for topical use.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Apr;27(4):495-8. 1985.

THOMAS J. & ARCHER, G.L. **Identification and cloning of the conjugative transfer region of *Staphylococcus aureus* plasmid pGO1.** Journal of Bacteriology. 171:684-691. 1989.

THOMAS, C. M.; HOTHERSALL, J.; WILLIS, C. L. & SIMPSON, T. J. **Resistance to and synthesis of the antibiotic mupirocin.** Nature Reviews. **8**:281-289. 2010.

TOMASZ, A. **Benefit and risk in the β -lactam antibiotic-resistance strategies of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus*.** Trends of Microbiology. **2**:380-385. 1994.

TOUCHON, M. & ROCHA E. P. **Causes of insertion sequences abundance in prokaryotic genomes.** Molecular Biology and Evolution. **24** (4): 969-981. 2007.

UDO, E.E.; JACOB, L.E. & MOKADAS, E.M. **Conjugative transfer of high-level mupirocin resistance from *Staphylococcus haemolyticus* to other staphylococci.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy. **41**(3): 693-695. 1997.

UDO, E. E.; PEARMAN, J. W. & GRUBB, W. B. **Emergence of high-level mupirocin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Western Australia.** Journal of Hospital Infection. **26**: 157-165. 1994.

UDO, E. E. & SARKHOO, E. **Genetic analysis of high-level mupirocin resistance in the ST80 clone of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** Journal of Medical Microbiology. **59**: 193-199. 2010.

VAN BELKUM, A.; TASSIOS, P. T.; DIJKSHOORN, L.; HAEGGMAN, S.; COOKSON, B.; FRY, N. K.; FUSSING, V.; GREEN, J.; FEIL, E.; GERNER-SMIDT, P.; BRISSE, S. & STRUELENS, M. **Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology.** Clinical Microbiology and Infectious Diseases. **13**: 1- 46. 2007.

VERHOEF, J. **Host defense against infection.** In: *The Staphylococci in Human Disease*, Crossley, K.B. & Archer, G.L. (eds), Churchill Livingstone, New York, USA, p.213-232. 1997.

VERMELHO, A. B.; BASTOS, M. C. F. & SÁ, M. H. B. In: **Bacteriologia Geral**. Capítulo 8. Editora Guanabara Koogan S. A. 2008.

VON EIFF, C.; PETERS, G. & HEIFFMANN C. **Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci.** Lancet Infectious Disease. 2: 677-85. 2002.

WEY, S. B. **Infection control in a country with annual inflation of 3.600%.** Infection Control and Hospital Epidemiology. 16: 175-178. 1995.

WOODFORD, N.; WATSON, A. P.; PATEL, S.; JEVON, M.; WAGHORN, D. J. & COOKSON, B. D. **Heterogeneous location of the *mupA* high-level mupirocin resistance gene in *Staphylococcus aureus*.** Journal of Medical Microbiology. 47: 829-835. 1998.

7.1. Meios de cultura

- a) BHI (*Brain Heart Infusion* – Difco – Le Pont de Claix, France)
- b) MHA (*Müeller-Hinton Ágar* – Difco – Le Pont de Claix, France)
- c) TSB (*Trypticase Soy Broth* – Oxoid – Basingstoke, Hampshire, England)
- d) TSA (*Trypticase Soy Agar* – Merck – Darmstadt, Germany)

7.2. Soluções e tampões

- a) Clorofórmio-isoamíl-álcool (24:1)
Clorofórmio 96 mL; isoamíl-álcool 4 mL
- b) Etanol 70%
Etanol absoluto (Reagen – Rio de Janeiro, Brasil) 70 mL
- c) Solução de lise EC (pH 7,5)
Tris/HCl (Pharmacia) 6 mM; NaCl (Merck – Darmstadt, Germany) 1M; EDTA (Reagen) 100 mM; brij 0,5%; lauril sarcosinato de sódio 0,5%
- d) Solução Denhardt 50x
Ficoll (Sigma) 1g; PVP (Sigma) 1g; BSA 1g; água destilada q.s.p.100 mL
- e) Solução desnaturante
NaOH (Merck – Rio de Janeiro, Brasil) 0,5 M; NaCl 1,5 M
- f) Solução estoque de brometo de etídeo
Brometo de etídeo (Sigma – Steinheim, Germany) 10 mg/mL
- g) Solução ESP (pH 9,5)
EDTA (Reagen – Rio de Janeiro, Brasil) 0,4M; lauril sarcosinato de sódio 5, 1% (p/v)

- h) Solução neutralizante
Tris/HCl (Pharmacia) 1,0 M; NaCl 1,5 M
- i) Solução pré-hibridizante
SSC 20X; solução de Denhardt 50X; EDTA (Reagen) 0,5M; SDS 10%; água destilada q.s.p. 50 mL.
- j) Solução salina
NaCl 0,85% (p/v)
- k) SSC 20X
NaCl 3,0 M; citrato de sódio 0,3 M
- l) Tampão de estirpe para eletroforese
Glicerol (Merck) 50% (p/v); EDTA (Reagen) 0,1 M; azul de bromo fenol 0,2% (p/v)
- m) Tampão de lise
Tris/HCl (Pharmacia) 50 mM; EDTA (Reagen) 40 mM; NaCl 50 mM; sacarose 25% (p/v)
- n) Tampão TBE 10x (pH 8,2)
Tris 89 mM; H₃BO₃ (Promega – Madison, USA) 89 mM; EDTA (Reagen) 2,5 mM
- o) Tampão TE 1x (pH 7,8)
Tris/HCl (Pharmacia) 10 mM; EDTA (Reagen) 1 mM
- p) Tampão PIV (pH 7,6)
NaCl 1M; Tris/HCl (Pharmacia) 10 mM
- q) Tiocianato de guanidina (5M)
Guanidina (Promega – Madison, USA) 5,9 g; água destilada q.s.p.10 mL.

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](#)