

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**DETECÇÃO DA RESISTÊNCIA À OXACILINA E
PERFIL DE SENSIBILIDADE DE *Staphylococcus*
COAGULASE NEGATIVOS ISOLADOS EM UM
HOSPITAL ESCOLA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Fabiane Rigatti

Santa Maria, RS, Brasil

2010

**DETECÇÃO DA RESISTÊNCIA À OXACILINA E PERFIL DE
SENSIBILIDADE DE *Staphylococcus* COAGULASE
NEGATIVOS ISOLADOS EM UM HOSPITAL ESCOLA**

por

Fabiane Rigatti

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Análises Clínicas e Toxicológicas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de

MESTRE EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rosmari Hörner

SANTA MARIA – RS, BRASIL

2010

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**DETECÇÃO DA RESISTÊNCIA À OXACILINA E PERFIL DE
SENSIBILIDADE DE *Staphylococcus* COAGULASE NEGATIVOS
ISOLADOS EM UM HOSPITAL ESCOLA**

elaborada por
Fabiane Rigatti

**como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas**

COMISSÃO EXAMINADORA

**Prof^a. Dr^a. Rosmari Hörner
(Orientador/Presidente)**

Prof. Dr. Cícero A. Dias (UFCSPA)

Prof. Dr. Alexandre Rieger (UNISC)

Santa Maria, 29 de outubro de 2010

*Dedico este trabalho a minha mãe pelo exemplo
de persistência e dignidade. Ela que sempre me incentivou
e acreditou nos meus sonhos. Também, pelas vezes que deixou
seus propósitos para dedicar-se aos meus.
Esta conquista, também lhe pertence.
Obrigada!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela vida, pela saúde, fé e perseverança.

Em especial aos meus pais, Valci e Vilmar, pela dedicação, apoio e incentivo durante toda minha jornada acadêmica. Também, por me ensinarem os valores da lealdade, sinceridade, respeito e valorização dos estudos, único bem precioso que não se vende, se compra ou empresta. Agradeço ao meu irmão Juliano, aos meus avós Lory e Leonelo, e aos meus tios Valdeci e Benhur, por sempre estarem presentes e por me ensinarem o valor do convívio com a família.

Agradeço ao meu namorado Rodrigo, pelo incentivo, companheirismo, amor, paciência e compreensão em todos os momentos de ausência e renúncia para que este trabalho pudesse ser realizado.

À minha orientadora Rosmari Hörner, por todos esses anos de convívio, pela oportunidade, amizade, carinho e compreensão. Também, pelos ensinamentos transmitidos desde a graduação, e que foram de extrema importância durante esta jornada. Muito obrigada!

À minha amiga e colega Vanessa O. Domingues, por estar sempre comigo durante a elaboração deste trabalho, tanto nas horas difíceis como nas de descontração. Obrigada!

Aos meus colegas Cláudia Bertoncheli dos Santos, Gustavo L. Paraginski e Luiz G. Reetz pelos ensinamentos transmitidos durante o tempo em que trabalhamos juntos, permitindo assim que a condução deste trabalho fosse mais tranquila.

As minhas colegas e amigas Rosiéli Martini, Máisa Tizzoti e Magda Rohers pela ajuda durante a realização deste trabalho e pelas palavras de apoio nos momentos difíceis.

Ao grupo de pesquisa do Laboratório de Bacteriologia, em especial a Marjorie, Fábio, Maikel, Claiton, Claudia, Mônica e Adriane pela ajuda na elaboração deste trabalho. Obrigada pelos momentos alegres, engraçados e pelas nossas “festinhas” que faziam de nossa rotina pesada, momentos recompensadores.

Agradecimento especial ao Prof. Dr. Mateus Matiuzzi da Costa e ao grupo de pesquisa do Laboratório de Imunologia e Microbiologia da Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina/Pernambuco, pelo auxílio na pesquisa.

A minha pequena Sophia, companheira e cheia de alegria que transmitia com um simples olhar. Nos momentos que passamos em contato com os livros e artigos foi sempre minha fiel companheira. Mostrou-me que amor e companheirismo são coisas a serem compartilhadas, sem pedir nada em troca.

As bioquímicas e técnicas do setor de microbiologia do LAC do HUSM pela contribuição neste trabalho, coletando as amostras utilizadas nesta pesquisa.

A UFSM por ter possibilitado a realização dos meus cursos de graduação e pós-graduação. Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pelos ensinamentos passados, e contribuição na minha formação acadêmica.

Quero expressar minha profunda gratidão aos amigos e pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho.

*Quanto maior o número de coisas que importam
e quanto mais intensamente tais coisas nos tocam,
mais vivos nos tornamos.*

Arthur Gordon

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

DETECÇÃO DA RESISTÊNCIA À OXACILINA E PERFIL DE SENSIBILIDADE DE *Staphylococcus* COAGULASE NEGATIVOS ISOLADOS EM UM HOSPITAL ESCOLA

AUTORA: FABIANE RIGATTI

ORIENTADORA: PROF.^(A). DR.^(A). ROSMARI HORNER

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 29 de outubro de 2010.

Por muitos anos os *Staphylococcus* coagulase negativos (SCoN), comensais da pele, foram considerados como simples contaminantes. No entanto, nas últimas décadas, emergiram como importantes agentes de infecções nosocomiais, principalmente em imunocomprometidos e portadores de biomateriais. Isso é atribuído a crescente resistência antimicrobiana apresentada por estes microrganismos, sendo a resistência à oxacilina o principal mecanismo apresentado pelos SCoN. Desta forma, este estudo objetivou caracterizar esta resistência, bem como o perfil de sensibilidade de 160 isolados de SCoN obtidos de pacientes admitidos no HUSM. Além de comparar testes fenotípicos utilizados na detecção laboratorial da resistência à oxacilina com a detecção genotípica do gene *mecA*, considerado padrão ouro. Os testes de sensibilidade aos antimicrobianos foram efetuados pela técnica qualitativa de difusão do disco (CLSI 2009), bem como pelo método semi-quantitativo (MicroScan®). A detecção fenotípica da resistência foi realizada com os discos de cefoxitina e oxacilina. A identificação genotípica do gene *mecA* foi realizada por PCR. Juntamente a detecção molecular do gene *mecA* foi realizado a detecção do gene *icaD*, responsável pela formação de biofilme. *S. epidermidis* (62%) foi a principal espécie identificada entre as amostras selecionadas para este estudo e sangue, o material clínico prevalente (38%). Devido a serem comensais da pele, foi realizada uma avaliação da significância clínica das amostras selecionadas, de onde evidenciamos que 48% dos isolados foram considerados os prováveis agentes etiológicos das infecções. As UTIs adulto e neonatal representam as unidades clínicas prevalentes no isolamento de SCoN, com 33% e 29% dos isolados, respectivamente. Em relação a sensibilidade aos antimicrobianos observou-se um elevado índice de resistência entre os isolados. Estes foram agrupados em 7 perfis de sensibilidade prevalentes, sendo que 3 caracterizaram-se pela resistência a maioria dos antimicrobianos testados. Todas as cepas foram sensíveis à linezolida, teicoplanina e tigeciclina, totalizando 59 (36,8%). Todos os isolados foram sensíveis à vancomicina. Através dos resultados dos testes fenotípicos, verificou-se que 89% e 94% dos isolados foram caracterizados como resistentes à oxacilina, utilizando os discos de cefoxitina e oxacilina, respectivamente. Pela técnica molecular, 79% dos isolados carregavam o gene *mecA*. A partir da análise estatística evidenciou-se sensibilidade de 96% para o disco de cefoxitina e de 95% para o disco de oxacilina, quando comparados ao padrão ouro. A formação de biofilme foi evidenciada em 45% das amostras testadas, onde o *S. epidermidis* foi identificado como prevalente nas amostras biofilme positivas (74%). Os métodos fenotípicos utilizados neste estudo mostraram-se equivalentes na detecção da resistência à oxacilina quando comparados ao padrão ouro, sendo que o uso do disco de oxacilina em conjunto com o de cefoxitina deve ser encorajado, uma vez que, o disco de oxacilina pode identificar outros mecanismos de resistência não mediados pelo gene *mecA*. Em relação ao perfil de sensibilidade dos isolados houve grande resistência aos antimicrobianos de primeira escolha usados para o tratamento de SCoN. Palavras-chave: SCoN, resistência, oxacilina, cefoxitina, gene *mecA*.

Palavras-chave: SCoN, resistência, oxacilina, cefoxitina, gene *mecA*.

ABSTRACT

Master's Degree Dissertation
Program Post-Graduate in Pharmaceutical Science
Federal University of Santa Maria

DETECTION OF OXACILLIN RESISTANCE AND SUSCEPTIBILITY OF COAGULASE-NEGATIVE *Staphylococcus* ISOLATED IN A HOSPITAL SCHOOL

AUTHOR: FABIANE RIGATTI

SUPERVISOR: PROF. DR. ROSMARI HORNER

Place and Date of Defense: Santa Maria, October 29, 2010.

For many years coagulase negative *Staphylococcus* (CoNS), skin commensals, were regarded as mere contaminants. However, in recent decades, they emerged as important agents of nosocomial infections, particularly in immunocompromised patients and patients with biomaterials. This is attributed to increasing antimicrobial resistance by these microorganisms, and oxacillin resistance was the main mechanism presented by CoNS. Thus, this study aimed to characterize this resistance, as well as the susceptibility of 160 isolates of CoNS obtained from patients admitted to HUSM, and also compare phenotypic tests used in laboratory detection of oxacillin resistance with genotypic detection of *mecA* gene, considered the gold standard. The antimicrobial susceptibility tests were performed by the qualitative technique of disk diffusion (CLSI 2009), as well as by semi-quantitative method (MicroScan®). The phenotypic detection of resistance was performed by using cefoxitin and oxacillin disk. The genotypic identification of *mecA* gene was performed by PCR. Together with the molecular detection of *mecA* gene was performed the detection of gene *icaD*, responsible for biofilm formation. *S. epidermidis* (62%) was the main species identified among the samples selected for this study, and the prevalent clinical material was blood (38%). Due to the fact that they are skin commensals, an evaluation of clinical significance of the selected samples was performed. It presented that 48% of the isolates were considered more likely to be the etiologic agents of infections. The adult and neonatal ICUs represent prevalent clinical units in isolation of CoNS, with 33% and 29% of the isolates, respectively. Regarding the antimicrobial susceptibility, a high rate of resistance among the isolates was observed. These were grouped into seven prevalent susceptibility profiles, in which three were characterized by resistance to most of the antimicrobials tested. All strains were susceptible to linezolid, teicoplanin and tigecycline, in total 59 isolates (36.8%). All isolates were susceptible to vancomycin. Through the results of phenotypic tests, 89% and 94% of the isolates were characterized as oxacillin resistant by using cefoxitin and oxacillin disks, respectively. The molecular technique revealed that 79% of isolates carried *mecA* gene. A susceptibility of 96% to cefoxitin disk and 95% to oxacillin disk could be found from the statistical analysis when compared to the gold standard. Biofilm formation was observed in 45% of samples tested, in which *S. epidermidis* has been identified as prevalent in positive biofilm samples (74%). The phenotypic methods used in this study are equivalent for detecting oxacillin resistance when compared to the gold standard, and the use of oxacillin disk together with cefoxitin disk should be encouraged, since the oxacillin disk can identify other resistance mechanisms not mediated by *mecA*. In relation to susceptibility of the isolates, there was a high resistance to first-choice antimicrobial used for the treatment of CoNS.

Keywords: CoNS, resistance, oxacillin, cefoxitin, *mecA*.

LISTA DE QUADROS E GRÁFICOS

- QUADRO 1-** Diâmetros utilizados para interpretação dos antibiogramas realizados com as amostras de SCoN envolvidas no estudo..... **53**
- QUADRO 2-** Representação da técnica de microdiluição em caldo utilizada para a determinação da CIM do antimicrobiano vancomicina..... **54**
- QUADRO 3-** Parâmetros para a interpretação dos testes fenotípicos utilizados para a detecção da resistência à oxacilina em isolados de SCoN..... **55**
- GRÁFICO 1-** Distribuição em nível de espécie dos 160 isolados de SCoN provenientes de pacientes admitidos no HUSM durante o período de janeiro a dezembro de 2008.....**59**

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1-** Micrografia eletrônica de varredura de biofilme formado por *S. epidermidis* em superfícies abióticas (cateter) (Fonte: BERNARDI, 2007)**23**
- FIGURA 2-** Representação da biossíntese do PIA (Fonte: GOTZ, 2002)**26**
- FIGURA 3-** Demonstrativo das prováveis fontes de SCoN causadores de bacteremia (Adaptado de COSTA, 2004)**35**
- FIGURA 4-** Estrutura do peptídeoglicano em bactérias Gram-positivas**44**
- FIGURA 5-** Organização molecular do complexo *mec* e sua localização cromossomal relativa aos fatores *fem*, *pur-nor-his* (Fonte: CHAMBERS, 1997)**46**
- FIGURA 6-** Representação da disposição dos discos de antimicrobianos usada na técnica de difusão do disco**52**
- FIGURA 7-** Representação do teste fenotípico de difusão do disco utilizando os discos de cefoxitina (30 µg) e oxacilina (1 µg), onde o isolado em questão foi caracterizado como resistente para ambos os discos**68**
- FIGURA 8-** Teste molecular para detecção do gene *mecA* nos isolados de SCoN selecionados para este estudo**68**

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- Distribuição dos espécimes clínicos dos quais foram isolados os 160 SCoN dos pacientes admitidos no HUSM no período de janeiro a dezembro de 2008	60
TABELA 2- Material clínico de procedência das 62 amostras de SCoN isoladas durante o período do estudo que foram consideradas como prováveis agentes etiológicos de infecção através da análise dos prontuários dos pacientes	61
TABELA 3- Dados referentes aos 5 pacientes internados no HUSM dos quais mais de uma amostra de SCoN considerada significativa foi isolada	62
TABELA 4- Distribuição das amostras de SCoN isolados durante o período do estudo de acordo com a unidade hospitalar de procedência	63
TABELA 5- Sensibilidade antimicrobiana dos 160 isolados de SCoN obtidos de pacientes admitidos no HUSM, no período de janeiro a dezembro de 2008, de acordo com os testes de difusão do disco	64
TABELA 6- Perfis de sensibilidade prevalentes dos 160 isolados de SCoN provenientes de pacientes admitidos no HUSM no período de janeiro a dezembro de 2008, de acordo com a metodologia de difusão do disco (CLSI 2009)	65
TABELA 7- Sensibilidade aos antimicrobianos das 160 cepas de SCoN isoladas no HUSM, no período de janeiro de 2008 a janeiro de 2009, utilizando-se a automação MicroScan®	66
TABELA 8- Distribuição dos isolados de SCoN de acordo com a CIM para as duas marcas testadas	67
TABELA 9- Testes fenotípicos e moleculares para detecção da resistência à oxacilina nos 140* isolados de SCoN	69
TABELA 10- Relação dos isolados de SCoN envolvidos no estudo que apresentaram resultados discrepantes no teste fenotípico de detecção da resistência à oxacilina na qual foi empregada a técnica de difusão do disco	70

TABELA 11- Resultados dos testes para caracterização da resistência à oxacilina das 140 cepas de SCoN isoladas de pacientes atendidos no HUSM, no período de janeiro a dezembro de 200871

TABELA 12: Valores de sensibilidade, especificidade, VPP e VPN dos testes fenotípicos realizados com os isolados de SCoN envolvidos no estudo.....71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL – microlitro

ATCC – *American Type Culture Collection*

CIM – concentração inibitória mínima

CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CVC – cateter venoso central

CTcriac – Centro de Tratamento da criança com câncer

CTMO – Centro de Transplante de Medula Óssea

CTT – 2,3,5-trifeniltetrazólio

DD – Difusão do disco

DNA – ácido desoxirribonucleico

dNTPs – desoxirribonucleotídeos

FDA – Food and Drug Administration

HUSM – Hospital Universitário de Santa Maria

ICS – Infecções da Corrente Sanguínea

LAC – Laboratório de Análises Clínicas

MgCl₂ – cloreto de magnésio

MRS – *Staphylococcus* meticilina (oxacilina) resistente

MRSA – *Staphylococcus aureus* meticilina (oxacilina) resistente

MRSCoN – *Staphylococcus* coagulase negativos meticilina (oxacilina) resistente

NCCLS – *National Committee for Clinical Laboratory Standards*

NNIS- Pesquisa Nacional de Infecções Nosocomiais

PA – Pronto Atendimento

PBP – proteína ligadora de penicilina

PCR – reação em cadeia da polimerase

PIA – polissacarídeo de adesão intercelular

PSA – polissacarídeo capsular adesina

S. – *Staphylococcus*

S_{CoN} – *Staphylococcus* coagulase negativos

SCC_{mec} – cassette cromossômico estafilocócico

TCLE – Termo de Esclarecimento e Livre Consentimento

TSA – Trypt Soy Agar

TTF – trifetilformazam

UTI – Unidade de Tratamento Intensivo

VRE – *Enterococcus* resistente à vancomicina

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	17
2 – OBJETIVOS	19
3 – REVISÃO DA LITERATURA	20
3.1 – Identificação dos SCoN	20
3.2 – Patogênese	22
3.2.1 – Formação de biofilme (<i>slime</i>)	22
3.2.2 – Resistência antimicrobiana.....	27
3.3 – Fatores de risco.....	30
3.4 – Epidemiologia.....	33
3.5 – Significância clínica dos isolados de SCoN	34
3.5.1 – Bacteremias	35
3.5.2 – Infecções relacionadas a cateteres	37
3.6 – Resistência à oxacilina (metecilina)	40
3.6.1 – Histórico da resistência à oxacilina	40
3.6.2 – Importância da resistência à oxacilina em SCoN	41
3.6.3 – Resistência aos glicopeptídeos	43
3.6.4 – Caracterização da resistência à oxacilina	44
3.6.5 – Detecção da resistência à oxacilina	48
3.7 – Instituto de padrões clínicos e laboratoriais (CLSI/NCCLS)	48

4 – MATERIAIS E MÉTODOS	50
4.1 – Procedência e acondicionamento das amostras	50
4.2 – Critérios de inclusão das amostras	50
4.3 – Testes de suscetibilidade aos antimicrobianos	50
4.3.1 – Difusão do disco	51
4.3.2 – Automação MicroScan®(Siemens)	53
4.3.3 – Microdiluição em caldo	53
4.4 – Testes para a detecção da resistência à oxacilina	55
4.4.1 – Testes fenotípicos	55
4.4.2 – Testes moleculares	55
4.4.2.1 – Preparo da amostra (extração do DNA genômico)...	55
4.4.2.2 – Preparação dos reagentes	56
4.4.2.3 – Preparo da reação	56
4.4.2.4 – Análise dos produtos	56
4.4.2.5 – Controle positivo da reação	57
4.5 – Reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção do gene <i>icaD</i> envolvido na formação de biofilme nos isolados	57
4.6 – Significância clínica dos isolados	57
4.7 – Análise estatística dos dados.....	58
5 – RESULTADOS.....	59
6 - DISCUSSÃO.....	73
7 – CONCLUSÕES.....	87
8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89
9 - ANEXOS.....	107
9.1 – Artigo aceito pela Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical	107

1- INTRODUÇÃO

Os *Staphylococcus* coagulase negativos (SCoN) estão entre os principais microrganismos isolados no laboratório de microbiologia (ABDALLAH, 2006), no entanto, por se tratarem de habitantes normais da pele e mucosas, muitas vezes são considerados como simples contaminantes em uma amostra clínica. Nesse contexto, devido a sua relação de simbiose com o hospedeiro, estes microrganismos foram considerados como não patogênicos por muitos anos (BERNARDI, 2007).

Entretanto, nas últimas décadas, os SCoN têm emergido como importantes agentes de infecções nosocomiais, principalmente bacteremias, das quais o *Staphylococcus epidermidis* é um dos principais agentes etiológicos (EIFF, 2002). Estas bactérias atingem, principalmente pacientes imunocomprometidos, neonatos e em uso de dispositivos médicos invasivos, exercendo seu potencial patogênico quando inoculados no hospedeiro através de agulhas ou lesões de pele ou mucosas (HEINKS, 2005). Devido ao fato de serem patógenos oportunistas, se preveem de situações orgânicas para causar infecções graves nestes pacientes (KLOOS, 1999).

Em virtude de sua crescente importância em infecções nosocomiais, a correta identificação dos SCoN em nível de espécie têm se tornado importante nos laboratórios clínicos, uma vez que algumas espécies possuem potencial patogênico reconhecido, especialmente em isolados de origem hospitalar (LAYER, 2006). Além do mais, esta identificação auxilia clínicos e microbiologistas na difícil tarefa de diferenciar o SCoN significativo do contaminante, uma vez que, ainda não existe um padrão ouro para diferenciar o patogênico do contaminante (WEINSTEIN, 2003).

Em decorrência desta dificuldade, vários critérios clínicos e laboratoriais têm sido utilizados para que uma caracterização mais efetiva dos isolados clinicamente significativos seja feita. Esta identificação rápida é relevante, principalmente quando se trata de pacientes internados em unidades de terapia intensiva (UTI), neonatos e imunocomprometidos, pois estes pacientes são os alvos principais nos quais os SCoN causam infecções. É relevante, também considerar o fato de isolados de SCoN nosocomiais serem comumente multirresistentes (FERREIRA, 2003).

Outro fator importante a ser considerado sobre os SCoN é a habilidade destas bactérias, em especial do *S. epidermidis*, de produzir uma substância extracelular durante seu crescimento sobre superfícies inertes e que favorece sua aderência e

formação de biofilme (VUONG & OTTO, 2002). Esta capacidade é considerada um dos principais fatores de virulência neste grupo de microrganismos (VEESTRA, 1996). A produção de biofilme é encontrada em cepas de SCoN associadas a infecções que envolvem cateteres intravasculares ou biomateriais (KLOOS & BANNERMAN, 1994), e uma vez formado o biofilme, removê-lo pode se tornar um processo difícil (MORALES, 2004).

Os SCoN isolados de hospitais estão associados a mecanismos de resistência a múltiplas classes de antimicrobianos, em particular, ao mecanismo de resistência à oxacilina (PREDARI, 1991). Este mecanismo de resistência, conhecido como resistência clássica, está relacionado à presença do gene cromossômico *mecA*, que codifica a produção de proteínas ligadoras de penicilina (PBP) alteradas, isto é, com baixa afinidade por antibióticos β -lactâmicos, sendo denominadas PBP2a ou PBP2' e a expressão desta pode ser homogênea ou heterogênea. Entretanto, outros dois mecanismos desta resistência, também, são conhecidos, porém menos freqüentes, a hiperprodução de β -lactamases e a modificação das PBPs 1, 2 e 4 (ROSSI, 2004).

Vários métodos de detecção da resistência à oxacilina têm sido exaustivamente estudados, já que a expressão fenotípica desta resistência é usualmente heterogênea (ANTUNES, 2007). A partir de 2004, o *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI) passou a recomendar o uso do disco de cefoxitina 30 μ g em conjunto com o disco de oxacilina 1 μ g para a detecção da resistência à oxacilina em SCoN. Em 2009, o CLSI excluiu o disco de oxacilina na previsão da resistência dos SCoN frente aos agentes β -lactâmicos (CLSI 2004, CLSI 2009).

A detecção do gene *mecA* por métodos moleculares é considerada padrão ouro para avaliação qualitativa da resistência à oxacilina. No entanto, estes métodos ainda encontram-se pouco difundidos na rotina diagnóstica (PEREZ, 2008).

Nesse contexto, a ocorrência de infecções nosocomiais causadas por SCoN, principalmente as cepas que apresentam resistência à oxacilina, é considerada um importante problema de saúde pública. Isto ocorre devido ao número restrito de antibióticos efetivos para o seu tratamento. A avaliação da sensibilidade frente a agentes antimicrobianos em isolados hospitalares e comunitários tem contribuído para a caracterização da distribuição e transmissão da resistência e, também, ajuda na seleção da terapia antimicrobiana empírica adequada (MICHELIN, 2005)

2 – OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Detectar através de métodos moleculares e fenotípicos a resistência à oxacilina em *Staphylococcus* coagulase negativos isolados de pacientes atendidos no Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM), e avaliar o perfil de sensibilidade dos isolados, obtidos no período de janeiro de 2008 a dezembro de 2008.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a prevalência das espécies dos SCoN resistentes à oxacilina isolados no HUSM durante o período do estudo;
- Determinar o perfil de sensibilidade dos isolados obtidos, através da técnica de difusão do disco, como, também, pela automação MicroScan®(Siemens);
- Avaliar pela metodologia quantitativa da Concentração Inibitória Mínima (CIM) a sensibilidade do antimicrobiano vancomicina em todos os isolados;
- Detectar a presença do gene *mecA* utilizando o método da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em todas as amostras coletadas;
- Pesquisar isolados resistentes à oxacilina utilizando o método fenotípico de difusão do disco, com os discos de oxacilina 1µg e cefoxitina 30µg;
- Comparar o método fenotípico com o genotípico para detecção da resistência à oxacilina;
- Pesquisar o gene *icaD*, envolvido na formação de biofilme, através do método molecular em todos os isolados.

3 – REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Identificação dos SCoN

Os membros do gênero *Staphylococcus* são considerados importantes agentes nosocomiais, estando associados a infecções graves e mecanismos de resistência. Todavia, por muitos anos, apenas isolados de *Staphylococcus aureus* eram reconhecidos como agentes de infecções nosocomiais, enquanto os SCoN eram vistos apenas como contaminantes sem importância (COUTO, 2001). Este fato era atribuído a relação de simbiose que os SCoN mantêm com seu hospedeiro por serem parte da flora saprófita do mesmo (BRIGANTE, 2008).

Entretanto, nas últimas duas décadas, os SCoN emergiram como importantes patógenos nosocomiais estando associados a infecções, principalmente em pacientes imunocomprometidos, ou submetidos a procedimentos médicos complexos. Considerando que os SCoN, muitas vezes, estão envolvidos em infecções nosocomiais devido a sua capacidade de colonizar superfícies e dispositivos médicos implantáveis (VIALE, 2006; FALCONE, 2007).

Tendo em vista que seu potencial patogênico começou a ser evidenciado, esclarecer a variedade de espécies que acometem pacientes hospitalizados tornou-se uma necessidade iminente. Devido a isto, uma variedade de estudos sobre a identificação destes microrganismos foi publicada, a fim de, tornar esta identificação mais precisa e aplicável na rotina diagnóstica (CUNHA, 2004).

Ainda em 1975, Kloos e Schleifer publicaram um esquema de identificação bioquímica para os SCoN. Através deste esquema, o teste de coagulase era utilizado para diferenciar *S. aureus* dos SCoN, bem como uma bateria de testes fisiológicos e bioquímicos para a diferenciação entre as espécies de SCoN existentes. Uma modificação neste esquema foi realizada em 1991 por Kloos e Lambe e, posteriormente, por Bannermann em 2003.

Este esquema de identificação é o método mais utilizado para a diferenciação das espécies, no entanto, por se tratar de um método trabalhoso devido a grande quantidade de testes necessários para sua realização, alguns laboratórios optavam

por não identificar os SCoN em nível de espécie. Nestes casos, os *Staphylococcus* eram identificados com base em aspectos morfológicos das colônias, coloração de Gram e testes de coagulase e catalase. A partir desta identificação era possível apenas classificar os isolados em *S. aureus* e SCoN (CUNHA, 2004).

Embora o *S. epidermidis* seja a espécie mais rotineiramente isolada de infecções causadas por SCoN, outras espécies como *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus* e *S. lugdunensis*, também, estão associadas a infecções em seres humanos. Desta forma, identificá-los em nível de espécie de forma rápida e confiável se tornou um fator importante. Então, tem-se como objetivo obter uma previsão antecipada do seu potencial patogênico e de sua suscetibilidade antimicrobiana, a fim de esclarecer o quadro clínico e avaliar a significância de cada amostra isolada (COUTO, 2001).

Para isto, nos últimos anos vários sistemas comerciais foram desenvolvidos para uma rápida identificação dos isolados em nível de espécie, surgindo como uma alternativa para os protocolos clássicos de identificação que em sua maioria são demorados e trabalhosos para serem usados na rotina laboratorial (BANNERMAN, 2003). Estes sistemas comerciais são baseados em miniaturas de reações bioquímicas e imunológicas, permitindo aos microbiologistas identificar os isolados em nível de espécie com maior facilidade, precisão e rapidez do que o anteriormente alcançado, sendo amplamente utilizados, tanto na rotina diagnóstica como na de investigação (COUTO, 2001).

No entanto, estes sistemas comerciais apresentam alguns problemas de diagnóstico como tempo de resposta, banco de dados limitado, custos entre outros (KIM, 2008). Muitos dos problemas relacionados a estes sistemas resultam da expressão fenotípica variável de características que são utilizadas como parâmetros de diagnóstico (BEM - AMI, 2005). Além disso, alguns são baseados em resultados colorimétricos e devido à subjetividade, sua interpretação pode levar a ambiguidades (COUTO, 2001).

Por estas razões, esforços significativos foram feitos para desenvolver métodos alternativos de identificação que combinam velocidade, confiabilidade e baixo custo. Recentemente métodos genotípicos têm surgido como um novo padrão para a identificação de bactérias nos laboratórios automatizados. Através destes métodos, é possível a clara diferenciação em espécie, como, também, em subespécies (KIM, 2008). Este fato se tornou importante em infecções causadas por

SCoN, uma vez que através da identificação das espécies se torna possível estabelecer uma relação patógeno-hospedeiro, bem como, a orientação correta dos clínicos em termos de estratégia de tratamento adequados (LAYER, 2006).

Os métodos genotípicos oferecem maior poder discriminatório, identificando os isolados de maneira rápida e confiável, no entanto, os mesmos ainda não são utilizados largamente na rotina laboratorial, pois seu uso restringido se dá principalmente aos estudos de investigação ou em laboratórios altamente automatizados.

3.2 Patogênese

Devido a sua ubiquidade, os SCoN têm sido reconhecidos como patogênicos somente nas últimas décadas. Os fatores envolvidos em sua patogênese ainda não estão bem elucidados, sendo alvo de muitos estudos. O aumento na incidência de infecções atribuídas a estas bactérias está diretamente associado a sua capacidade de aderir a materiais implantáveis, cada vez mais integrados na medicina moderna (STEPANOVIC, 2000; BERNARDI, 2007). Outro fator importante para a patogenicidade dos SCoN é a crescente resistência aos antimicrobianos, particularmente à oxacilina (FITZPATRICK, 2002).

3.2.1 Formação de biofilme (*slime*)

Os sucessos atingidos pela medicina moderna estão intimamente ligados ao crescente aumento do uso de dispositivos médicos implantáveis, pois são de substituição intermitente como é o caso de cateteres ou permanentes como próteses (MACK, 2004). No entanto, problemas relacionados ao uso dos mesmos têm sido freqüentemente relatados. E a principal complicação atribuída ao uso destes dispositivos são as infecções que acometem seus usuários (MACK, 2000).

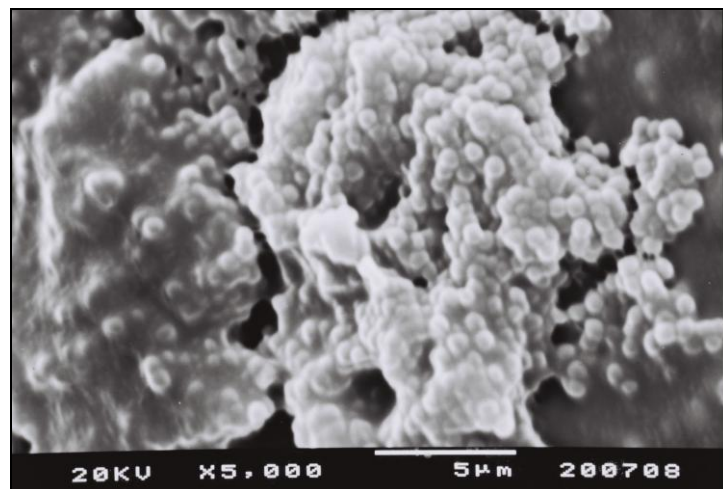
Infecções relacionadas ao uso de biomateriais são causadas, em sua maioria, por *Staphylococcus*, entre eles, o *S. epidermidis* é o principal agente etiológico. Estas bactérias com frequência levam a infecções persistentes, estando associadas à significativa morbidade e mortalidade. Este fato está relacionado à capacidade destes microrganismos em produzir um muco ou *slime* (polissacarídeo extracelular)

que permite a bactéria aderir a superfícies, constituindo assim, um fator importante para a colonização dos dispositivos implantados (BERNARDI, 2007).

Esta adesão ocorre com a formação de biofilmes, que são conhecidos como comunidades de microrganismos que aderem uns aos outros, e a superfície através da produção de uma matriz extracelular que consiste, principalmente de polissacarídeos e proteínas. A produção de biofilme por *S. epidermidis* pode ocorrer em praticamente qualquer tipo de cateter e uma variedade de outros dispositivos médicos implantáveis. Uma vez formada esta estrutura, a infecção crônica é estabelecida, e em alguns casos, o paciente tem que ser submetido a um procedimento cirúrgico para a retirada do implante (ARAÚJO, 2006).

O biofilme representa uma população estruturada com alta densidade de células incorporada em uma matriz extracelular heterogênea, resultando em estruturas tridimensionais com características fisiológicas específicas (FIGURA 1). A formação desta estrutura é considerada determinante na patogenicidade dos SCoN, devido a esta estrutura, fornecer proteção dos antimicrobianos e reduzir o efeito do sistema imunológico humano. Fator que torna essas bactérias difíceis de erradicar e leva a complicação da infecção, principalmente no ambiente hospitalar (EIFF, 2000; VUONG, 2004).

FIGURA 1: Micrografia eletrônica de varredura de biofilme formado por *S. epidermidis* em superfície abiótica (cateter).



FONTE: BERNARDI, 2007.

Nos SCoN a produção de biofilme é considerada um importante fator de virulência, e a elucidação do mecanismo pelo qual estas bactérias aderem ao biomaterial e formam o biofilme, tem sido alvo de muitos estudos (VUONG & OTTO, 2002). A aderência aos biomateriais ocorre provavelmente pela inoculação de uma pequena quantidade de bactéria da microbiota endógena do paciente durante o implante do dispositivo médico (EIFF, 1999). Juntamente a isto, os fluidos corpóreos, como as proteínas do soro e as plaquetas, recobrem o material no momento em que ele é implantado o que modifica as propriedades de sua superfície, facilitando assim a aderência bacteriana (EIFF, 2002; ALCARAZ, 2003).

De modo geral, vários fatores influenciam nos mecanismos de aderência bacteriana como o efeito do substrato, as características do meio e as propriedades da superfície celular. De acordo com EIFF et al. (2002), fenômenos físico-químicos atuam na adesão bacteriana aos biomateriais, como exemplos podem ser citadas as forças relacionadas à superfície do material: Van der Waals, eletrostáticas, tensão superficial e de hidrofobicidade superficial.

Biofilmes em si são estruturas altamente dinâmicas, e sua formação é resultado de várias etapas, onde a relevância de cada componente ainda requer estudos para sua relação com as doenças humanas (SILVA, 2002). Seu principal componente é o ácido teicóico, contudo o material extracelular é formado por outros constituintes, resultando em uma mistura complexa de vários açúcares, componentes da parede celular e proteínas extracelulares (EIFF, 1999).

A formação destes conglomerados ocorre em estágios. Primeiramente as células bacterianas entram em contato com a superfície iniciando o processo de adesão. Essa fase inicial é seguida por uma acumulativa, em que as bactérias se multiplicam e formam uma matriz extracelular onde ficam embebidas, e finalmente ocorre a formação de um glicocálix o que leva ao biofilme maduro (GOTZ, 2002). Como o processo geralmente se inicia a partir de microcolônias que crescem em estruturas maiores como cogumelos, os canais de água, íons e troca de nutrientes estarão presentes na estrutura do biofilme maduro (SHOENFELDER, 2010).

Na fase inicial de formação do biofilme, onde ocorre a rápida aderência e persistência dos SCoN a superfície do biomaterial, a adesão inicial é mediada por interações hidrofóbicas, bem como pelas estruturas de superfície bacteriana e proteínas, tais como o ácido teicóico, autolisina e o polissacarídeo capsular adesina (PSA). O PSA é um polissacarídeo de alto peso molecular que possui a mesma

função da cápsula bacteriana e media a aderência inicial da bactéria na superfície do polímero (FITZPATRICK, 2002).

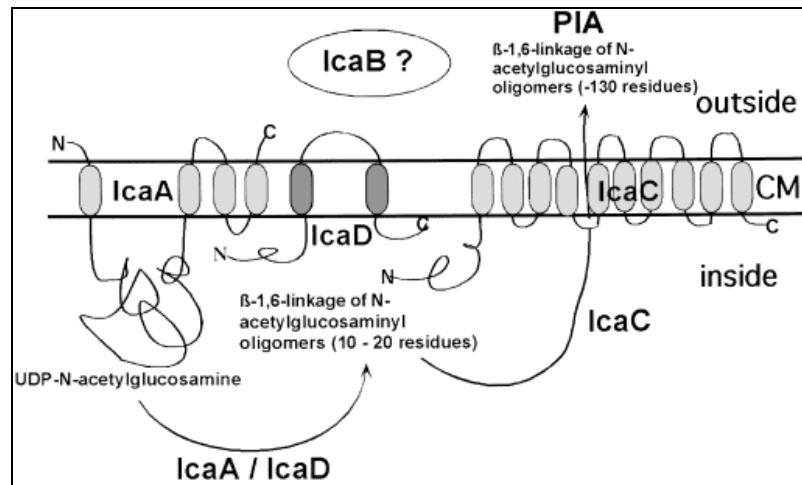
Após esta etapa inicial de aderência, inicia-se a fase de acumulação na qual ocorre a formação de camadas e, por fim, do biofilme. Neste processo de adesão e acumulação de camadas um componente é essencial para que isto ocorra, e foi identificado como polissacarídeo de adesão intercelular (PIA). O PIA está localizado na superfície celular, e é um homopolímero linear de até 130 resíduos de β -1-6-N-acetilglicosamina, composto por duas frações polissacarídicas: polissacarídeo I (> 80%) com 15 a 20% dos resíduos diacetilados e, portanto, carregados positivamente e polissacarídeo II (< 20%) estruturalmente relacionado ao polisacarídeo I, mas com baixa quantidade de resíduos D-glicosamina não N-acetilados e contem fosfato e éster ligado ao succinato, sendo aniônica (MACK, 1996; VUONG & OTTO, 2002).

O complexo enzimático responsável pela síntese do PIA é codificado pelo *operon* denominado *intercellular adhesion (ica)*, composto por quatro genes *icaA*, *icaD*, *icaB* e *icaC* e uma região promotora denominada *icaR*, que tem função regulatória e é transcrito no sentido oposto. Em relação ao *icaR*, várias evidências mostram que é um repressor da produção do PIA. Isto foi demonstrado em cepas onde este gene estava presente, e que a produção do PIA era muito menor em relação nas que ele era ausente (RHODE, 2010). Assim que ocorre a ativação do *operon ica*, são codificadas quatro proteínas necessárias para a síntese do PIA que são IcaA, IcaD, IcaB e IcaC (GOTZ, 2002).

A elucidação sobre estrutura e função dos componentes do *operon ica*, ainda é fator de pesquisas. Em um estudo realizado onde todos os genes envolvidos na biossíntese do PIA foram clonados *in vitro*, através de análises tanto de frações da membrana como de extratos extracelulares. Sabe-se que os integrantes *icaA*, *icaC* e *icaD* estão presentes em frações da membrana, enquanto o *icaB* foi identificado no sobrenadante da cultura (GOTZ, 2002). O *icaA* foi identificado como sendo o responsável pela atividade de transferase da enzima N-acetilglicosaminatransferase, que é responsável pela síntese do PIA. Contudo, a expressão única deste gene induz uma baixa atividade enzimática produzindo baixa quantidade do polissacarídeo. Todavia, quando o mesmo é expresso simultaneamente com *icaD*, promovem um aumento significativo da atividade de transferase da enzima e conseqüentemente aumento da produção do PIA (EIFF, 2002). O *icaC* estaria

envolvido na externalização do polissacarídeo, enquanto o papel do *icaB*, ainda é incerto (MACK, 2004) (FIGURA 2).

FIGURA 2: Representação da biossíntese do PIA.



FONTE: GOTZ, 2002.

Juntamente com a função de adesão intercelular e acúmulo de células em camadas, formando o biofilme, o PIA, também tem outras funções. Entre elas podemos destacar a hemaglutinação de eritrócitos, que é uma propriedade comum em cepas de *S. epidermidis* e, que tem papel importante em sua patogênese. Entretanto, a PIA não atua sozinho nesta função (GOTZ, 2002).

A expressão do *operon ica* e, como resultado a formação de biofilmes, entre cepas de SCoN parece ser altamente variável (ZIEHBUR, 1997), pois esta formação é influenciada por fatores do ambiente, podendo ser induzida em resposta ao estresse extremo e inibida em altas concentrações de antibiótico (RACHID, 2000). Desta forma, fenotipicamente a quantidade de biofilme formado é altamente variável, indicando que a expressão do PIA e a formação de biofilme são rigidamente reguladas (MACK, 2004).

Em relação à formação de biofilme, vários métodos podem ser usados na rotina laboratorial. Dentre eles, podemos destacar os métodos qualitativos como o descrito por Christensen et al (1982), que demonstra a formação de biofilme pelo teste em tubo, ou o que utiliza o ágar Vermelho Congo para esta determinação. Esta técnica se baseia no cultivo do isolado na superfície de um ágar sólido, suplementado com o corante vermelho congo, classificando os isolados com

produtores, ou não produtores de biofilme (ARCIOLA, 2001). Como exemplo de método quantitativo o desenvolvido por Christensen et al (1985) utiliza placas.

Em complemento a estes testes, são utilizados os métodos moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), que amplifica genes envolvidos na produção do biofilme. Os testes visuais utilizam vários tipos de microscópios eletrônicos para a caracterização de biofilmes em dispositivos médicos e em infecções humanas. Sabe-se que esta análise visual fornece uma excelente propriedade de resolução, e constitui-se uma importante ferramenta para a pesquisa de biofilme (DONLAN, 2002).

A formação de biofilme tem implicações importantes em isolados hospitalares, pois quando as infecções por SCoN formadores de biofilmes são causadas em dispositivos médicos implantáveis, muitas vezes a remoção do mesmo é necessária. Isto pode ser atribuído ao fato das bactérias envolvidas em biofilmes serem comumente resistentes a vários antimicrobianos.

3.2.2 Resistência antimicrobiana

Apesar dos avanços na terapêutica antimicrobiana, a incidência de infecções graves causadas por bactérias multirresistentes tem aumentado ao longo dos últimos 20 anos. Considerando que a resistência atribuída a bactérias Gram-negativas foi considerada um grande problema nas décadas de 70 e 80, durante a última década este problema foi associado a microrganismos Gram-positivos. Dentre os Gram-positivos, os que merecem destaque são os *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA), *Staphylococcus coagulase negativos* resistentes à meticilina (MRCoNS) e os *Enterococcus* resistentes à vancomicina (VRE) (NNIS, 1999; EIFF, 2000).

Neste contexto, os SCoN têm um importante papel, devido ao fato das taxas de resistência aos antimicrobianos serem pronunciadas nestes microrganismos. Sendo a resistência à oxacilina, os chamados MRSCoN, são o principal mecanismo de resistência associado a estes microrganismos (MICHELIN, 2005). Cepas de SCoN caracterizadas como MRSCoN apresentam resistência cruzada aos demais agentes β -lactâmicos, incluindo penicilinas, β -lactâmicos combinados a inibidores de β -lactamases, cefalosporinas (com exceção as novas cefalosporinas com atividade anti-MRSA) e carbapenes (CLSI, 2010).

Quando estas cepas são analisadas em testes de suscetibilidade, as mesmas podem apresentar sensibilidade aos agentes citados acima, entretanto, esta é apresentada somente *in vitro*, pois os mesmos não são efetivos clinicamente. Isto ocorre devido à maioria dos casos de infecções causadas por *Staphylococcus* resistentes à meticilina (MRS) reagirem mal à terapia com β -lactâmicos, ou porque ainda não foram apresentados dados clínicos convincentes da eficácia clínica destes agentes frente aos MRS (CLSI, 2010). Além disso, essa resistência está frequentemente associada com resistência a outros antimicrobianos, particularmente aminoglicosídeos e macrolídeos (LYYTIKAINON, 1996).

Além da resistência à oxacilina, que é a resistência mais pronunciada em isolados de SCoN, outros mecanismos de resistência podem ser detectados nestes microrganismos. Entre eles, pode-se relatar a resistência aos macrolídeos que é mediada pelo gene *msrA*, conferindo resistência aos macrolídeos e à estreptograminas do tipo B através do mecanismo de efluxo ativo. Um segundo mecanismo de resistência é mediado pelos genes *erm* (A ou C) e está associado a uma alteração ribossômica (metilação no componente 23S da subunidade 50S do ribossomo). Este segundo mecanismo confere resistência cruzada aos macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas do tipo B, podendo ser constitutiva (MLS_{BC}) ou induzível (MLS_{BI}). Nos testes *in vitro*, cepas com resistência induzível mostram-se resistentes aos macrolídeos (eritromicina e azitromicina) e apresentam uma suscetibilidade “aparente” à clindamicina e estreptograminas do tipo B. Já as cepas com resistência constitutiva mostram-se resistentes a todos estes antibióticos (FLUIT, 2001; FIEBELKORN, 2003; DELIALIOGLU, 2005). A detecção da resistência induzível pode ser feita através da difusão do disco (D-teste) ou pela microdiluição em caldo onde é usada a combinação de eritromicina e clindamicina no mesmo poço (CLSI 2010).

Ainda em relação à resistência apresentada por isolados de SCoN, cabe ressaltar que estes microrganismos podem desenvolver resistência durante a terapia prolongada com quinolonas. Portanto, os isolados que inicialmente são identificados como sensíveis, podem se tornar resistentes dentro de três a quatro dias após o início da antibioticoterapia. Desta forma, recomenda-se repetir os testes, pois estes antibióticos se mostraram sensíveis (CLSI, 2010).

A sensibilidade a penicilina demonstrada por isolados de SCoN, pode ser estendida a outras penicilinas como β -lactâmicos associados a inibidores de β -

lactamase, cefalosporinas e carbapenens aprovados para uso em infecções por *Staphylococcus* pelo FDA. Já as cepas resistentes a este antimicrobiano e sensível a oxacilina são resistentes as penicilinas penicilinase-lábeis, mas sensíveis as penicilinas penicilinase-estáveis, β -lactâmicos associados a inibidores de β -lactamase, cefalosporinas e carbapenens. A resistência à oxacilina identificada nestas amostras indica resistência a todos os agentes β -lactâmicos. Os testes para identificação destas resistências podem ser realizados utilizando-se somente penicilina e oxacilina/cefoxitina, sendo desnecessário testar os outros agentes citados (CLSI, 2010).

Os isolados hospitalares de SCoN, em especial de *S. epidermidis*, se mostram resistentes a várias classes de antimicrobianos, sendo em alguns casos, considerada refratária a terapia. Esta falha no tratamento está associada ao uso indiscriminado de antimicrobianos de amplo espectro, bem como a capacidade destes microrganismos em formar biofilme em superfícies inertes de dispositivos médicos implantáveis (MACK, 2006).

A formação de biofilme é um dos principais fatores de virulência atribuídos aos SCoN (VUONG & OTTO, 2002), tornando as infecções relacionadas à formação destas estruturas mais complicadas e persistentes. Este fato está relacionado à maior capacidade dos microrganismos do biofilme em tolerar níveis elevados de antibióticos do que as planctônicas, pois está bem estabelecido através de ensaios de suscetibilidade (CERCA, 2005).

A resistência aos antibióticos das células bacterianas em biofilmes parece não depender dos mecanismos tradicionais de resistência encontrados nos SCoN (STEWART, 2001). Embora ainda não seja clara a forma como as bactérias são resistentes no biofilme, uma possível explicação tem sido sugerida por vários autores. Eles afirmam que o biofilme tem uma barreira difusional para os antibióticos. No entanto, este mecanismo explica somente em parte o fenótipo de resistência aumentada em cepas formadoras de biofilme clinicamente significativas. Outros mecanismos têm sido sugeridos, incluindo o crescimento lento das células no biofilme, ativação da resposta ao estresse em geral, emergência de um fenótipo específico de biofilme e células persistentes (CERCA, 2005). A concentração de antibiótico necessária para matar as bactérias no biofilme é 100-1000 vezes maior que o necessário para matar uma da mesma espécie em suspensão. No entanto,

ainda falta um método confiável para comparar a suscetibilidade de bactérias pertencentes ao biofilme com as planctônicas (CERI, 1999).

Infecções causadas por MRSCoN representam um dilema terapêutico para os clínicos, uma vez que, poucas opções estão disponíveis para o emprego nestes casos. Os glicopeptídeos, em especial a vancomicina, representam o tratamento de escolha nestas situações (D' AZEVEDO, 2008), o que acabou gerando um uso indiscriminado deste antibiótico no ambiente hospitalar. Todavia, devido ao surgimento do VRE e de cepas tanto de SCoN como de *S. aureus* com reduzida suscetibilidade a este antimicrobiano, a redução do uso desta droga tem sido recomendada (NUNES, 2005).

Neste contexto, a necessidade de novos agentes antimicrobianos para o tratamento de infecções causadas por cocos Gram-positivos multirresistentes se tornou ainda mais pronunciada, com a finalidade de reduzir a pressão seletiva em relação aos glicopeptídeos e para resguardar seu uso somente a situações em que o mesmo é recomendado. Além disso, se o uso da vancomicina é necessário para o tratamento de infecções por MRS, a monitoração cuidadosa dos níveis séricos é fundamental para assegurar a dosagem adequada, independentemente se o seu uso for fracionado ou em infusão contínua (STEVENS, 2006).

Vários novos compostos têm demonstrado significativa atividade *in vitro* contra *Staphylococcus*, incluindo MRSCoN e MRSA (EIFF, 2000). Nos últimos anos, novas opções terapêuticas surgiram como alternativa à vancomicina. Daptomicina e quinupristina/dalfopristina foram aprovados pelo FDA para o tratamento de infecções ocasionadas por cocos Gram-positivos multirresistentes. Tigeciclina, oritavancina e ceftobiprole, também fazem parte deste novo arsenal terapêutico, porém, ainda não foram aprovados para o tratamento de infecções da corrente sanguínea (MANFREDI, 2010).

3.3 Fatores de risco

Em decorrência dos avanços da medicina e de seus recursos tecnológicos a expectativa de vida da população mundial aumentou. Com isso, houve um acréscimo no número de doenças debilitantes, neoplasias e imunodeficiências o que tornou o homem um hospedeiro vulnerável a infecções por SCoN (CORDEIRO, 2007).

Em contraste com o *S. aureus*, isolados de SCoN não apresentam fatores de virulência agressivos, desta forma, as infecções que atingem pacientes imunocompetentes tendem a não ser complicadas, em contrapartida quando atinge pacientes imunocomprometidos, estes microrganismos podem causar infecções graves, podendo evoluir a casos mais complicados como septicemias, envolvendo inclusive risco de vida (SCHOENFELDER, 2010).

A espécie de SCoN mais isolada de amostras clínicas é o *S. epidermidis* (DE PAULLIS, 2003), pois ele muitas vezes, se torna o principal agente infeccioso em pacientes toxicodependentes e pacientes imunocomprometidos como os em terapia de imunossupressão, HIV positivos, recém-nascidos prematuros e internados em UTIs. A porta de entrada para o corpo humano em todas estas situações é geralmente um cateter intravascular (VUONG & OTTO, 2002).

Estes microrganismos, habitantes normais da pele e mucosas de humanos, vivem no limite entre o comensalismo e a patogenicidade, tornando-se importantes como patógenos oportunistas (OTTO, 2009). Juntamente a isto, outro fator que torna estes microrganismos relevantes no ambiente hospitalar é a sua capacidade de aderir a superfícies inertes e formar biofilmes, levando a infecções persistentes e difíceis de erradicar. Com a intenção de prevenir as infecções associadas à biomateriais, a profilaxia antibiótica é recomendada em várias condições médicas que requerem o seu uso. Contudo, a preocupação com o desenvolvimento de resistência levou a procura de novas estratégias para a profilaxia, ou tratamento de infecções associadas à biomateriais (SAMPATH, 2001; KWAKMAN, 2006).

Pacientes internados em UTI tem múltiplos fatores de risco para adquirirem uma infecção estafilocócica, em parte devido ao seu quadro crítico e, também, por causa da exposição a vários procedimentos invasivos, implantes de próteses e cateteres vasculares. A maioria destas infecções resulta em uma doença aguda, não obstante infecções de repetição, também são observadas, em especial nos pacientes com implantes médicos. Quando as infecções estão relacionadas a implantes, muitas vezes, associadas à formação de biofilmes, como citado acima (O'GARA, 2001).

Recém-nascidos representam uma população de alto risco para a aquisição de infecções causadas por SCoN, de forma que o número de casos notificados de infecções causadas por estes agentes em UTI neonatal aumenta a cada ano. Isto em parte é atribuído ao aumento do número de crianças prematuras que requerem o

uso de cateteres umbilicais e cateteres venosos centrais (ROGERS, 2009). Esta é uma tendência que provavelmente continue, devido ao aumento do número de mulheres da sociedade moderna que mantêm gestações de alto risco, devido à idade materna e nascimentos múltiplos, como resultado de ensaios *in vitro* de fertilização (BENZIES, 2008).

Todavia, diferentemente de infecções causadas por SCoN em adultos, além de infecções vasculares relacionadas ao cateter, recém-nascidos, também podem desenvolver feridas, abscessos, pneumonias, infecções do trato urinário, meningites e enterocolites causadas por SCoN (EIFF, 2005). Os microrganismos que instigam essas infecções são adquiridos a partir do ambiente da UTI neonatal, resultando da rápida colonização da pele, narinas, umbigo e garganta em poucos dias de admissão (KLINGENBERG, 2007).

Os principais fatores de risco para aquisição de infecções causadas por SCoN nesta população incluem prematuros de muito baixo peso (< 1500 g), uso de acessos venosos centrais, ventilação mecânica e a necessidade de nutrição parenteral total. Embora estas infecções sejam associadas a uma baixa taxa de mortalidade, muitas vezes podem resultar em significativa morbidade e resultar em maior tempo de internação. A terapia normalmente consiste de tratamento antimicrobiano e, freqüentemente, remoção e substituição do cateter (EIFF, 2005).

Em indivíduos toxicodependentes, usuários de drogas injetáveis como a heroína, a injeção intravenosa da droga pode causar microlesões no endotélio e com isso causar a entrada do microrganismo no hospedeiro. Nestes casos, podem ocorrer episódios repetidos de bacteremias, tendo como principal agente o *S. epidermidis*, podendo levar a quadros de endocardite neste grupo de pacientes (EIFF, 2002).

No ambiente hospitalar a origem destas infecções pode ser endógena ou exógena, vinda do ambiente ou por contaminação cruzada. Um fator crucial para a transmissão deste microrganismo a partir de pacientes, ou trabalhadores da área da saúde é a habilidade destes agentes de sobreviver sobre as superfícies do ambiente (NEELY, 2000). Desta forma, a adesão ao controle de infecção hospitalar bem como, a prática de lavar as mãos pela equipe de saúde, contribui para diminuir a propagação deste microrganismo no ambiente. Uma vez que, apesar dos avanços no campo do tratamento antibacteriano, ainda há sérias dificuldades no tratamento de infecções por SCoN (KOKSAL, 2009).

3.4 Epidemiologia

A pele humana e as membranas mucosas representam um ambiente com uma grande diversidade de microrganismos formando sua microflora. Dentre estes componentes, provavelmente as bactérias mais importantes desta microflora são os membros do gênero *Staphylococcus* (HEINKS, 2005). Este gênero é composto por uma diversidade de espécies e subespécies, sendo o *S. aureus* a espécie mais conhecida. Esta espécie é freqüentemente implicada na etiologia de uma série de infecções e intoxicação nos seres humanos, enquanto os SCoN representam a maioria das espécies, e por muito tempo foram considerados comensais sem muita relevância clínica (LAYER, 2006).

Porém, nas últimas décadas seu potencial patogênico tem sido evidenciado, tornando-o um importante patógeno nosocomial muitas vezes envolvidos em infecções relacionadas a dispositivos médicos implantados, tais como: cateteres venosos, próteses valvulares e implantes ortopédicos, bem como em bacteremias. Em virtude disso, estudos epidemiológicos sobre este microrganismo têm sido realizados (PATRICK, 1990).

Atualmente, várias espécies de SCoN são reconhecidas como patogênicas, mas as que mais frequentemente causam infecções em seres humanos são *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* e *S. saprophyticus*. Outros patógenos oportunistas incluem *S. hominis*, *S. warneri*, *S. capitis* e *S. simulans*. Estes comensais da pele e mucosas exercem seu potencial patogênico quando inoculados no hospedeiro por intermédio de agulhas ou lesões na pele (HEINKS, 2005), e em determinadas situações podem causar infecções em seu hospedeiro.

S. epidermidis, principal espécie de SCoN causadora de infecções em humanos, ganhou interesse considerável nos últimos anos, pois se tornou um agente nosocomial de grande interesse (SCHOENFELDER, 2010). Seu potencial patogênico reside na sua capacidade de colonizar e proliferar em biomateriais. Essas infecções são muitas vezes persistentes, e sem respostas aos antimicrobianos (ROGERS, 2009).

As altas taxas de infecções causadas por *S. epidermidis* coloca em questão por que esses microrganismos têm sido tão bem sucedidos ao longo das últimas décadas para se estabelecer como patógeno oportunista em ambientes de saúde.

Na verdade, existem alguns fatores óbvios que contribuem para este desenvolvimento. O progresso da medicina gera um número crescente de pacientes imunocomprometidos, que representam uma população altamente suscetível para estes patógenos oportunistas. Os dispositivos médicos que são amplamente utilizados nestes pacientes representam um novo habitat a ser colonizado, e o uso de antibióticos e desinfetantes em hospitais coloca uma alta pressão seletiva para selecionar cepas resistentes e bem adaptadas (SCHOENFELDER, 2010).

Portanto, estes fatores ainda não explicam por que esta espécie, e não outras bactérias foram capazes de conquistar este ambiente. Estudos recentes de genoma demonstraram que o *S. epidermidis* é um microrganismo incrivelmente versátil, que emprega sofisticadas redes de regulamentação para adaptar rapidamente seu metabolismo as mudanças nas condições externas. Além disso, estudos demonstraram a presença de numerosos elementos genéticos móveis, tendo como exemplo os que mediam a resistência à oxacilina (ZHANG, 2003; GILL, 2005).

Devido ao fato de serem habitantes normais da pele, a correta identificação deste microrganismo como patógeno pode ser uma tarefa difícil. Por isso faz-se necessário o uso de critérios para a correta associação deste patógeno com a infecção. Alguns métodos epidemiológicos podem ser utilizados para a correta diferenciação do isolado significativo do contaminante (GARCIA, 2004).

3.5 Significância clínica dos isolados de SCoN

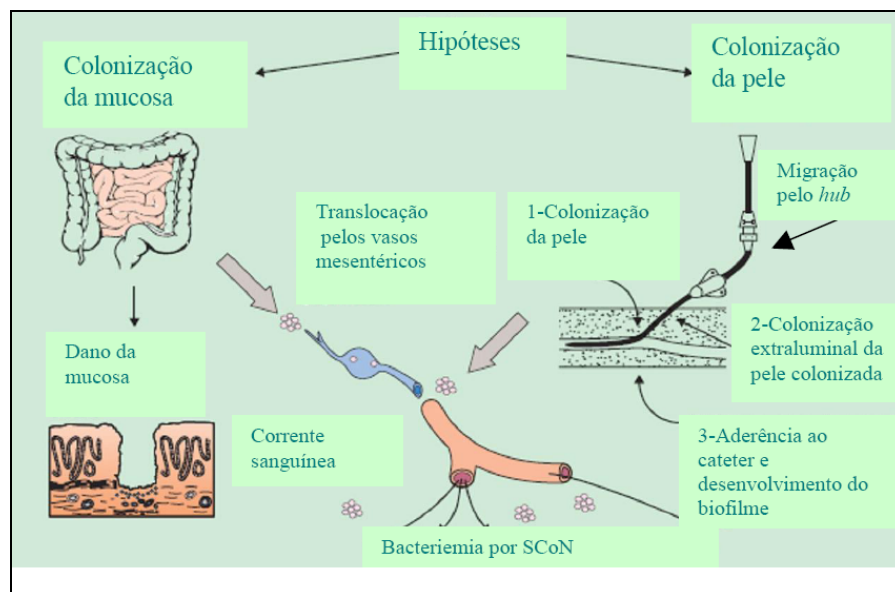
Por causa de sua onipresença e baixa virulência, os SCoN eram geralmente considerados como não patogênicos, ou simples contaminantes. No decorrer das últimas décadas, seu significado clínico tem sido reconhecido devido à elucidação de sua patogenicidade. Ela está associada a sua capacidade de formação de biofilme e o crescente aumento nas taxas de resistência microbiana (KIM, 2008).

Devido ao incremento no uso de dispositivos médicos invasivos e maior número de pacientes imunocomprometidos hospitalizados, os SCoN têm aparecido como importantes agentes de infecções nosocomiais. Por este motivo, a correta identificação destes microrganismos como o agente etiológico da infecção é de suma importância para a implementação da terapia antimicrobiana correta.

3.5.1 Bacteremias

O isolamento e identificação de microrganismos em culturas de sangue representam importantes recursos diagnósticos em doenças infecciosas. A presença de bactérias na corrente sanguínea, conhecida como bacteremia, pode representar indício de disseminação da infecção, cuja expressão clínica pode variar desde quadros leves e autolimitantes, até o óbito (WEINSTEIN, 1998). A entrada destes microrganismos no sangue do paciente ocorre, geralmente por um ou dois mecanismos: pela drenagem do foco principal da infecção pelo sistema linfático até o sistema vascular, ou pela inoculação direta da bactéria na corrente sanguínea do paciente através de agulhas, ou materiais implantáveis contaminados (REIMER, 1997) (FIGURA 3).

FIGURA 3: Demonstrativo das prováveis fontes de SCoN causadores de bacteremias.



FONTE: Adaptado de Costa S. F., 2004.

As infecções de corrente sanguínea (ICS) no ambiente hospitalar geralmente são indicativas de eventos graves onde as taxas de morbidade e mortalidade é considerada elevada, além de causarem prolongamento no tempo de hospitalização gerando custos adicionais aos sistemas de saúde (ORSI, 2002). A distribuição dos microrganismos responsáveis por estes eventos tem mudado drasticamente nas últimas décadas, dados do *National Nosocomial Infection Study* (NNIS) mostraram

que os cocos Gram-positivos aeróbios têm suplantado os bacilos Gram-negativos como os principais causadores de ICS (RUPP, 1994).

Dentre os cocos Gram-positivos isolados, a incidência dos SCoN como agente etiológico de bacteremias tem aumentado nos últimos anos, tanto que é apontado como um dos principais agentes causadores de bacteremias nosocomiais (REIMER, 1997; MARSHALL, 1998; THYLEFOR, 1998). Entre os SCoN, as espécies apontadas como prevalentes em isolamentos de hemoculturas são *S. epidermidis* e *S. haemolyticus*. Um estudo realizado por Sader e colaboradores (2004) mostrou que entre 10%-20% das bacteremias em hospitais brasileiros são causadas por SCoN e entre os isolados, 70%-90% apresentam resistência à oxacilina.

Tendo em vista de os SCoN serem comensais da pele, a interpretação de hemoculturas positivas para estes microrganismos é particularmente difícil, uma vez que, embora sejam considerados importantes agentes etiológicos de bacteremias, também são considerados contaminantes comuns de frascos de hemoculturas (KLOOS, 1994; FAVRE, 2005). Levando em conta que a contaminação das culturas de sangue leva a exames laboratoriais complementares, o uso desnecessário de antimicrobianos e prolongamento no tempo de hospitalização, a falha em reconhecer bacteremias verdadeiras, pode ocasionar aumento na morbiletalidade (WEINSTEIN, 2003)

Nesta perspectiva, investigadores têm usado uma variedade de critérios clínicos e laboratoriais para distinguir contaminação de bacteremia verdadeira, tendo em vista que esta diferenciação é vital para a correta instituição da antibioticoterapia. Dessa forma, ainda não existe um padrão-ouro para diferenciar SCoN patogênico do contaminante (WEINSTEIN, 2003). Vários autores têm proposto uma diversidade de critérios clínicos e laboratoriais para auxiliar na determinação da significância clínica dos SCoN. Destes critérios, a definição dada pelo *Centers for Diseases Control and Prevention* (CDC) é a mais comumente utilizada (BEEKMAN, 2005).

Entre os critérios utilizados estão à identificação do microrganismo, características clínicas tais como: febre, leucocitose e exames de imagem (normalmente disponíveis somente para os clínicos). Além de: número de hemoculturas positivas, presença de cultura polimicrobiana, tempo de crescimento do microrganismo, cultura de sangue obtida durante antibióticoterapia e o número de hemoculturas adicionais sem crescimento (WEINSTEIN, 2003; TERASAWA, 2006).

A hemocultura é considerada um dos principais testes laboratoriais utilizados para o diagnóstico de bacteremias, porém, ainda apresenta problemas com relação às suas técnicas e resultados (LARGURA, 2005). Entre os problemas relacionados a este teste podemos citar: a esterilização e escolha do sítio da punção, o volume do inóculo e o meio utilizado para a cultura (THYLEFORS, 1998).

A respeito da significância clínica dos SCoN em hemoculturas, estudos têm sido realizados com a finalidade de elucidar a relação entre os achados laboratoriais e clínicos. A ocorrência de positividade para o isolamento de SCoN em mais de um frasco de hemocultura vinha sendo apontada como um bom parâmetro para a identificação de bacteremias verdadeiras. No entanto, publicações da última década indicaram que cerca de 34% dos pacientes com bacteremia nosocomial tem apenas uma hemocultura positiva, e o uso deste parâmetro isoladamente pode levar a erros na interpretação de bacteremias verdadeiras (MIRRET, 2001). Um estudo conduzido por Favre e colaboradores (2005), teve como objetivo avaliar a significância clínica de uma única hemocultura positiva para SCoN, tendo como resultado que se pode considerar significativo o SCoN isolado de uma única hemocultura nas situações em que sinais de sepse estiverem presentes.

Avaliar a significância clínica de SCoN isolados de hemoculturas é um desafio enfrentado pelos clínicos e microbiologistas, mas vários fatores devem ser considerados para que a interpretação dos resultados obtidos em testes laboratoriais e clínicos resulte na correta identificação em bacteremia verdadeira, ou contaminação. Dessa forma, cuidados devem ser tomados desde o momento da coleta, onde as precauções necessárias devem ser tomadas para que não ocorra contaminação do teste com microrganismos presentes na pele do paciente como, também a monitoração do paciente para que os sinais clínicos sejam corretamente interpretados.

3.5.2 Infecções relacionadas a cateteres

O uso de cateter venoso central (CVC) foi introduzido na medicina em 1945, e amplamente aceito em todas as áreas da medicina clínica. O uso de CVC representou um grande avanço tanto no diagnóstico como na terapêutica, pois com seu uso é possível a realização de terapia intravenosa, bem como monitorar o

paciente. Muitos procedimentos clínicos e cirúrgicos puderam ser realizados a partir do desenvolvimento desta tecnologia (SPENCER, 1999).

Dessa forma, com este advento houve também uma grande e crescente preocupação com as infecções nosocomiais atribuídas a estes biomateriais, uma vez que, estes representam um acesso direto do meio exterior com o intravascular, podendo levar ao desencadeamento de uma reação inflamatória no local de sua inserção, ou até mesmo de uma ICS (BEGHETTO, 2002). O uso de CVC é um procedimento invasivo, no entanto, em algumas situações clínicas o benefício de seu uso é significativo, embora seja importante ressaltar que as infecções hospitalares relacionadas ao uso de cateteres estão associadas a importante morbidade e mortalidade. Ocorre também, elevados custos e aumento no tempo de hospitalização que estão associados às infecções relacionadas ao uso de cateter (STORTI, 2007).

Em relação aos microrganismos mais associados a estas infecções o *S. epidermidis* é relatado como um dos mais importantes agentes de infecções relacionadas a cateter (MERMEL, 2001). A origem dos SCoN causadores de infecções relacionadas à CVC comumente é a pele do paciente, migrando através da superfície cutânea do cateter para ter acesso à circulação sanguínea. Porém, em cateteres de longa duração, a colonização (quer da flora do paciente ou do ambiente hospitalar) e a migração de organismos através da superfície luminal torna-se cada vez mais importante. Raramente ocorre a colonização do cateter através de disseminação hematogênica, ou outra via de contaminação (ROGERS, 2009).

As infecções relacionadas ao cateter causadas por SCoN predominantemente se manifestam somente com febre, ou febre associada à inflamação na saída do cateter. A maioria dos pacientes tem um quadro clínico benigno, mas raramente, os pacientes desenvolvem sepse (MERMEL, 2001). O contato direto do CVC com a corrente sanguínea oferece um risco iminente de disseminação, principalmente de bactérias para o sangue, podendo desencadear bacteremias (MENEZES, 2002). As infecções da corrente sanguínea relacionadas ao cateter são a principal causa de sepse (BOUZA, 2001) documentada em hospitais modernos, e estas infecções são produzidas principalmente por SCoN (EIFF, 2001; BOUZA, 2004).

Os dados microbiológicos sugestivos de infecção da corrente sanguínea causada por SCoN incluem resultados de múltiplas hemoculturas positivas, cultura quantitativa de amostras de sangue retiradas do cateter, isolamento do mesmo

microrganismo das culturas de cateter e sangue. Um tempo de crescimento diferencial de 2 horas para culturas de sangue obtidas por meio do CVC, em comparação com culturas de amostras de sangue periférico, também é preditivo de ICS relacionada ao cateter (MERMEL, 2001).

O diagnóstico de infecção relacionada ao cateter pode ser difícil, devido ao fato de nem todos os pacientes apresentarem os sinais de inflamação no local da inserção do cateter, e quando os sinais estão presentes, o exsudato deveria ser enviado para o laboratório para realização de exames culturais. Junto a isto, duas amostras de sangue, também deveriam ser colhidas. Contudo, em alguns casos não é possível aguardar os resultados laboratoriais, sendo a retirada do cateter a solução muitas vezes mais rápida (BOUZA, 2002).

Muitos métodos microbiológicos estão disponíveis para o diagnóstico de infecção relacionada ao cateter. Antes da técnica de Maki, em 1977, a maioria dos laboratórios usava a técnica qualitativa descrita por Druskin e Siegel em 1963, que consistia na imersão do cateter em caldo de cultura. Neste procedimento qualitativo, o crescimento de microrganismo era indicado pela turvação do meio de cultura após incubação. A técnica descrita por Maki (1977) consiste em uma cultura semi-quantitativa da ponta do cateter. Sabe-se que é muito utilizada por pesquisadores para a quantificação de biofilmes e para determinar a relação entre formação de biofilme e infecção sanguínea. Porém, através desta técnica não é possível recuperar os microrganismos da superfície interna do cateter (STORTI, 2007).

As culturas qualitativa do sangue e quantitativa da ponta distal do cateter venoso central continuam como métodos de escolha para o diagnóstico de infecções relacionadas ao cateter na maioria dos laboratórios (STORTI, 2007). Um ponto importante para o diagnóstico é a identificação do microrganismo isolados das culturas, devido ao fato de o isolamento do mesmo microrganismo tanto do cateter como do sangue do paciente constituem fator importante para caracterização da infecção relacionada ao cateter.

Além do fato de representarem uma porta de entrada fácil para os SCoN, habitantes normais da pele, outro fator importante no esclarecimento da patogenicidade das infecções relacionadas ao uso de cateteres é a capacidade destes microrganismos de aderirem à superfície dos biomateriais implantáveis. Uma vez formados, os biofilmes são resistentes a terapia antimicrobiana e, também, a respostas imunes do organismo do hospedeiro. Este fato tem importantes

implicações práticas na terapia, pois muitas vezes a retirada do cateter é um fato inevitável.

Com o intuito de prevenir e, também, de diminuir as infecções associadas ao uso de CVC é importante que práticas de assepsia sejam instituídas e regulamentadas no ambiente hospitalar. Estudos têm demonstrado que com a instituição de um controle de infecção hospitalar bem regulamentado é possível diminuir as infecções relacionadas ao uso de materiais implantáveis, bem como, os altos custos associados ao tratamento das mesmas (ROGERS, 2009).

3.6 Resistência à oxacilina (metecilina)

3.6.1 Histórico da resistência à oxacilina (metecilina)

A mortalidade atribuída a infecções estafilocócicas, tendo o *S. aureus* como agente predominante, durante o chamado período pré-antibiótico era elevada. No entanto, com a introdução da penicilina no início dos anos 1940, o prognóstico destas infecções melhorou drasticamente. Porém, já em 1942, começaram a surgir os primeiros *Staphylococcus* resistentes à penicilina, e foram reconhecidos primeiramente em hospitais, e depois na comunidade. Até o final dos anos 1980, mais de 80% dos *Staphylococcus* apresentavam resistência à penicilina (HIRAMATSU, 2002; LOWY, 2003).

Esta resistência é caracterizada pela presença do gene *blaZ* que faz parte de um elemento transponível localizado em um grande plasmídeo, onde genes de resistência a outros antibiótico como gentamicina e eritromicina também estão presentes. O gene *blaZ* codifica a produção de β -lactamase, que é uma enzima predominantemente extracelular que quando entra em contato com antibióticos β -lactâmicos provoca a hidrólise do anel β -lactâmico, resultando em inativação do mesmo (LOWY, 2003).

Em decorrência do surgimento da resistência à penicilina, em 1960 foi desenvolvida na Inglaterra uma nova droga, a metecilina. Este antimicrobiano foi criado com a finalidade de ser uma opção terapêutica aos isolados resistentes à penicilina. Em seqüência ao bem sucedido lançamento da metecilina, novas penicilinas e cefalosporinas foram desenvolvidas com a promessa de resolver o problema da resistência à penicilina (CHAMBERS, 2001; LOWY, 2003).

Todavia, a introdução deste novo antimicrobiano foi logo seguida pelo aparecimento de relatos do isolamento de cepas com resistência a meticilina. Esta resistência está associada a importantes implicações terapêuticas, uma vez que os isolados resistentes à meticilina apresentam resistência a praticamente todos os agentes β -lactâmicos desenvolvidos nos últimos 60 anos. A resistência à meticilina foi denominada “intrínseca”, devido ao fato de não ocorrer através da destruição do antibiótico β -lactâmico (CHAMBERS, 1997; CHAMBERS, 2001; LOWY, 2003).

Juntamente a isto, existem alguns fatores de risco para a aquisição de uma infecção por um MRS. Dentre eles podemos destacar: uso prévio de antibióticos, admissão em uma unidade de tratamento intensivo, cirurgia e exposição do paciente a um indivíduo colonizado por MRS. Os seres humanos são um reservatório natural de *Staphylococcus* e a colonização assintomática é muito mais comum do que a infecção (HIRAMATSU, 2002).

Os primeiros focos de infecções causadas por MRSA ocorreram em hospitais europeus. Desde então, cepas de MRSA e MRSCoN tem se espalhado pelo mundo, estabelecendo-se tanto no ambiente hospitalar como fora dele, especialmente entre pacientes admitidos em UTIs, imunocomprometidos e usuários de drogas intravenosas (CHAMBERS, 1997).

3.6.2 Importância da resistência à oxacilina em SCoN

O antimicrobiano da classe dos β -lactâmicos sintéticos oxacilina (3-fenil-5metil-4-isoxazolilpenicilina) é muito utilizado na prática clínica para o tratamento de infecções causadas por *Staphylococcus* spp. Esta escolha é importante em pacientes hospitalizados acometidos de infecções estafilocócicas como endocardites infecciosas, sepses e pacientes com próteses (GILBERT, 2003).

Entre as infecções estafilocócicas, os isolados de SCoN se tornaram uma causa comum de infecções hospitalares nas últimas décadas, principalmente como agente etiológico de bacteremias e infecções relacionadas a próteses (FERREIRA, 2003). Um fato importante a ser reconhecido entre estes isolados é a emergência da resistência à oxacilina nas últimas duas décadas (NUNES, 2005). Juntamente a este mecanismo de resistência, que confere resistência cruzada a todas as classes de agentes β -lactâmicos, cepas de SCoN comumente são resistentes a outras classes

de antimicrobianos como tetraciclina, macrolídeos e fluorquinolonas (ROGERS, 2009).

Nesta perspectiva, os MRSCoN, são responsáveis por uma gama de infecções que atingem, principalmente pacientes imunocomprometidos e portadores de dispositivos implantáveis. Também, representam uma importante preocupação para a equipe médica devido às poucas opções terapêuticas disponíveis para seu tratamento. Como resultado, abordagens terapêuticas são resumidas aos glicopeptídeos, e aos novos agentes antimicrobianos introduzidos no mercado como linezolida (WOODS, 2002), quinupristina/dalfopristina, ceftobiprole e tigeciclina (MANFREDI, 2010).

Atualmente estudos revelam que mais que 70% dos isolados de SCoN são resistentes à oxacilina em todo mundo (DIEKEMA, 2001), porém, os estudos realizados no Brasil ainda são escassos. Sader e colaboradores (2001) relataram uma resistência de 80% entre isolados de SCoN envolvidos em ICS em hospitais brasileiros. Já o estudo conduzido por Ferreira e colaboradores (2002) resultou em uma resistência de 64% entre isolados de SCoN de diferentes amostras clínicas.

Estes dados demonstram que a resistência à oxacilina é uma realidade no Brasil, dessa forma, é importante que os laboratórios diferenciem na sua rotina laboratorial os isolados sensíveis dos resistentes à oxacilina. Nesse sentido, há a necessidade de controlar o uso indiscriminado, tanto de glicopeptídeos, como, também de novos antimicrobianos, a fim de resguardar seu uso para situações em que é recomendado (FERREIRA, 2003).

O uso de eletroforese em campo pulsado (PFGE) para a tipagem genética de SCoN, especialmente para *S. epidermidis* e *S. haemolyticus*, tem se mostrado um método adequado no que diz respeito a sua capacidade discriminatória. No entanto, o entendimento da disseminação da multirresistência dos SCoN e sua epidemiologia não são suficientemente elucidados como para o *S. aureus*. Dessa forma, o uso destas técnicas moleculares como ferramenta pode ajudar no monitoramento, compreensão e controle da propagação de clones resistentes entre os *Staphylococcus* (NUNES, 2005).

3.6.3 Resistência aos glicopeptídeos

Nas últimas décadas, estudos de vigilância epidemiológica demonstraram a crescente importância dos cocos Gram-positivos em infecções hospitalares. O aumento de isolados de SCoN como agentes de ICS e a prevalência da resistência à oxacilina nestes isolados levou ao uso indiscriminado de glicopeptídeos como terapia empírica (HUSSAIN, 2002). Vancomicina e teicoplanina são glicopeptídeos com significativa atividade frente a infecções estafilocócicas (TENOVER, 1998).

Vancomicina é usualmente considerada o tratamento de escolha para infecções causadas por MRSCoN, no entanto com a emergência do VRE e dos *Staphylococcus* com reduzida suscetibilidade a este antimicrobiano, a redução de seu uso tem sido recomendada (D'AZEVEDO, 2008). O primeiro relato de isolados com reduzida suscetibilidade à vancomicina ocorreu no Japão em cepas de *S. aureus* (HIRAMATSU, 1997). Depois disto, isolamentos de cepas de SCoN e *S. aureus* apresentando suscetibilidade reduzida à vancomicina ocorreram em diversos países, incluindo o Brasil, e tem gerado dilemas terapêuticos na prática clínica (NUNES, 2006).

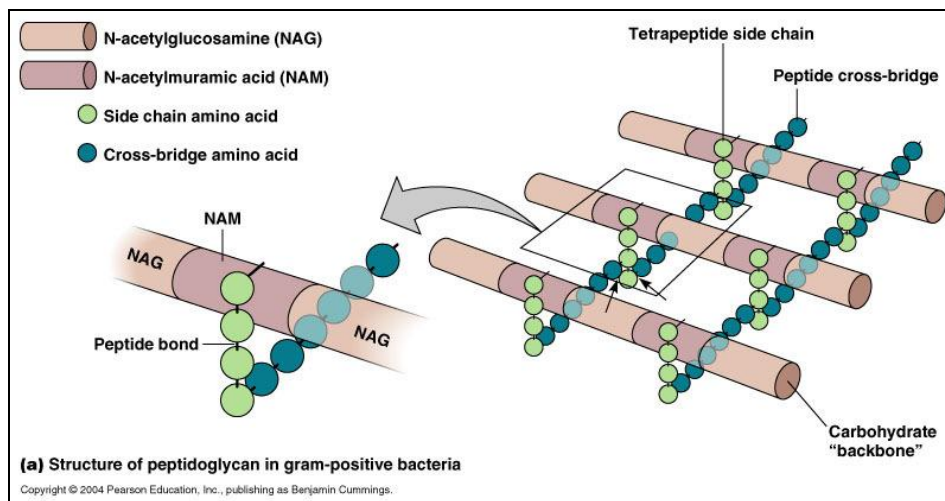
Dessa forma, a identificação de isolados MRS é de grande importância, uma vez que, os agentes β -lactâmicos são considerados a melhor escolha para o tratamento de infecções causadas por *Staphylococcus* sensíveis à oxacilina. A identificação precoce dos MRS, especialmente a partir de isolados de hemoculturas, poderia, portanto, reduzir o uso desnecessário de vancomicina e permitir a rápida instituição da terapia adequada a cada caso (HUSSAIN, 2002).

Alguns relatos têm demonstrado que o mecanismo de resistência aos glicopeptídeos em *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* e *S. hominis* é similar ao descrito para *Staphylococcus aureus* vancomicina intermediários (VISA) e cepas com hetero-VISA (NNIS, 2003). O mecanismo de resistência em VISA inclui a síntese de quantidades adicionais de peptidoglicano resultando em um espessamento da parede celular. Este espessamento leva ao aumento no número de resíduos D-alanil-D-alanina, capazes de ligar-se à vancomicina na parte externa da parede celular, gerando menor disponibilidade do antimicrobiano na molécula alvo intracelular. As cepas VISA heterorresistentes permanecem suscetíveis à vancomicina, porém, apresentam uma subpopulação resistente (LOWY, 2003; FLUIT, 2001).

3.6.4 Caracterização da resistência à oxacilina

O mecanismo pelo qual a oxacilina inibe o crescimento bacteriano dos *Staphylococcus* está baseado na inibição da síntese da parede celular pela ligação deste antimicrobiano à proteína ligadora de penicilina (PBP) presente na parede celular destes microrganismos (FIGURA 4). Estas proteínas possuem atividade bioquímica mecanicamente similar à das serina-proteases, pois catalizam a reação de transpeptidase que faz a ligação cruzada dos peptidoglicanos da parede celular (FIGURA 4). As principais PBPs, 1, 2, 3 e 4, são produzidas tanto por isolados suscetíveis como resistentes (CHAMBERS, 1997).

FIGURA 4: Estrutura do peptidoglicano em bactérias Gram-positivas.



FONTE: DECKER, J. **Biofilms: Microbial Communities and Infectious Disease**. Disponível em: <http://microvet.arizona.edu/Courses/MIC438/decker/biofilms/biofilms.html>

Os antibióticos possuem afinidades variáveis às PBPs, onde alterações dessas afinidades ou aquisição de PBPs suplementares sem afinidades pelos antibióticos resultarão em uma resistência adquirida via mutação, que poderá ser transmitida verticalmente. Quando os antibióticos β -lactâmicos se ligam a um ou mais receptores de penicilina, a reação de transpeptidação é inibida e a síntese do peptidoglicano é bloqueada e, na sequência, ocorre à ativação das enzimas

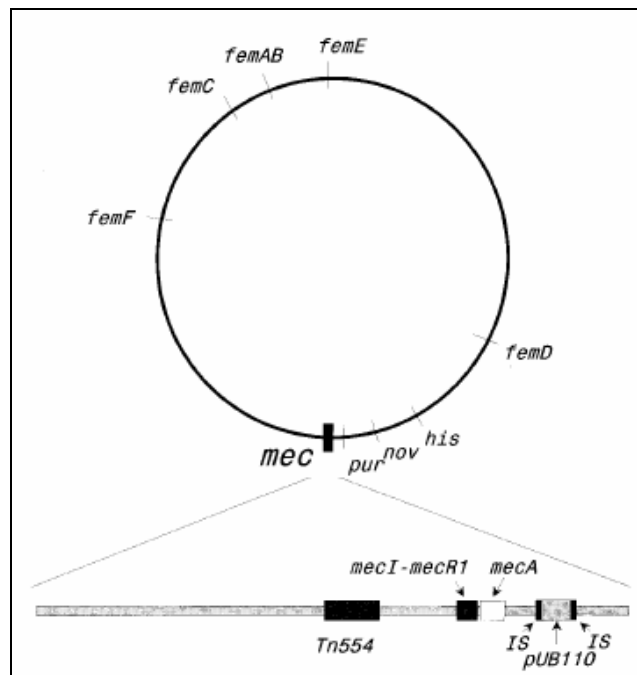
autolíticas da parede celular. No caso de *Staphylococcus* spp. o principal mecanismo de resistência à oxacilina é a alteração das PBP's (CHAMBERS, 1997).

A resistência à oxacilina mediada pelo gene cromossômico *mecA*, chamada resistência clássica (ROSSI, 2004), é o principal mecanismo de resistência em cepas de SCoN, tanto que, o gene *mecA* pode ser considerado um marcador molecular útil na detecção desta resistência em todos os *Staphylococcus* (DE GIUSTI, 1999). O gene *mecA* é responsável pela síntese de uma PBP alterada que possui baixa afinidade por agentes β -lactâmicos, chamada PBP2a ou PBP2'. As PBP's são enzimas ligadas à membrana que catalizam a reação de transpeptidação que é necessária para a reação cruzada de redes de peptidoglicano, possuindo atividade semelhante a da serina proteases. Nas cepas onde a PBP2a está presente, devido a sua baixa afinidade pelos antibióticos β -lactâmicos, permite que isolados de *Staphylococcus* spp. sobrevivam a altas concentrações destas drogas. Assim, a resistência à oxacilina confere resistência cruzada a todos os antibióticos que contêm em sua estrutura o anel β -lactâmico, incluindo as cefalosporinas (CHAMBERS, 1997, LOWY, 2003).

O gene *mecA*, responsável pela produção da PBP2a, é o componente genético central deste mecanismo de resistência em *Staphylococcus*. Este gene faz parte de um grande bloco de DNA não nativo, com aproximadamente 30 a 50 Kb adicionais, chamado complexo *mec* (BECK, 1986). Este gene não é encontrado em cepas sensíveis à oxacilina, estando presente somente nas resistentes. É sempre encontrado próximo ao *cluster pur-nov-his* (FIGURA 5) no cromossomo de *S. aureus*. Elementos reguladores que controlam a transcrição do *Meca*, também estão presentes no complexo *mec*, representando mais 20 a 45 Kb de DNA adicionais, sendo eles *mecI* e *mecR1* (CHAMBERS, 1997).

Sabe-se que o gene *mecA* é indispensável para a resistência à oxacilina, e não é o único responsável pelo nível ao qual esta resistência é expressa. Outros fatores cromossomicamente determinados, também estão envolvidos. Entre eles podemos citar os genes denominados *fem* (fator essencial para a expressão da resistência à meticilina) que foram identificados em cepas de *S. aureus*, dos quais *femAB* aparece como o mais importante. A inativação destes genes leva a restauração da sensibilidade à meticilina em isolados de MRSA. Genes como *femAB* foram também identificados em isolados de *S. epidermidis* (CARBON, 2000; MOUSSALLEM, 2007).

FIGURA 5: Organização molecular do complexo *mec* e sua localização cromossomal relativa aos fatores *fem*, *pur-nor-his*.



NOTA: IS indica os elementos IS431 (o mesmo que IS257) ladeando o plasmídeo de resistência à tobramicina pUB110. Tn554 é um transposon contendo o gene *ermA*, codificando resistência induzida à eritromicina.

FONTE: CHAMBERS, H.F. **Methicillin Resistance in Staphylococci: Molecular and Biochemical Basis and Clinical Implications**. Clinical Microbiology Reviews, v. 10, n. 4, p. 781-791, 1997.

O gene *mecA* e seus reguladores fazem parte de um grande elemento de DNA chamado cassete cromossômico estafilocócico *mec* (SCC*mec*). Além dos determinantes de resistência à oxacilina, SCC*mec* transporta um conjunto de recombinases e uma grande variedade de elementos de DNA móveis como trasposons e plasmídeos. Foram identificados 5 grandes tipos de SCC*mec* que variam seu tamanho de 21 Kb a 67 Kb, sendo que indícios indicam que os mesmos podem ser encontrados, tanto em *S. aureus* como em espécies de SCoN (ZIEBUHR, 2006; MACHADO, 2007).

Recentes descobertas de pesquisas genômicas sugerem que o *S. epidermidis* e outros SCoN apresentam um conjunto de genes para a geração contínua de novos tipos de cassete cromossômico estafilocócico, e que a resistência à oxacilina em *S. aureus* pode ter sido originada nestas espécies. A este respeito, é necessário considerar os SCoN, em especial *S. epidermidis*, como reservatórios para a disseminação de genes de resistência. Dessa forma, os MRSCoN devem ser controlados por medidas de controle de infecção de forma semelhante ao usado para o MRSA (ZIEBUHR, 2006).

As origens do *mec* ainda são obscuras, no entanto, sabe-se que o gene *mecA* apresenta altos níveis de homologia no MRSA e nos MRSCoN. Um gene *mecA* homólogo com similaridade de 88% entre os seus aminoácidos como os do gene *mecA* presente em MRSCoN foi identificado no *Staphylococcus sciuri*. Curiosamente, o homólogo *mecA* é ubíquo nesta espécie, mas seu fenótipo é sensível. Este e outros dados suportam a hipótese que o *mecA* é originário de um SCoN, isto é, uma espécie evolucionariamente próxima ao *S. sciuri* (CHAMBERS, 1997).

Cabe ressaltar que, mesmo a resistência à oxacilina mediada pelo gene *mecA* seja o principal mecanismo responsável pela mesma em cepas de *Staphylococcus*, estas podem apresentar um tipo menos comum de resistência, a chamada resistência *Borderline*, e são caracterizadas por MICs de oxacilina próximos ao ponto de corte. Este tipo de resistência pode ser dividido em hiperprodução de β -lactamase ou modificação nas PBPs (CHAMBERS, 1997).

Nas cepas onde se identifica a hiperprodução de β -lactamase, ocorre uma hidrólise parcial do anel β -lactâmico das penicilinas e estas cepas são conhecidas como *borderline oxacillin-resistant S. aureus* (BORSA). Nas cepas com modificações nas proteínas de ligação da penicilina (PBPs 1,2 e 4), quando são submetidas para pesquisa de PBP2a, verifica-se que esta cepa não é produtora da mesma (gene *mecA* negativas), sendo conhecidas como *modified penicillin-binding protein S. aureus* (MODSA) (ROSSI, 2004).

Uma característica importante a ser lembrada a respeito da resistência à oxacilina em SCoN é a emergência de populações com resistência heterogênea a este agente. Cepas com natureza heterogênea variam o nível da resistência de acordo com as condições de cultura e o antibiótico β -lactâmico utilizado. Dessa forma, a maioria das colônias é sensível a baixas concentrações de antimicrobianos, enquanto uma pequena fração apresenta crescimento, sendo, portanto resistentes (CHAMBERS, 1997). Outro aspecto importante é o fato de a subpopulação resistente apresentar crescimento mais lento que a subpopulação sensível. Temperaturas superiores a 35° C podem inibir a expressão da resistência, levando a falsos resultados de sensibilidade a oxacilina (ROSSI, 2004).

3.6.5 Detecção da resistência à oxacilina

Na caracterização desta resistência, testes que detectam o gene *mecA* ou a proteína expressa por este gene, a chamada PBP2a ou PBP2', são os métodos mais precisos para a predição da resistência à oxacilina, e podem ser usados para confirmar os resultados de isolados de *Staphylococcus* provenientes de infecções graves. Isolados que albergam o gene *mecA*, ou produzem a PBP2a, devem ser reportados como resistentes à oxacilina. Já em isolados, onde o gene *mecA* não está presente e não produzem a PBP2a, devem ser classificados como sensíveis à oxacilina (CLSI, 2010).

Nesse sentido, devido a ocorrência de outros mecanismos de resistência que não envolvem o gene *mecA*, se testes para determinação da CIM forem realizados em conjunto com testes de difusão do disco, isolados que apresentarem CIM ≥ 4 $\mu\text{g/mL}$ e a presença do gene *mecA* ou da PBP2a não for detectada, o mesmo pode ser reportado como resistente à oxacilina. Nestes isolados, testes de sensibilidade utilizando o disco de cefoxitina podem resultar em sensibilidade (CLSI, 2010).

3.7 Instituto de padrões clínicos e laboratoriais (CLSI)

Em 1999, o CLSI estabeleceu uma diminuição nos pontos de corte para detecção da Concentração Inibitória Mínima (CIM) da oxacilina com o objetivo de melhorar a correlação entre a detecção da resistência e a presença do gene *mecA* (TERASAWA, 2006).

No ano de 2002, ocorreu nova mudança nos pontos de corte para a CIM e para o diâmetro de inibição, os métodos recomendados nesse momento, para estudos de sensibilidade à oxacilina em SCoN eram os de diluição em caldo e de difusão com disco de oxacilina. De acordo com esse documento, a placa de *screening* não detectava de forma eficiente as cepas de SCoN resistentes à oxacilina, e este método era recomendado, como confirmatório, apenas para *S. aureus* (PALAVECINO, 2002).

O disco de cefoxitina, como método de triagem, passou a ser recomendado pelo CLSI a partir de 2004. Nesse documento advertia-se que isolados outros que *S. epidermidis* deveriam ter a resistência confirmada através de testes confirmatórios

para a presença do gene *mecA* (Reação em Cadeia da Polimerase – PCR) ou detecção da PBP2a (método de aglutinação em látex) (TERASAWA, 2006).

Nova mudança nos diâmetros dos halos para o disco de cefoxitina ocorreu em 2007. Mímica et al (2007) demonstraram um acréscimo na sensibilidade do disco de cefoxitina para a detecção de resistência à metilicina/oxacilina em *S. aureus*, de 92% para 98%, comparando-se os pontos corte do CLSI 2005 e 2007, respectivamente. As medidas mudaram apenas para *S. aureus* e *S. lugdunensis*, mantiveram-se as mesmas para SCoN (exceto *S. lugdunensis*). O teste de *screening* com ágar oxacilina continua como confirmatório para *S. aureus*. Em modificação ao CLSI 2005 no qual se estabelecia o teste com disco de cefoxitina comparável ao teste de disco de oxacilina em termos de prever a resistência *mecA* em *S. aureus* e *S. lugdunensis*, para este último, no documento de 2007, apenas o disco de cefoxitina é indicado (MIMICA, 2007; CLSI, 2007; CLSI, 2005).

Conforme atualização do CLSI (documento M100-S18) publicada em janeiro de 2008, mantiveram-se as recomendações do ano anterior (CLSI, 2008).

A constante mudança nas preconizações do CLSI demonstra que não existe consenso absoluto entre os diferentes países sobre qual (is) método utilizar e quando utilizar cada um deles e evidencia-se a importância da continuidade de estudos dos métodos microbiológicos recomendados para detecção desta resistência na rotina laboratorial (TERASAWA, 2006; MIMICA, 2007; MENDES, 2007).

Em janeiro de 2009, a previsão da resistência à oxacilina nos SCoN foi novamente modificada (CLSI, 2009): somente é recomendado agora efetuar esta pesquisa utilizando o disco de cefoxitina 30µg. Na atualização do CLSI 2010 as especificações para a detecção da resistência à oxacilina se mantiveram conforme as determinadas no ano anterior.

4 – MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Procedência e acondicionamento das amostras

Durante o período de janeiro de 2008 a dezembro de 2008 foram coletadas no Laboratório de Análises Clínicas (LAC) do HUSM 160 amostras de SCoN. Estas amostras foram provenientes de pacientes atendidos em todos os setores do hospital universitário. Os materiais clínicos coletados foram sangue, líquido pleural, liquor, fluido de diálise, pele (proveniente da unidade de queimados), abscessos, feridas cirúrgicas, cateteres, entre outros.

As amostras foram previamente identificadas no LAC utilizando-se a automação (MicroScan®-Siemens), sendo posteriormente encaminhada ao Laboratório de Bacteriologia (LAB) do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas (DACT) desta universidade onde se procedeu a identificação convencional através da coloração de Gram, teste da catalase e coagulase.

Após esta etapa preliminar as amostras foram armazenadas em caldo de soja tripticaseína (TSB/Biobrás Diagnósticos) com 15% de glicerol, à – 20 °C até o momento das análises.

4.2 Critérios de inclusão das amostras

Foram selecionados para esta pesquisa todos os isolados de SCoN provenientes de pacientes atendidos nas unidades do HUSM que, apresentaram resistência à oxacilina em pelo menos um teste fenotípico (automação e/ou difusão do disco).

4.3 Testes de suscetibilidade aos antimicrobianos

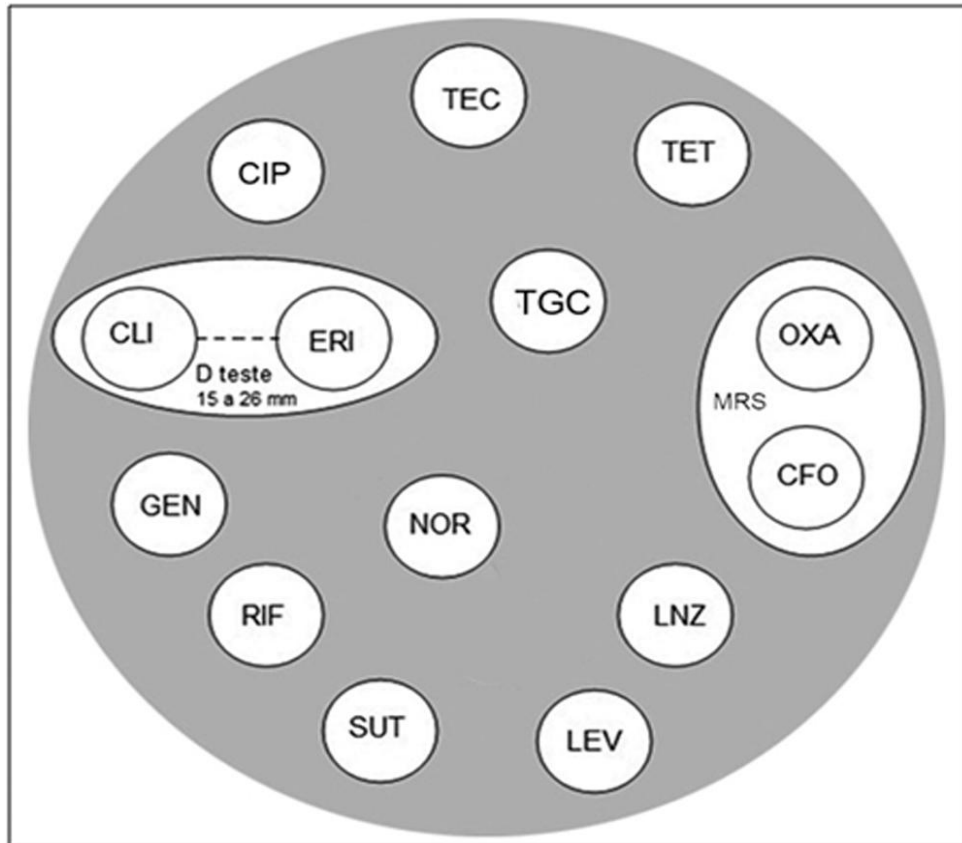
O perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos dos isolados de SCoN foi realizado utilizando a técnica de difusão do disco, automação MicroScan® (Siemens) e para o antimicrobiano vancomicina, foi realizada também, a técnica de microdiluição em caldo com a determinação da CIM.

4.3.1 Difusão do disco

Este teste seguiu as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI/2009). Todas as amostras foram testadas frente aos seguintes antimicrobianos: ciprofloxacina (CIP), clindamicina (CLI), cefoxitina (CFO), eritromicina (ERI), gentamicina (GEN), levofloxacina (LEV), linezolida (LNZ), norfloxacino (NOR), oxacilina (OXA), rifampicina (RIF), sulfametoxazol/trimetoprima (SUT), teicoplanina (TEC), tigeciclina (TIG) e tetraciclina (TET). Os discos de clindamicina e eritromicina foram colocados a uma distância de 15-26 mm centro a centro dos discos (como pode ser visualizado na Figura 6), para a pesquisa da resistência induzível a clindamicina (detecção do fenótipo MLS_B). Todos os discos foram adquiridos da SENSIDISC.

Para a realização do teste de difusão do disco as cepas foram reativadas do caldo TSB acrescido de glicerol em ágar Mueller Hinton (Himedia®). Desta cultura foram escolhidas de 4 a 5 colônias isoladas que apresentavam tamanhos e cor semelhantes, as quais foram dissolvidas em solução salina 0,9%, para obtenção de uma turvação equivalente à escala 0,5 de McFarland. A seguir, esta suspensão foi espalhada em três direções, com o auxílio de um “swab” estéril, em uma placa de Petri de 150mm contendo ágar Muller Hinton (Himedia®). Após 5 a 15 minutos os discos de antimicrobianos foram dispensados sobre o ágar (Figura 6).

FIGURA 6: Representação da disposição dos discos de antimicrobianos usada na técnica de difusão do disco.



Para a tigeciclina, como não há critérios de halos interpretativos pelo CLSI, foram utilizados os aprovados pelo *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) (Tygacil-ano 2005).

A interpretação dos resultados obtidos com a realização do antibiograma foi efetuada com base nos diâmetros fornecidos pelo CLSI 2009, Tabela 2 C, M100-S19, para cada antimicrobiano testado, sendo os mesmos expostos no Quadro 1.

QUADRO 1: Diâmetros utilizados para interpretação dos antibiogramas realizados com as amostras de SCoN envolvidas no estudo.

ANTIMICROBIANO	GRUPO	DIÂMETROS CLSI 2009		
		S	I	R
Ciprofloxacino	C	≥ 21	16-20	≤ 15
Clindamicina	A	≥ 21	15-20	≤ 14
Eritromicina	A	≥ 23	14-22	≤ 13
Gentamicina	C***	≥ 15	13-14	≤ 12
Levofloxacino	C	≥ 19	16-18	≤ 15
Linezolida	B	≥ 21	-	≤ 20
Norfloxacino	U****	≥ 17	13-16	≤ 12
Penicilina	A*	≥ 29	-	≤ 28
Rifampicina	B**	≥ 20	17-19	≤ 16
Sulfametoazol/Trimetoprima	A	≥ 16	11-15	≤ 10
Teicoplanina	B	≥ 14	11-13	≤ 10
Tetraciclina	B	≥ 19	15-18	≤ 14

* Testar e reportar; ** Testar e reportar seletivamente, *** Testar quando solicitado, **** Urinário

O controle de qualidade foi efetuado para todos os discos utilizados, com cepas padrão de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (CIM), de acordo com a Tabela 3, M100-S19, CLSI 2009.

4.3.2 Automação MicroScan® (Siemens)

Testes de sensibilidade utilizando automação (MicroScan - Siemens) também foram efetuados; nesta análise não foram avaliados cefoxitina, teicoplanina, tetraciclina e tigeciclina, mas incluiu-se o antimicrobiano vancomicina.

4.3.3 Microdiluição em caldo

Utilizou-se a técnica de microdiluição em caldo de acordo com o documento M7-A6- NCCLS/CLSI 2003 para o antimicrobiano vancomicina. Para esta técnica empregaram-se placas de 96 poços onde foram distribuídos 100 µL de caldo Mueller

Hinton (Himedia®) em cada poço e 20 µL do antimicrobiano foi dispensado no primeiro poço, onde se obteve a concentração de 512 µL/mL. Nos poços subseqüentes realizaram-se diluições para a obtenção das seguintes concentrações: 256 µL, 128 µL, 64 µL, 32 µL, 16 µL, 8 µL, 4 µL, 2 µL, 1 µL e 0,5 µL/mL (Quadro 2). O inóculo bacteriano correspondente ao tubo 0,5 da escala de McFarland foi lido em espectrofotômetro a 625nm, obtendo-se uma absorbância entre 0,08 e 0,1. Após o ajuste do inóculo, 100 µL do mesmo foram dispensados em cada poço.

QUADRO 2: Representação da técnica de microdiluição em caldo utilizada para a determinação da CIM do antimicrobiano vancomicina.

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12
Caldo MH (µL)	180	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Antimicrobiano 1024 µL/mL (µL)	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Diluição anterior (µL)	Retira 100 para o 2°	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100 Retira 100
Inóculo (µL)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Volume Final (µL)	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200
Concentração Final (µg/mL)	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25

Após o período de incubação de 24 horas a 35±2 °C, dispensou-se em cada poço 15 µL do corante 2,3,5-trifeniltetrazólio (CTT) 1% para facilitar a leitura visual da CIM. Este corante é incolor e quando reduzido torna-se vermelho pela formação do trifenilformazam (TTF) indicando que há crescimento bacteriano (ALEF,1998), a ausência de crescimento bacteriano caracteriza a CIM. O teste foi realizado em triplicata.

4.4 Testes para detecção da resistência à oxacilina em isolados de SCoN

4.4.1 Testes fenotípicos

Na detecção fenotípica da resistência à oxacilina foram utilizados os discos de oxacilina e cefoxitina. Estes foram testados juntamente aos demais discos de antimicrobianos utilizados neste estudo, de acordo com o exposto na Figura 6. Para a interpretação dos resultados obtidos neste estudo foi necessário o uso tanto do CLSI 2009 como do CLSI 2008, uma vez que, a partir do ano de 2009 o CLSI não recomenda mais o uso do disco de oxacilina na previsão da resistência à oxacilina em isolados de SCoN. O motivo da inclusão do mesmo neste estudo foi para comparar o seu desempenho na detecção da mesma.

Os parâmetros utilizados para a interpretação dos testes fenotípicos são os expostos no Quadro 3.

QUADRO 3: Parâmetros para interpretação dos testes fenotípicos utilizados para detecção da resistência à oxacilina em isolados de SCoN.

ANTIMICROBIANO	CLSI	DIÂMETROS		
		S	I	R
Cefoxitina	2009	≥ 25	-	≤ 24
Oxacilina	2008	≥ 18	-	≤ 17

4.4.2 Testes moleculares

O teste molecular utilizado foi a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detecção do gene *mecA*.

4.4.2.1 Preparo da amostra (extração do DNA genômico)

Os isolados testados pela técnica de PCR foram semeados em ágar não seletivo Triptycase Soy Agar (TSA-Himedia®) e incubados por uma noite a temperatura de 35 °C. Para a extração do DNA foi feita uma suspensão bacteriana

com o isolado em questão, utilizando-se de um tubo do tipo Eppendorf contendo 500 µL de água Milli-Q estéril. Posteriormente esta suspensão foi fervida por 15 minutos e centrifugada durante 10 minutos a 11000 rpm. Em seguida, procedeu-se a retirada de 200 µL do sobrenadante para outro tubo, que foi armazenado a -20 °C até o momento da análise.

4.4.2.2 Preparo dos reagentes

Para a reação de amplificação foi preparada a mistura (Mix) contendo 15pmol dos iniciadores, 200µM dos desoxirribonucleotídeos - dNTPs (Ludwig Biotec), Tampão de *Taq* 1x (Ludwig Biotec) e 5U de *Taq*DNA polimerase (Ludwig Biotec). Foram utilizados como iniciadores o seguinte par de *primers*: SA-1 (5' CGG TAA CAT TGA TCG CAA CGT TCA 3') e SA-2 (5' CTT TGG AAC GAT GCC TAA TCT CAT 3') (Ludwig Biotec).

O mix para a reação foi preparado pela adição dos dNTPs, *Taq* DNA polimerase, tampão de *Taq* DNA polimerase, MgCl₂ e a mistura de oligonucleotídeos iniciadores em um tubo Eppendorf . O volume final do mix obedeceu ao número de reações a serem realizadas.

4.4.2.3 Preparo da reação

Em cada tubo de reação foi distribuído 4 µL do DNA em teste e 21 µL do Mix. Os tubos foram transferidos para o termociclador para a realização do ciclo *mecA*. Foi utilizado o seguinte programa: 1 minuto a 94°C, seguido por 15 ciclos de 30s a 94°C, 30s a 68°C e 30s a 72°C. Após, foram realizados mais 20 ciclos de 30s a 94°C, 30s a 60°C e 30s a 72°C. O programa terminou com uma extensão adicional de 2 minutos a 72°C (KEARNS, 1999).

4.4.2.4 Análise dos produtos

O produto amplificado de cada reação foi submetido à eletroforese em gel de agarose 2% (Ludwig Biotec) com brometo de etídio (0,5µg/mL) durante 1 hora e visualizado em UV (312nm) com auxílio de transiluminador Fusion-FX7-7026-

WL/LC/26MX (Vilber Lournat®). O resultado positivo para a presença do gene *mecA* foi evidenciado através da amplificação do fragmento com 214 pares de base e confirmado pelo controle positivo e marcador de peso molecular.

4.4.2.5 Controle positivo

Foi utilizada como controle positivo para a reação a cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 43330.

4.5 Reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção do gene *icaD* envolvido na formação de biofilme nos isolados:

A caracterização molecular da produção do biofilme nos isolados de SCoN seguiu descrições de GRECO et al. (2008) pela amplificação do gene *icaD*. Na amplificação foram utilizados os seguintes iniciadores: (seicaDF) 5'-AAG CCC AGA CAG AGG CAA TAT CCA-3' e (seicaDR) 5'-AGT ACA AAC AAA CTC ATC CAT CCGA-3'. Como molde foi utilizado o DNA termo-extraído (GRECO, 2008) dos isolados bacterianos em água Mili-Q, sendo que 4 µL desta suspensão foram aplicados em 21 µL do mix contendo, 4pmol dos primers, 0,4mM dos desoxirribonucleotídeos, Tampão de *Taq* 1x e 1U de *Taq* (CENBIOT, UFRGS). Esta mistura foi levada ao termociclador e submetida a uma etapa inicial de desnaturação a 95 °C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos constituídos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 53,5 °C e 3 minutos a 72 °C. Um passo de extensão final a 72 °C por 5 minutos foi adicionado após o término dos ciclos. O resultado do PCR foi verificado em gel de agarose a 1% e corado com brometo de etídio, sendo a amplificação de um fragmento com 239 pares de bases o resultado obtido em isolados biofilme positivo. Nesta técnica foi utilizada como controle positivo a cepa de *S. epidermidis* ATCC 35984.

4.6 Significância clínica dos isolados

Foi feita uma análise com base nos dados obtidos no prontuário dos pacientes, através do número do SAME, armazenados no arquivo do HUSM. Não

houve contato direto com os pacientes, ou exposição dos pacientes a questionários, também o nome foi mantido em sigilo. Não houve, portanto, a necessidade do emprego do Termo de Consentimento Livre Esclarecimento (TCLE). O trabalho foi submetido ao Comitê de Ética da Universidade Federal de Santa Maria e aprovado em 10/09/2008 sob número do processo 0117.0.243.000-08.

Avaliaram-se variáveis descritivas, tais como: patologia clínica, suspeita diagnóstica, motivo de internação, resultados de testes laboratoriais, terapia antimicrobiana empregada, tempo de internação e fatores que podem favorecer as infecções pelos SCoN como: imunossupressão uso de dispositivos médicos invasivos e doença de base.

4.7 Análise estatística dos dados

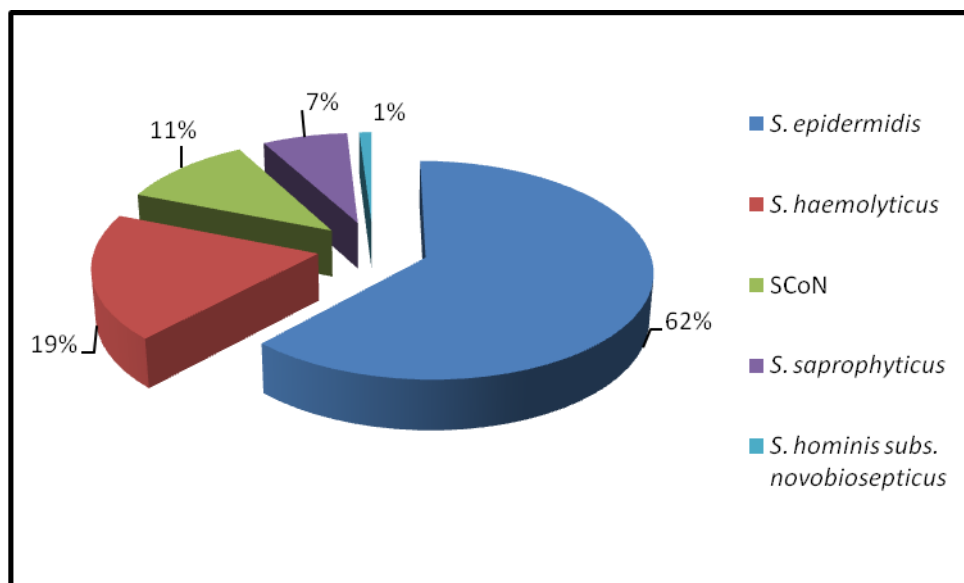
Neste estudo avaliou-se a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo dos testes fenotípicos (difusão do disco com cefoxitina e oxacilina) comparando-os ao teste genotípico (PCR gene *mecA*). A sensibilidade é definida como a capacidade do teste em detectar o resultado positivo em quem realmente tem a doença, e definida por: verdadeiros positivos / verdadeiros positivos + falsos negativos. A especificidade é a capacidade do teste em determinar casos negativos em uma população que não tem a doença, definida por: verdadeiros negativos / verdadeiros negativos + falsos positivos.

O valor preditivo positivo (VPP) expressa a probabilidade de um paciente com o teste positivo ter a doença ($VPP = \text{verdadeiros positivos} / \text{verdadeiros positivos} + \text{falsos positivos}$), e o valor preditivo negativo (VPN) expressa a probabilidade de um paciente com teste negativo, não detectar a doença ($VPN = \text{verdadeiros negativos} / \text{verdadeiros negativos} + \text{falsos negativos}$) (ARANGO, 2005).

5 – RESULTADOS

Durante o período do estudo, foram selecionados 160 isolados de *Staphylococcus* coagulase negativos resistentes à oxacilina/meticilina (MRS) provenientes de pacientes admitidos em todos os setores do HUSM. *Staphylococcus epidermidis*, foi o SCoN prevalente (62% - 99 de 160). Os demais isolados, por ordem decrescente, foram identificados como: *Staphylococcus haemolyticus* (19% - 30 de 160), SCoN (11% - 19 de 160), *Staphylococcus saprophyticus* (7% - 11 de 160) e *Staphylococcus hominis* subs. *novobiosepticus* (1% - 1 de 160) (Gráfico 1).

GRÁFICO 1: Distribuição em nível de espécies dos 160 isolados de SCoN-MRS provenientes de pacientes admitidos no HUSM durante o período de janeiro a dezembro de 2008.



Em relação aos espécimes clínicos, o sangue foi o tipo de amostra e nele foi isolado o maior número de SCoN (38% - 61 de 160), seguido por secreções de cânula orotraqueal (19% - 30 de 160), urina (9% - 14 de 160), lesões de pele (7,5% - 12 de 160), ponta de cateter (7% - 11 de 160) e liquor (4,5% - 8 de 160); os materiais com reduzido número de isolamentos foram agrupados em outros* (Tabela 1).

TABELA 1: Distribuição dos espécimes clínicos dos quais foram isolados os 160 SCoN resistentes à oxacilina no HUSM, no período de janeiro a dezembro de 2008.

ESPÉCIME CLÍNICO	N	%
Sangue	61	38
Secreções de cânula orotraqueal	30	19
Urina	14	9
Lesões de Pele	12	7,5
Ponta de Cateter	11	7
Liquor	8	4,5
Outros*	24	15
TOTAL	160	100

*Secreções em geral, fragmento de tecidos, líquido abdominal, escarro.

A avaliação da significância clínica dos SCoN-MRS isolados durante o período do estudo foi realizada através da análise dos dados contidos nos prontuários dos pacientes. Esta análise pode ser efetuada somente em 128 prontuários, pois 32 prontuários não foram localizados no setor de arquivo do HUSM durante o período do estudo. Dos 128 SCoN isolados, 62 (48%) foram considerados significantivos, isto é, o provável agente etiológico da infecção, e 41 contaminantes. Em 25 amostras não foi possível concluir se a amostra isolada foi considerada pelo clínico significativa ou contaminante.

Desses 62 SCoN considerados significantivos, 32 eram procedentes de culturas de sangue e 12 de urina. As demais amostras clínicas significantivas foram isoladas de: secreção de cânula orotraqueal (5), ponta de cateter (3) e outros (10) (Tabela 2).

TABELA 2: Material clínico de procedência das 62 amostras de SCoN isoladas durante o período do estudo que foram consideradas como prováveis agentes etiológicos de infecção através da análise dos prontuários dos pacientes.

MATERIAL CLÍNICO	N	%
Sangue	32	52
Urina	12	19
Secreção de cânula orotraqueal	5	8
Ponta de cateter	3	5
Outros*	10	16
TOTAL	62	100

* Secreções em geral, escarro, líquido abdominal.

Quando analisamos as amostras consideradas significativas verificamos que dos 62 SCoN considerados significativos neste trabalho, 11 foram isolados de cinco pacientes. Desta forma, os dados tanto das amostras como dos pacientes dos quais foram isoladas mais de uma amostra significativa estão listadas na Tabela 3.

TABELA 3: Dados referentes aos 5 pacientes internados no HUSM dos quais mais de uma amostra de SCoN-MRS considerada significativa foi isolada.

PACIENTE	IDADE	UNIDADE	DOENÇA DE BASE	AMOSTRAS	TRATAMENTO
A	83 anos	UTI	Câncer de vesícula	1-Sangue: SCoN 2-Sangue: SCoN	Tratamento inicial com meropenem, após resultados hemocultura incluído VANCOMICINA
B	68 anos	CTMO*	Mieloma múltiplo	1-Sangue: <i>S. epidermidis</i> 2-Ponta cateter: <i>S. epidermidis</i> 3-Ponta cateter: <i>S. epidermidis</i>	Estava em tratamento com o uso de cefepime que foi substituído por VANCOMICINA
C	6 anos	CTcriac**	Leucemia	1-Sangue: <i>S. epidermidis</i> 2-Ponta cateter: <i>S. epidermidis</i>	Paciente em tratamento com cefepime, porém continuava febril. Após resultados de exames feita a troca para VANCOMICINA
D	79 anos	UTI	AVC e Pneumonia	1-Escarro: <i>S. epidermidis</i> 2-Sangue: <i>S. epidermidis</i>	Fez uso de vários antimicrobianos, mas devido a piora clínica e resultados dos culturais mudaram ATB para Tazobactam+ VANCOMICINA
E	≈ 11 meses	UTI/RN	Desconforto respiratório (Pneumonia?)	1-Secreção COT: <i>S. epidermidis</i> 2-Sangue: SCoN	Início ATB com ampicilina+gentamicina, continua febril, troca para cefuroxima+amicacina. Depois da cultura positiva para SCN inicia tratamento com VANCOMICINA

*CTMO: Centro de Transplante de Medula Óssea;

**CTcriac: Centro de Tratamento da criança com câncer.

Na Tabela 4, estão relacionadas às unidades de procedência dos 160 isolados de SCoN envolvidos no estudo. A UTI/adulto foi o setor com maior número de isolamentos (21% - 33 de 160), seguido da UTI recém nascidos (UTI/RN) (18% - 29 de 160), Pronto Atendimento (PA/adulto) com 15% (24 de 160), ambulatório (7% - 11 de 160), CTcriac (6,4% - 10 de 160) e nefrologia (5% - 8 de 160).

TABELA 4: Distribuição das amostras de SCoN isolados durante o período do estudo de acordo com a unidade hospitalar de procedência.

UNIDADE	N	%
UTI/Adulto	33	21
UTI/RN	29	18
PA/Adulto	24	15
Ambulatório	11	7
CTcriac*	10	6
Nefrologia	8	5
Outros**	45	28
TOTAL	160	100

* Centro de Tratamento da Criança com Câncer

**Bloco Cirúrgico, Centro Obstétrico, PA pediátrico, UTI pediátrica, Centro de Transplante de Medula Óssea (CTMO), Unidade Coronariana Intensiva (UCI), Pediatria.

O perfil de sensibilidade aos antimicrobianos utilizando difusão do disco está representado na Tabela 5. Os isolados testados apresentaram significativa resistência a várias classes de antimicrobianos, o que pode ser evidenciado na Tabela 5 e resumido em perfis de sensibilidade na Tabela 6. As maiores taxas de resistência foram frente à eritromicina (84%) e clindamicina (65%). Já as maiores sensibilidades foram apontadas por tigeciclina (100%), linezolida (100%) e teicoplanina (100%)

TABELA 5: Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos dos 160 isolados de SCoN obtidos de pacientes admitidos no HUSM, no período de janeiro a dezembro de 2008, de acordo com os testes de difusão do disco (DD).

Antimicrobiano	Sensível % (N)	Intermediário % (N)	Resistente % (N)
Cefoxitina	11 (18)	0 (0)	89 (142)
Ciprofloxacino	39 (63)	4 (6)	57 (91)
Clindamicina	34 (54)	1 (2)	65 (104)
Eritromicina	14 (22)	2 (3)	84 (135)
Gentamicina	29 (47)	7 (11)	64 (102)
Levofloxacino	47 (75)	12 (19)	41 (66)
Linezolida	100 (160)	0 (0)	0 (0)
Norfloxacino	39 (63)	3 (5)	58 (92)
Oxacilina	7 (11)	0 (0)	93 (149)
Rifampicina	75 (120)	3 (5)	22 (35)
Sulfametazol/trimetoprima	37 (59)	0 (0)	63 (101)
Teicoplanina	100 (160)	0 (0)	0 (0)
Tetraciclina	64 (102)	1 (2)	35 (56)
Tigeciclina	100 (160)	0 (0)	0 (0)

Juntamente com a análise da sensibilidade antimicrobiana por difusão do disco foi realizado o teste para a detecção da resistência induzível à clindamicina (D teste). Nos 160 isolados testados, 10% (15 de 160) foram positivos neste teste.

Com os dados obtidos na técnica de difusão do disco classificamos os isolados em 7 perfis de sensibilidade prevalentes. Aqueles que não se enquadraram entre os perfis prevalentes mostraram-se bastante distintos entre si e por este motivo foram agrupados como “outros” (Tabela 6).

TABELA 6: Perfis de sensibilidade prevalentes dos 160 isolados de SCoN provenientes de pacientes admitidos no HUSM no período de janeiro a dezembro de 2008, de acordo com a metodologia de difusão do disco (CLSI 2009).

ANTIMICROBIANO	PERFIL							OUTROS
	I	II	III	IV	V	VI	VII	
TIGECICLINA	S	S	S	S	S	S	S	-
TEICOPLAMINA	S	S	S	S	S	S	S	-
LINEZOLIDA	S	S	S	S	S	S	S	-
RIFAMPICINA	R	S	R	S	S	S	S	-
TETRACICLINA	S	S	R	R	S	R	S	-
CIPROFLOXACINA	R	R	R	S	R	R	S	-
CLINDAMICINA	R	R	R	S	R	R	S	-
ERITROMICINA	R	R	R	R	R	R	S	-
GENTAMICINA	R	R	R	R	R	R	S	-
LEVOFLOXACINO	R	R	R	S	R	R	S	-
NORFLOXACINO	R	R	R	S	R	R	S	-
SULFAMETOXAZOL/ TRIMETOPRIMA	R	R	R	S	S	R	S	-
N	23	21	15	12	11	10	9	59
%	15	13	9	7,5	7	6,5	6	36

A sensibilidade antimicrobiana dos SCoN isolados, também foi testada utilizando-se a automação MicroScan®(Siemens); as maiores resistências foram apresentadas por eritromicina (81%), gentamicina (74%) e clindamicina (65%). A maior sensibilidade foi apresentada por vancomicina (100%) e rifampicina (67%) (Tabela 7).

TABELA 7: Sensibilidade aos antimicrobianos das 160 cepas de SCoN isoladas das no HUSM, no período de janeiro de 2008 a janeiro de 2009, utilizando-se a automação MicroScan®.

Antimicrobiano	Sensível	Intermediário	Resistente
	% (N)	% (N)	% (N)
Ciprofloxacino	39 (63)	0 (0)	61 (97)
Clindamicina	34 (54)	1 (2)	65 (104)
Eritromicina	19 (30)	0 (0)	81 (130)
Gentamicina	24 (38)	2 (3)	74 (119)
Levofloxacino	35 (56)	26 (41)	39 (63)
Norfloxacino	39 (63)	3 (5)	58 (92)
Oxacilina	2 (3)	0 (0)	98 (157)
Rifampicina	67 (107)	4 (6)	29 (47)
Sulfametazol/trimetoprim	48 (77)	0 (0)	52 (83)
Vancomicina	100 (160)	0 (0)	0 (0)

Para o antimicrobiano vancomicina, a análise de sua suscetibilidade antimicrobiana foi, também, realizada utilizando-se a técnica quantitativa de microdiluição em caldo. Utilizamos as duas marcas comerciais normalmente disponibilizadas no HUSM, as quais foram denominadas: **vancomicina Novafarma (VAN 1)** e **vancomicina Eurofarma (VAN 2)**. Em decorrência de problemas técnicos (falta de crescimento da cepa) relacionados a 8 cepas do estudo, foi possível a realização da técnica somente com 152 isolados. Todas as 152 amostras foram sensíveis, sendo 2µg/ml a concentração mais freqüente dos isolados para as duas marcas (Tabela 8).

Houve uma pequena diferença quando comparamos as duas marcas de vancomicina testadas neste estudo. Alguns isolados apresentaram CIM maiores para uma marca do que para outra.

O teste de difusão do disco não é mais recomendado para o antimicrobiano vancomicina a partir do CLSI 2009, porém, os discos deste antimicrobiano já haviam sido adquiridos para esta pesquisa. Sendo assim, eles foram incluídos nos testes de suscetibilidade resultando em 100% de sensibilidade nos isolados testados.

TABELA 8: Distribuição dos isolados de SCoN de acordo com a CIM para as duas marcas testadas.

ANTIMICROBIANO	CONCENTRAÇÃO				
	0,5µg/ml	1 µg/ml	2 µg/ml	4 µg/ml	TOTAL
VANCOMICINA 1	8 (5%)	41 (27%)	71 (47%)	32 (21%)	152*(100%)
VANCOMICINA 2	6 (4%)	31 (20%)	76 (50%)	39 (26%)	152*(100%)

*Testes realizado somente com 152 dos 160 isolados devido a perda dos SCN isolados não testados.

Os testes fenotípicos utilizados para detecção da resistência à oxacilina classificaram como resistentes 89% (125 de 140) dos isolados utilizando o disco de cefoxitina e 94% (132 de 140) para o disco de oxacilina (Figura 7). Já na detecção molecular desta resistência (Figura 8), 79% (111 de 140) dos isolados foram classificados como realmente resistentes. Estes testes foram realizados somente com 140 dos 160 isolados selecionados para esta pesquisa, isto é, devido a inviabilidade das demais amostras.

FIGURA 7: Representação do teste fenotípico de difusão do disco utilizando os discos de cefoxitina (30 µg) e oxacilina (1 µg) onde o isolado em questão foi caracterizado como resistente para ambos os discos.

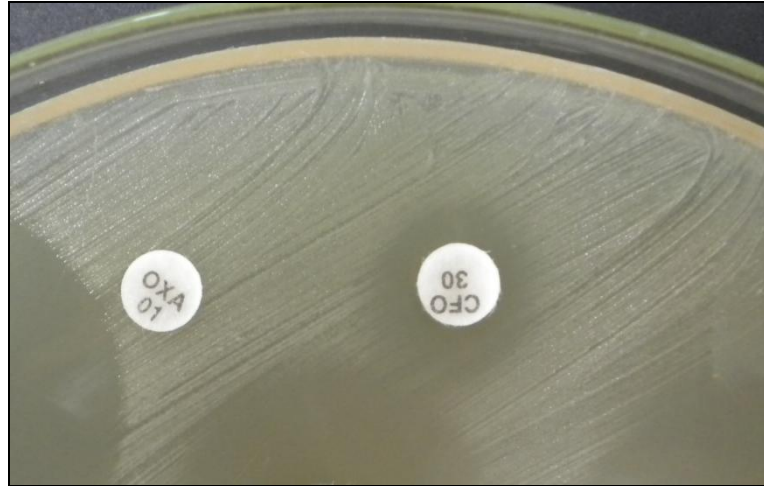
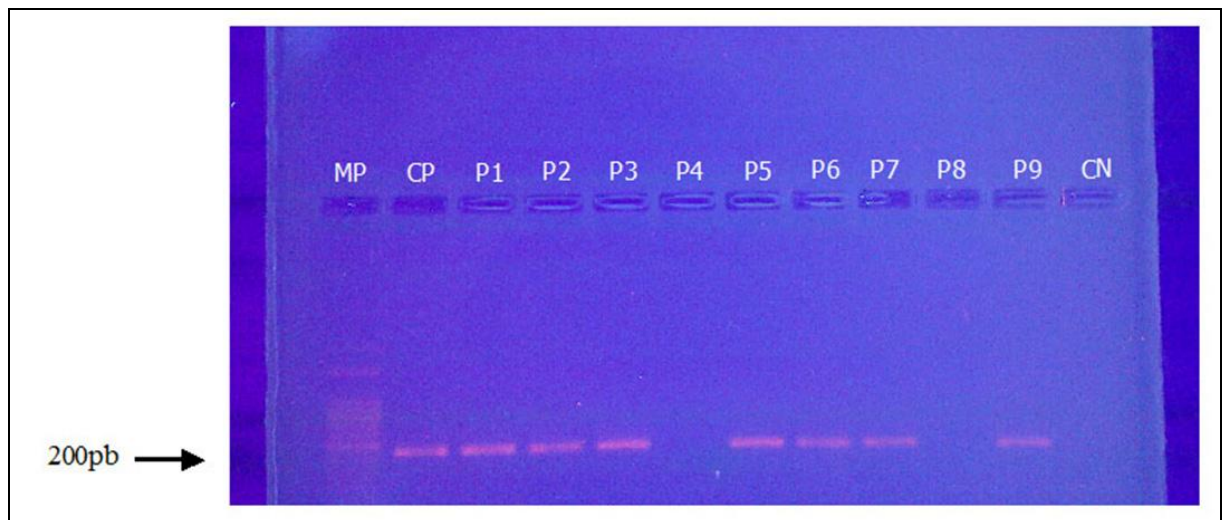


FIGURA 8: Teste molecular para detecção do gene *mecA* nos isolados de SCoN selecionados para este estudo.



Eletoforese em gel de agarose (1,5%) dos amplicons do gene *mecA* nos isolados de SCoN. Onde: MP: Marcador de peso molecular, Ladder 100 (Ludwig Biotec), CP: Controle Positivo da reação (*S. aureus* ATCC 43330), P1, P2, P3, P5, P6, P7 e P9 amostras positivas, P4 e P8 amostras negativas, CN: Controle negativo (água).

Na Tabela 9 estão representados os dados referentes aos testes, tanto fenotípicos como genotípicos, utilizados na caracterização da resistência à oxacilina nos isolados envolvidos no estudo.

TABELA 9: Testes fenotípicos e moleculares para detecção da resistência à oxacilina nos 140* isolados de SCoN.

TESTES	SENSÍVEL		RESISTENTE		TOTAL	
	N	%	N	%	N	%
TESTE FENOTÍPICO						
DISCO DE CEFOXITINA 30µg	15	11	125	89	140*	100
DISCO DE OXACILINA 1 µg	8	6	132	94	140*	100
TESTE MOLECULAR						
DETECÇÃO DO GENE <i>mecA</i>	29	21	111	79	140*	100

*Teste realizado somente com 140 dos 160 isolados envolvidos no estudo devido a inviabilidade das amostras não testadas.

Em 90% (127 de 140) dos testes fenotípicos realizados, houve correlação entre os discos de cefoxitina e oxacilina. Já em 10% dos isolados (13 de 140) os discos apresentaram resultados discrepantes. Em 7 isolados o disco de cefoxitina se mostrou sensível, o de oxacilina resistente e o gene *mecA* foi negativo. Em outros 3 isolados, o disco de cefoxitina foi sensível e o disco de oxacilina resistente, já o gene *mecA* positivo. Outros 2 isolados se mostraram resistentes no disco de cefoxitina e sensíveis no de oxacilina e o gene *mecA* foi positivo. Em um isolado o disco de cefoxitina foi resistente e o de oxacilina sensível com gene *mecA* negativo.

Quando se analisou as espécies das cepas onde ocorreram discrepâncias nos resultados dos testes fenotípicos, observou-se que 6 das 13 cepas foram identificadas como sendo *S. saprophyticus*, 5 das 13 eram SCoN e 2 das 13 *S. haemolyticus* (Tabela 10).

TABELA 10: Relação dos isolados de SCoN envolvidos no estudo que apresentaram resultados discrepantes no teste fenotípico de detecção da resistência à oxacilina na qual foi empregada a técnica de difusão do disco.

ISOLADO	TESTE		
	CEFOXITINA	OXACILINA	<i>mecA</i>
1 - SCoN	S	R	-
2 – <i>S. saprophyticus</i>	S	R	-
3 – <i>S. haemolyticus</i>	R	S	+
4 – <i>S. saprophyticus</i>	S	R	-
5 - SCoN	S	R	+
6 - SCoN	S	R	+
7 – <i>S. saprophyticus</i>	S	R	-
8 – <i>S. saprophyticus</i>	S	R	-
9 – <i>S. saprophyticus</i>	S	R	-
10 – <i>S. haemolyticus</i>	R	S	+
11 - SCoN	S	R	-
12 – <i>S. saprophyticus</i>	S	R	+
13 - SCoN	R	S	-

Na análise estatística dos dados referentes aos testes fenotípicos realizados neste estudo para a caracterização da resistência à oxacilina, o teste de difusão do disco foi comparado ao teste genotípico de referência, sendo este a detecção do gene *mecA*. Nesta análise, utilizando os dados contidos na Tabela 11 obtivemos que o disco de cefoxitina apresentou uma sensibilidade de 96%, enquanto o disco de oxacilina apresentou sensibilidade de 95%. Os valores de especificidade foram de 33,3 % para o disco de cefoxitina e 11, 1% para o disco de oxacilina. Foram calculados também o valor predito positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) para os dois discos, sendo que o valor preditivo positivo para o disco de cefoxitina foi 85,7% e para o disco de oxacilina 81,7%. Já o valor preditivo negativo foi 64,3%

para o disco de cefoxitina e 33,3% para o disco de oxacilina. Dados demonstrados na Tabela 12.

TABELA 11: Resultados dos testes para caracterização da resistência à oxacilina das 140 cepas de SCoN isoladas de pacientes atendidos no HUSM, no período de janeiro a dezembro de 2008.

	Disco Oxacilina		Disco Cefoxitina	
	R	S	R	S
Gene <i>mecA</i> +	107/140	6/140	108/140	5/140
Gene <i>mecA</i> -	24/140	3/140	18/140	9/140
Total	131/140	9/140	126/140	14/140

TABELA 12: Valores de sensibilidade, especificidade, VPP e VPN dos testes fenotípicos realizados com os isolados de SCoN envolvidos no estudo.

	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN
Cefoxitina	96%	33,3%	85,7%	64,3%
Oxacilina	95%	11,1%	81,7%	33,3%

Juntamente com os testes moleculares para detecção do gene *mecA* foi realizada a detecção do gene *icaD*, o qual é um dos genes responsável pela formação de biofilme. O gene *icaD* foi detectado em 45% das amostras testadas, sendo estas prováveis cepas formadoras de biofilme. Destas, 74% dos isolados *icaD* positivos foram identificados como sendo *S. epidermidis*.

Analisando os dados referentes às amostras onde foi detectado o gene *icaD*, foi possível verificar que 44% (29 de 66) delas foram consideradas como significativas na análise feita com base nos dados contidos no prontuário dos pacientes. Em relação às unidades de procedência das cepas *icaD* positivas,

verificamos que 40% (26 de 66) delas são oriundas de UTIs (tanto a adulto como RN). Quanto ao material clínico prevalente, o sangue se mostrou a principal fonte de isolados prováveis formadores de biofilme (34% 22 de 66). Nas cepas onde provavelmente ocorre a formação de biofilme, foi identificada uma considerável resistência aos antimicrobianos testados neste estudo, sendo que 45% (30 de 66) das cepas são pertencentes aos perfis mais resistentes (perfil I, II e III).

6 – DISCUSSÃO

Os SCoN representam o maior componente da microbiota da pele e mucosas por viverem em equilíbrio com o hospedeiro, por muito tempo foram considerados como microrganismos não patogênicos (MENICHETTI, 2005). Todavia, a combinação do aumento do uso de dispositivos intravasculares e crescimento no número de pacientes imunocomprometidos hospitalizados, fez com que estas bactérias se tornassem importantes agentes de infecções nosocomiais em especial bacteremias (NATOLI, 2009). O tratamento de infecções causadas por SCoN é um sério problema devido ao fato de serem comumente mais resistentes (HANBERGER, 2001).

A correta identificação dos SCoN a nível de espécie juntamente com a determinação de seu perfil de sensibilidade tem se tornado importante nos laboratórios de bacteriologia nos dias atuais, uma vez que algumas espécies possuem potencial patogênico reconhecido especialmente em isolados nosocomiais. Dentre elas, as espécies que mais frequentemente causam doenças em humanos são o *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* e *S. saprophyticus* (LAYER, 2006).

Em nosso estudo essa identificação foi realizada utilizando-se metodologia automatizada (MicroScan®-Siemens). *S. epidermidis* (62%) foi o prevalente, seguido de *S. haemolyticus* (19%). Estas duas espécies são as mais rotineiramente isoladas em infecções nosocomiais, e a frequência da resistência à oxacilina é alta (FERREIRA, 2002). Os demais isolados foram identificados como SCoN (11%), *S. saprophyticus* (7%) e *S. hominis* subs. *novobiosepticus* (1%). Resultados semelhantes foram relatados por D’Azevedo et al. (2008) e Ferreira et al. (2003), este último em estudo realizado em 10 hospitais brasileiros.

A espécie de SCoN mais isolada da microbiota normal, bem como de amostras clínicas é o *S. epidermidis* (DE PAULLIS, 2003) e do ponto de vista epidemiológico, este microrganismo tem desenvolvido estratégias interessantes para conquistar o ambiente hospitalar, e se transformar em um patógeno notório. Destaca-se a sua capacidade de colonizar superfícies inertes de dispositivos médicos invasivos, formando biofilmes de difícil tratamento, bem como, o

carreamento de diferentes elementos genéticos móveis, e que são responsáveis pela resistência à oxacilina (SCHOENFELDER, 2010).

O *S. haemolyticus*, também desempenha um papel considerável em infecções oportunistas relacionadas a dispositivos médicos implantados. Contudo, para esta espécie, as bases moleculares da formação do biofilme, ainda não foram totalmente elucidadas (FREDHEIM, 2009). Os níveis elevados de resistência aos antimicrobianos, incluindo a heterorresistência aos glicopeptídeos, compreendem características importantes, que tornam infecções por *S. haemolyticus* uma ameaça grave (D'AZEVEDO, 2008).

Em 19 (11%) isolados de nosso estudo, a identificação em nível de espécie não foi satisfatória utilizando-se o sistema automatizado. Dessa forma, estes foram classificados como *Staphylococcus* coagulase negativos. Apesar das vantagens oferecidas por este sistema, tais como, facilidade no fluxo de trabalho e rapidez no fornecimento de resultados, ele pode apresentar limitações na identificação e determinação da suscetibilidade de alguns patógenos (D'AZEVEDO, 2009). Entretanto, devido à crescente importância clínica dos SCoN, tornou-se importante que os laboratórios clínicos identifiquem estes microrganismos por meio de métodos confiáveis e reprodutíveis (KIM, 2008).

No estudo realizado por KIM et al. (2008), foi comparado a acurácia de três sistemas fenotípicos comerciais: MicroScan, Vitek 2 e Crystal GP com os métodos genotípicos 16S RNA e Micro Sq 500, sendo os últimos utilizados como referência. Em nosso estudo 88,1% das cepas de SCoN foram corretamente identificadas utilizando o sistema MicroScan®, as demais apresentaram problemas na identificação ou foram classificadas como pertencentes a outras espécies. Já no estudo citado acima, o sistema MicroScan obteve sucesso em 82,5% dos isolados testados.

Em 7% dos isolados, a cepa foi identificada como *S. saprophyticus*, e isoladas de amostras de urina que foram procedentes, principalmente de pacientes de sexo feminino atendidas no ambulatório do HUSM. Fato que está de acordo com o descrito na literatura, onde é relatado que esta espécie está associada, também a infecções do trato urinário (ITU) adquiridas na comunidade (WIDERSTRÖM, 2007), pois o grupo mais suscetível para estas infecções é composto por pacientes ambulatoriais jovens e do sexo feminino. Este microrganismo é um componente

normal da flora urogenital, responsável por até 42% de todas as ITUs em mulheres jovens, atrás somente da *Escherichia coli* (EIFF, 2002).

O isolamento de uma amostra de *S. hominis* subs. *novobiosepticus* nos chamou atenção, devido ao fato desta ser uma espécie relativamente nova, e está associada a surtos nosocomiais e multirresistência (CHAVES, 2005). Palazzo et al. (2008) em seu estudo reportaram o isolamento de 6 cepas deste microrganismo de hemoculturas oriundas de dois hospitais brasileiros. Juntamente a isto, realizaram testes de sensibilidade os quais evidenciaram multirresistência em 5 das 6 amostras, e que foram sensíveis somente a quinupristina/dalfopristina e CIM para vancomicina de 4µg/mL.

Em relação aos espécimes clínicos, onde foram isolados os SCoN envolvidos neste estudo, sangue foi o prevalente (38%). Os SCoN estão entre os microrganismos mais frequentemente isolados de culturas de sangue, e considerados uns dos principais agentes etiológicos destas infecções, porém são também os principais contaminantes nestas culturas (THYLEFORS, 1998; DIEKEMA, 2001).

Wisplinghoff et al. (2004), em estudo realizado em hospitais americanos, onde foram analisados 24.179 casos de ICS nosocomiais relatou SCoN como um importante patógeno nestas infecções. Isto posto, segundo o autor, uma superestimação das ICS causadas por SCoN pode ter ocorrido, uma vez que, mesmo apresentando sinais clínicos de infecção, pacientes com apenas uma amostra de hemocultura foram selecionados para o estudo. Dados nacionais (SADER, 2001) reportam *S. epidermidis* como terceiro agente mais isolado de ICS e como segundo agente mais isolado na America Latina (SADER, 2004).

Os demais materiais clínicos como secreções de cânula orotraqueal, urina, leões de pele, ponta de cateter e líquido (Tabela 1), também são considerados fontes comuns do isolamento destas bactérias. Deve-se isto ao fato de os SCoN serem frequentemente isolados de espécimes clínicos diversos. Entende-se que se trata de amostras provenientes de um sítio não estéril, e estes muitas vezes são considerados contaminantes e ignorados (TAN, 2006). Nestes casos, recomenda-se que a avaliação da significância clínica do isolado em questão seja feita utilizando-se de critérios laboratoriais, e se possível, dados clínicos, para que uma mais correta classificação do mesmo possa ser feita.

Outro fator a ser considerado é a habilidade destes agentes em sobreviver sobre as superfícies do meio ambiente, facilitando a transmissão cruzada a partir de pacientes ou trabalhadores da área da saúde. Esse contato interpessoal constitui um importante fator e disseminador no ambiente hospitalar (ALCARÁZ, 2003). Aliado a ele, outros fatores pré-diponentes como o uso de cateter, imunossupressão e antibioticoterapia prolongada, frequentemente encontrados em pacientes hospitalizados, contribuem para tornar o homem um hospedeiro vulnerável a infecções causadas por SCoN. Desta forma, avaliar a significância clínica de isolados provenientes, tanto de sítios estéreis como de não estéreis é um fator importante, mas constitui tarefa difícil.

Em virtude disso foi realizada uma avaliação da significância clínica dos isolados selecionados para este estudo com base em dados obtidos nos prontuários dos pacientes. Nesta análise constatamos que uma parte significativa dos nossos isolados (48%) foram considerados como prováveis agentes etiológicos da infecção, e destes, o sangue foi material clínico da maioria das amostras (52%). Relatos na literatura sobre a significância clínica dos SCoN isolados de hemocultura sugerem que no Brasil apenas de 10%-20% das ICS são causadas por SCoN (SADER, 2004). Thylefors et al. (1998) em estudo de revisão, demonstraram que os SCoN podem representar contaminação em 69% a 94% das hemoculturas em estudos americanos e europeus. Todavia, deve-se considerar que os critérios de inclusão utilizados, e que selecionaram apenas os SCoN apresentaram resistência à oxacilina em pelo menos uns dos testes fenotípico. Também podem ter influenciado este resultado, já que o seu emprego dificultou a inclusão de um número maior de cepas, possivelmente contaminantes.

Ainda em relação à significância clínica dos isolados, na Tabela 3 estão listados pacientes e que mais de uma amostra de SCoN foi isolada, por isso elas foram consideradas como prováveis agentes etiológicos da infecção. Analisando o perfil dos pacientes constatou-se que todos faziam parte do grupo de risco para infecções oportunistas causadas por SCoN, uma vez que apresentam doenças de base debilitantes ou estavam hospitalizados em unidades de tratamento intensivo.

Outro fator a ser considerado sobre estas cepas é o fato de em alguns pacientes listados na Tabela 3 foram isoladas amostras de SCoN tanto no sangue como na ponta de cateter. Esta é uma característica apresentada em casos de prováveis infecções de corrente sanguínea, onde uma ou mais amostras do mesmo

microrganismo são isoladas da hemocultura, e da ponta do cateter (MERMEL, 2001). Os SCoN, particularmente o *S. epidermidis*, representam os agentes mais frequentemente envolvidos em infecções relacionadas a dispositivos médicos implantáveis como cateteres. Estes dispositivos representam um meio de comunicação direta entre o meio exterior e o sangue do paciente. Dessa forma, estas infecções, geralmente começam com a introdução do agente no sangue, que pode ter origem na pele do paciente, ou até mesmo do ambiente hospitalar durante a inserção do dispositivo (OTTO, 2009).

Em um estudo de caracterização genotípica de microrganismos isolados de ICS relacionada a cateteres, realizado com RN internados na unidade neonatal do Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu durante o período de outubro de 2001 a novembro de 2009, PAZZINI, (2010) evidenciou que 86,7% dos casos onde o mesmo microrganismo foi isolado tanto do sangue como da ponta de cateter, os mesmos foram identificados como SCoN, em particular *S. epidermidis*. Muñoz et al. (2004), também em estudo envolvendo hospitais europeus, relatou que os SCoN foram os principais agentes associados à ICS relacionadas a cateteres, sendo isolados em 34% das infecções.

Já em relação às amostras significativas obtidas a partir de hemoculturas, observamos que apenas um dos pacientes listados na Tabela 3 foi isolada mais de uma amostra de SCoN do mesmo paciente. Nas demais amostras oriundas de hemoculturas significativas, apenas uma amostra de SCoN foi isolada da mesma. Sobre isto, cabe ressaltar que um dos critérios apresentado por alguns autores para diferenciar o SCoN significativo do contaminante é o isolamento do mesmo microrganismo em mais de uma cultura. Porém, em estudo conduzido por Favre et al. (2005) em um hospital terciário de Genebra/Suíça, onde existe um protocolo institucional que preconiza a coleta de duas hemoculturas, além da análise dos dados clínicos. Para a investigação de doenças em pacientes com febre relata que, na presença de uma única hemocultura positiva relacionada a sinais clínicos de sepse, esta deve ser considerada como significativa.

A respeito das bacteremias, muito se tem pesquisado para estabelecer diretrizes que tornem seu diagnóstico mais preciso. Um problema grande é enfrentado em casos onde o isolado em questão é um SCoN, devido ao fato deste microrganismo, mesmo sendo um importante agente de ICS nosocomiais, também ser o principal contaminante em frascos de hemoculturas (KLOSS, 1994). Beekmann

et al. (2005) pesquisaram diferentes algoritmos para determinar o significado clínico de isolados de SCoN de hemoculturas, concluindo que, o algoritmo que apresenta melhor sensibilidade e especificidade é o definido pelo fato de ter ao menos duas hemoculturas positivas para SCoN dentro de 5 dias ou 1 hemocultura positiva com evidências clínicas de infecção. Sabe-se que esta última relação, também foi o evidenciado por Favre et al. (2005), como citado acima.

As cepas de MRSCoN selecionadas neste estudo foram provenientes, principalmente, de pacientes admitidos em duas unidades críticas - UTIs Adulto e neonatal, totalizando 39% das amostras. PA adulto, também foi responsável por um número expressivo de cepas. Estas três unidades juntas somaram 54% (84 de 160) do total de amostras (Tabela 4).

A UTI é uma unidade caracterizada por alta frequência de infecções hospitalares, onde, frequentemente, a bactéria isolada é multirresistente. A imunodepressão do paciente, juntamente com a necessidade de procedimentos invasivos, uso de cateteres e terapia antimicrobiana prolongada torna estes pacientes particularmente vulneráveis (AGVALD-ÖHMAN, 2004, VINCENT, 2003). Desta forma, pacientes internados em UTIs possuem diversos fatores de risco para o desenvolvimento de infecções causadas por SCoN (FITZPATRICK, 2002), uma vez que estes microrganismos são oportunistas. Além disso, as taxas de resistência antimicrobiana apresentada por cepas provenientes de pacientes internados em UTIs geralmente são maiores quando comparadas com amostras oriundas de outros setores (FRIDKIN, 2002; STREIT, 2004).

Em relação às amostras isoladas de pacientes admitidos no PA, é importante relatar que alguns pacientes permanecem nestas unidades apenas para um primeiro atendimento ou no aguardo de um leito em uma unidade específica para receberem o atendimento necessário ao seu quadro clínico. Dessa forma, os pacientes admitidos nestas unidades podem apresentar quadros clínicos mais complicados e sua permanência nestes locais pode ser reflexo da falta de leitos em unidades especializadas de atendimento, como as UTIs.

Quanto aos testes de sensibilidade aos antimicrobianos (Tabelas 5,6 e 7) os resultados deste trabalho mostraram que os isolados de SCoN testados apresentaram um índice considerável de resistência a diferentes antimicrobianos. Dados comparáveis a respeito da suscetibilidade destes microrganismos foi relatada na pesquisa realizada por Gales et al. (2009) onde foi realizado um estudo durante o

período de 2005-2008 em 4 instituições brasileiras participantes do programa SENTRY (Hospital São Paulo/UNIFESP, São Paulo/SP; Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre/RS; Hospital de Base do Distrito Federal, Brasília/DF e Laboratório Santa Luzia, Florianópolis/SC) com isolados de bactérias Gram-positivas.

Em nosso estudo pela difusão do disco as maiores resistências foram apresentadas por eritromicina (84%) e clindamicina (65%) e todas as cepas foram sensíveis à tigeciclina, linezolida e teicoplanina. Pela automação todas as amostras foram sensíveis a vancomicina e as maiores resistências foram: eritromicina (81%), gentamicina (74%) e clindamicina (65%). Já no estudo citado acima, Gales et al. (2009), os testes foram realizados através da técnica de microdiluição em caldo, evidenciando que as maiores sensibilidades foram demonstradas por vancomicina, linezolida e daptomicina e as maiores resistências foram eritromicina (69.3%), clindamicina (50.9%) e ciprofloxacino (55,%).

Eiff et al. (2000) em estudo multicêntrico realizado na Alemanha com *Staphylococcus* spp. isolados de hemoculturas encontrou que entre os isolados de *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* as taxas de resistência à oxacilina, eritromicina, clindamicina, ciprofloxacina, gentamicina e penicilina variou de 40% a 96%.

Sabe-se que Infecções causadas por SCoN podem gerar quadros graves, uma vez que estas bactérias estão associadas a mecanismos de resistência a várias classes de antimicrobianos, em particular à oxacilina (DE PAULIS, 2003). Neste contexto, o tratamento destas infecções se torna uma tarefa difícil, levando ao uso indiscriminado de antibióticos o que pode gerar a seleção de cepas ainda mais resistentes (AGVALD-ÖHMAN, 2004).

Conforme exposto na Tabela 6 (perfis/difusão do disco), as cepas prevalentes, isto é, com o maior número de isolamentos em que foi possível agrupar em perfis de sensibilidade, são as agrupadas nos perfis I (sensível a 4 antibióticos), II (sensível à 5 antibióticos) e III (sensível à 5 antibióticos). Estes 3 perfis prevalentes somaram 59 amostras, 37% do total. O perfil III foi o mais multiresistente, sensível somente à tigeciclina, teicoplanina, linezolida e vancomicina (na metodologia quantitativa).

Adicionalmente verificamos que as cepas pertencentes aos sete perfis de sensibilidade prevalentes, foram provenientes, principalmente, de pacientes internados nas UTIs (UTI/Adulto e UTI/RN) e em unidades hematológicas (CTcriac e

CTMO). Os SCoN estão entre os principais patógenos em infecções hospitalares que acometem pacientes internados em UTIs (FRITZPATRICK, 2002).

Isto posto sabe-se que microrganismos isolados de pacientes em UTIs são mais propensos a ser resistentes aos antibióticos do que aqueles isolados de outras alas do hospital, ou ambulatório, isso ocorre provavelmente pelo emprego de múltiplos antibióticos, e pressão seletiva nestes indivíduos. O problema, no entanto, muitas vezes não é o antimicrobiano em si, mas sim a maneira pela qual eles são utilizados. O tratamento utilizando estes agentes não deveria ter início devido à presença de febre, mas sempre que possível, após a caracterização mais detalhada do processo infeccioso e seu agente. Evidentemente, o diagnóstico de infecção nem sempre é claro em pacientes com múltiplas patologias em UTIs, e o isolamento de microrganismos nestes pacientes pode ser difícil, já que, muitas vezes os mesmo já estão sendo tratados com pelo menos um antibiótico. Clínico e infectologia, com base em dados clínicos e bacteriológicos devem escolher a melhor antibioticoterapia. (VINCENT, 2003).

Os pacientes com câncer são particularmente suscetíveis a infecções nosocomiais devido ao seu sistema imunológico comprometido e à natureza das práticas utilizadas em seu tratamento. Recentemente, um deslocamento do espectro microbiano de pacientes com câncer de Gram-negativos para Gram-positivos tem sido demonstrado (GUINAN, 2003). Ashour e El-Sharif (2007) desenvolveram um estudo para analisar a distribuição e a resistência antimicrobiana de bactérias Gram-positivas isoladas de pacientes com malignidades hematológicas e tumores sólidos no Egito. Neste estudo, os principais patógenos Gram-positivos isolados foram SCoN e *S. aureus*. SCoN foram os principais agentes etiológicos de bacteremias em pacientes com câncer, responsáveis por 66,9% dos casos.

Ainda a respeito da sensibilidade antimicrobiana apresentada pelos isolados de SCoN envolvidos neste estudo, a pesquisa do fenótipo de resistência macrolídeo-lincosamida-estreptogramina B (MLS_B) foi efetuada em todas as amostras utilizando-se o D teste . A resistência induzível a clindamicina foi evidenciada em 10% dos isolados (15 de 160). Perez et al. (2007) analisaram a performance deste teste em SCoN isolados de culturas de sangue obtidos de pacientes internados em um hospital geral de Porto Alegre/RS, encontrando uma taxa de resistência induzível à clindamicina de 18,5% das amostras testadas.

Então, entende-se que os SCoN são patógenos nosocomiais associados a múltiplos mecanismos de resistência antimicrobiana, em particular a resistência à oxacilina (DE PAULIS, 2003). Sabe-se que infecções causadas por isolados multirresistentes representam um problema para os clínicos, uma vez que, poucas opções estão disponíveis para o emprego nestes casos. Nestes casos os glicopeptídeos, em especial a vancomicina, representam o tratamento de escolha (D'AZEVEDO, 2008).

Em relação à sensibilidade aos glicopeptídeos, todos os isolados envolvidos neste estudo mostraram-se sensíveis a vancomicina. Contudo, relatos de cepas de SCoN e *S. aureus* apresentando suscetibilidade reduzida à vancomicina em diversos países, incluindo o Brasil, têm gerado dilemas terapêuticos na prática clínica (NUNES, 2006). Desta forma, a redução do uso deste antimicrobiano tem sido recomendada (NUNES, 2005).

Dessa forma, com este cenário de multirresistência surgiu a necessidade iminente de novas opções terapêuticas que sirvam como uma substituição à vancomicina. As novas opções introduzidas no mercado nos últimos anos que podem ser utilizadas como alternativas à vancomicina foram daptomicina e quinupristina/dalfopristina, e foram aprovadas recentemente pelo FDA para o tratamento de infecções ocasionadas por cocos Gram-positivos multirresistentes. Tigeciclina, oritavancina, linezolida e ceftobiprole, também fazem parte deste novo arsenal terapêutico, porém, ainda não foram aprovados para o tratamento de infecções da corrente sanguínea (MANFREDI, 2010).

Atualmente, um dos principais objetivos para o controle de infecções hospitalares é o uso racional dos antimicrobianos, o que torna a avaliação da acurácia dos métodos fenotípicos usados para determinação do perfil de suscetibilidade essencial para garantir a escolha mais adequada da terapia antimicrobiana (HIDRON, 2008). No entanto, quando se trata de isolados de SCoN a utilização de métodos fenotípicos para a detecção da resistência à oxacilina representa um problema. Isto é devido à emergência de populações de SCoN que apresentam resistência heterogênea à oxacilina, onde apenas uma fração das colônias expressa a resistência dificultando, dessa forma, a interpretação do teste (CAUWELIER, 2004).

Para detecção da heterorresistência, a cefoxitina é considerada um melhor preditor do que a oxacilina porque é um forte indutor da PBP2a. No teste de difusão

do disco, a cefoxitina pode ser utilizada para predizer a presença do gene *mecA* com alto grau de sensibilidade e especificidade quando comparada com a detecção do gene *mecA* pela técnica de PCR (FELTEN, 2002).

A respeito dos métodos fenotípicos utilizados para a detecção da resistência à oxacilina em isolados de SCoN, o mais amplamente utilizado nos laboratórios de bacteriologia é o teste de difusão do disco. As vantagens apresentadas por este teste são seu baixo custo e a facilidade de execução do mesmo na rotina laboratorial, uma vez que pode ser realizado em conjunto com o teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TERASAWA, 2006). O CLSI revisa todos os anos as normas preconizadas para a realização dos testes de detecção de resistência. Para a realização da detecção fenotípica da resistência à oxacilina o CLSI preconiza o uso do disco de cefoxitina, por ser um forte indutor do sistema regulatório *mecA* (FRIGATTO, 2005).

Nesse sentido a expressão fenotípica da resistência poder variar de acordo com as condições do crescimento, como por exemplo, temperatura e meio de cultura, a realização de testes fenotípicos é problemática (FERREIRA, 2003). O gene *mecA* é altamente conservado em cepas de *Staphylococcus* spp. e, portanto, é útil como marcador de resistência à oxacilina. Sua detecção através de métodos moleculares é considerada padrão ouro para detecção de isolados MRS. No entanto, muitos laboratórios em todo mundo não tem a capacidade de uso de técnicas moleculares para detecção de resistência em sua rotina laboratorial (JAIN, 2008).

Em nosso estudo a detecção do gene *mecA* por PCR foi realizada, evidenciando que 79% dos isolados envolvidos no estudo são resistentes à oxacilina e 21% são sensíveis. Estes dados estão de acordo com o encontrado na literatura, onde é relatado que houve um aumento significativo da frequência da resistência à oxacilina em SCoN nas últimas décadas, variando de 50% a 80% dependendo a espécie (D'AZEVEDO, 2008). Sader et al. (2001) relataram uma frequência de 80% de resistência à oxacilina em SCoN isolados de infecções da corrente sanguínea no Brasil. Já Ferreira et al. (2002) em pesquisa envolvendo isolados de diferentes sítios clínicos relataram que 64% dos isolados testados foram resistentes à oxacilina. No estudo de Antunes et al. (2007) com SCoN isolados de hemoculturas, a resistência encontrada na PCR para a detecção do gene *mecA* foi de 88,1%.

Na detecção fenotípica da resistência à oxacilina através do teste de difusão do disco foi evidenciada em 89% dos isolados utilizando o disco de cefoxitina e 94% com o disco de oxacilina. Pela automação, onde foi obtida a CIM da oxacilina (Tabela 7) esta resistência foi detectada em 98% dos isolados. Analisando os índices de resistência à oxacilina obtidos nos testes fenotípicos, pode-se constatar uma superestimação desta resistência, maior na automação e disco de oxacilina, em relação ao padrão ouro. Este fato pode estar associado à presença de outros mecanismos de resistência, a chamada resistência *borderline*. Dessa forma o isolado pode ser resistente através da hiperprodução de β -lactamase, ou pela modificação das PBPs (PBPs 1,2 e 4) (ANTUNES, 2007).

No entanto, utilizando-se o método molecular apenas 79% dos isolados foram classificados como resistentes à oxacilina, evidenciando uma grande diferença na detecção da resistência entre este método, e os métodos fenotípicos utilizados neste estudo. Desta forma, a superestimação da resistência à oxacilina detectada em nossa pesquisa além de ser atribuída a outros mecanismos de resistência, que não o mediado pelo gene *mecA*, também pode ser atribuída a algum erro ocorrido durante a execução da técnica de PCR. Sendo que este pode ter ocorrido em alguma das fases desta técnica, desde a extração do DNA genômico utilizado, até a realização da técnica em si.

Conforme descrito na Tabela 10, durante a análise dos resultados dos testes fenotípicos verificou-se que em alguns isolados ocorreram discrepâncias no resultados dos testes com os discos de oxacilina e cefoxitina e presença do gene *mecA*. Em 7 cepas o disco de cefoxitina classificou o isolado corretamente como sensível quando comparado ao padrão ouro, enquanto o disco de oxacilina foi resistente. Em outras 3 amostras o disco de cefoxitina classificou o isolado como sensível, porém ele portava o gene *mecA*. Neste caso o disco de oxacilina foi resistente. Dois isolados foram resistentes no disco de cefoxitina, gene *mecA* positivo e disco de oxacilina sensível. Um isolado (número 13 da Tabela 10) foi disco de cefoxitina resistente, oxacilina sensível e gene *mecA* negativo.

Frigatto et al. (2005) também, encontraram em seu estudo isolados onde os resultados dos testes fenotípicos foram discrepantes. Caso, também, relatado no estudo de Jain et al. (2008).

Em relação às espécies envolvidas nos casos onde ocorreram discrepâncias nos testes fenotípicos, o isolado identificado com maior frequência foi o *S.*

saprophyticus, seguido por SCoN. Estudos indicam que o desempenho de métodos fenotípicos pode ser prejudicado quando espécies menos comuns são analisadas, entretanto, o mesmo não é uma fato comum quando as amostras envolvidas são cepas mais comumente isoladas como, por exemplo, *S. epidermidis* (HUSSAIN, 2000; CAIERÃO, 2004).

Na análise estatística dos dados referentes aos testes fenotípicos, observou-se que o disco de cefoxitina e o disco de oxacilina apresentaram sensibilidades muito semelhantes, onde os discos de cefoxitina e oxacilina obtiveram 96% e 95% de sensibilidade respectivamente. No entanto, os valores de especificidade para os dois discos foram baixos, 33,3% para o disco de cefoxitina e 11,1 % para o disco de oxacilina. Os VPP e VPN para o disco de cefoxitina foram 85,7% e 64,3% respectivamente. Já para o disco de oxacilina estes valores foram de 81,7% e 33,3%. Diversos estudos nacionais e internacionais foram realizados nos últimos anos com o intuito de avaliar a acurácia dos testes fenotípicos utilizados para a detecção laboratorial da resistência à oxacilina.

Como exemplo destes testes podemos citar o realizado por Perez e D'Azevedo (2008) envolvendo isolados de SCoN provenientes de culturas de sangue obtidas de pacientes admitidos em três hospitais de Porto Alegre/Brasil. Primeiramente foi feita uma avaliação da acurácia de vários testes fenotípicos utilizados para detectar a resistência à oxacilina em SCoN. Os testes avaliados neste estudo foram à diluição em ágar com cefoxitina e difusão do disco utilizando os discos de cefoxitina e oxacilina. Os testes de difusão do disco com oxacilina e cefoxitina apresentaram 98,3% e 100% de acurácia. O de diluição em ágar demonstrou acurácia de 99,4%.

Perazzi et al. (2006) em estudo realizado com a finalidade de avaliar a eficácia dos discos de cefoxitina e oxacilina, bem como do ágar oxacilina, com isolados de SCoN obtidos de um hospital de Buenos Aires, observaram que os testes fenotípicos testados apresentaram sensibilidade de 88% para o disco de oxacilina e 80% para o disco de cefoxitina, com especificidades de 63% e 100% respectivamente. Já o ágar oxacilina apresentou sensibilidade de 90% e especificidade de 95%. Isto posto, concluíram que o disco de cefoxitina e o ágar oxacilina representavam os métodos mais apropriados para a avaliação da resistência à oxacilina em todas as espécies de SCoN.

De acordo com os relatos da literatura, os dados de sensibilidade encontrados em nosso estudo, para ambos os discos, está conforme o descrito por outros autores. Entretanto, os valores de especificidade, tanto para o disco de oxacilina como para o disco de cefoxitina, estão abaixo do descrito pela literatura. Desta forma, os testes fenotípicos realizados em nosso estudo se mostraram sensíveis, porém, não específicos. Como o citado anteriormente, durante a realização da técnica de PCR para detecção do gene *mec*, pode ter ocorrido algum erro de execução. Isso poderia justificar o número elevado de falsos positivos e falsos negativos encontrados nesta pesquisa, o que influi nos valores de sensibilidade, especificidade, VPP e VPN.

Considerados por um longo tempo como contaminantes inofensivos, recentemente, os SCoN emergiram como importantes patógenos nosocomiais capazes de causar várias infecções em humanos (BERNARDI, 2007). Juntamente com a crescente resistência antimicrobiana apresentada por estes patógenos, outro fator importante em sua virulência é a capacidade destes microrganismos em aderir a superfícies de biomateriais e formar biofilmes (VOGEL, 2000).

A este respeito, em nosso estudo além da pesquisa sobre o perfil de sensibilidade dos isolados envolvidos no mesmo, a detecção do gene *icaD*, que é um dos genes envolvidos na formação de biofilme, também foi pesquisada. Dentre os 160 isolados de SCoN envolvidos no estudo, constatamos a provável formação de biofilme em 45% dos isolados. A partir disso, investigamos as principais características das amostras *icaD* positivas. Dentre elas, evidenciamos que entre os isolados definidos como prováveis formadores de biofilme, a principal espécie envolvida foi o *S. epidermidis* (74%). Dado este muito relatado na literatura, onde em estudos como o de Bernardi et al. (2007) onde a formação de biofilme foi pesquisada em amostras de SCoN isoladas de CVC, a espécie mais encontrada nas cepas produtoras de biofilme foi o *S. epidermidis* (37,1%).

Os isolados formadores de biofilme foram oriundos, principalmente, de pacientes internados em UTIs, junto a isto, estas cepas apresentaram significativa resistência, sendo pertencentes principalmente aos perfis mais resistentes deste estudo. Arciola et al. (2002) relataram que a produção de biofilme está associada com reduzida sensibilidade aos agentes antimicrobianos. Este fato pode estar relacionado à possível proteção dada aos microrganismos pela formação de

biofilme. Bernardi et al. (2007) também relataram que os isolados biofilme positivo apresentavam resistência a várias classes de antimicrobianos.

Em relação ao fato dos isolados com provável produção de biofilme serem provenientes principalmente de pacientes internados em UTIs, isso pode ser explicado pelo fato de nestas unidades o uso de materiais implantáveis como cateteres ser uma prática comum, sendo estes, alvo para a colonização de espécies oportunistas como os SCoN.

O aumento na incidência de patógenos nosocomiais multiresistentes tem sido relatado nas últimas décadas. Estes dados preocupam clínicos e a comunidade científica devido à restrição nas opções terapêuticas disponíveis nestas situações. A determinação da suscetibilidade antimicrobiana destes patógenos se torna essencial a fim de otimizar a terapia antimicrobiana, principalmente devido ao aumento da resistência e emergência de microrganismos multirresistentes (PEREZ, 2007).

7 – CONCLUSÕES

- I. *S. epidermidis* foi à espécie mais isolada (62%) entre as cepas selecionadas neste estudo, também seguida por *S. haemolyticus* (19%), SCoN (11%), *S. saprophyticus* (7%) e *S. hominis* subs. *novobiosepticus* (1%).
- II. O material clínico com o maior número de isolados de SCoN foi o sangue (38%).
- III. Na avaliação da significância clínica dos isolados de SCoN envolvidos no estudo, verificou-se que 48% destas amostras foram consideradas o provável agente etiológico da infecção. Nas amostras o principal material clínico de procedência foi o sangue (52%).
- IV. Em relação às unidades de procedência dos isolados, a UTI adulto, UTI/RN e o PA foram responsáveis por 54% dos isolados.
- V. Na técnica de difusão do disco as maiores resistências foram apresentadas por: eritromicina (84%), penicilina (82%) e clindamicina (65%).
- VI. Todos os isolados foram sensíveis a linezolida, teicoplanina e tigeciclina na técnica de difusão do disco.
- VII. 10% dos isolados apresentaram resistência induzível à clindamicina pelo teste D.
- VIII. Os isolados foram separados em 7 perfis de sensibilidade prevalente, sendo que as cepas pertencentes aos perfis I, III e VI apresentaram significativa resistência.
- IX. Através da automação MicroScan®(Siemens) as maiores resistências foram apresentadas por eritromicina (81%), gentamicina (74%) e clindamicina (65%). Todos os isolados foram sensíveis à vancomicina neste método.
- X. Todos os isolados foram sensíveis à vancomicina pela técnica de microdiluição em caldo, sendo a concentração de 2 µg/ml a apresentada pela maioria dos isolados testados.

XI. Na detecção genotípica da resistência à oxacilina através da detecção do gene *mecA* por PCR 79% dos isolados foram resistentes e 21% sensíveis.

XII. A caracterização fenotípica da resistência à oxacilina evidenciou que 89% dos isolados foram resistentes com o uso do disco de cefoxitina e 94% para o disco de oxacilina.

XIII. O método de difusão do disco para oxacilina e cefoxitina utilizado na detecção fenotípica da resistência à oxacilina detectou discrepâncias em 10% dos testes. A espécie envolvida na maioria das cepas onde ocorreu discrepância foi o *S. saprophyticus*.

XIV. Na análise estatística dos resultados obtidos nos testes fenotípicos comparando com o padrão ouro, observamos que os discos de cefoxitina e oxacilina apresentaram sensibilidades bem semelhantes, 96% e 95% respectivamente. Já a especificidade do disco de cefoxitina foi de 33,3% e para o disco de oxacilina foi de 11,1%.

XV. A gene *icaD* foi evidenciado em 45% dos isolados. *S. epidermidis* foi a espécie identificada em 74% das amostras com provável formação de biofilme.

XVI. As cepas com provável formação de biofilme, ou *icaD* positivas, envolvidas neste estudo são provenientes principalmente de hemoculturas, pacientes internados em UTIs e apresentam uma significativa resistência a várias classes de antimicrobianos.

8- REFERÊNCIAS

ABDALLAH, I. M. et al. Polymerase chain reaction identification of coagulase-negative Staphylococci and of strain diversity and spread of *Staphylococcus epidermidis* in a major medical center in Lebanon. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 27, n. 7, p. 781-783, 2006.

AGVALD-ÖHMAN, C.; LUND, B.; EDLUND, C. Multiresistant coagulase-negative staphylococci disseminate frequently between intubated patients in a multidisciplinary intensive care unit. **Critical Care**, v. 8, n. 1, p. R42-R47, 2004.

ALCARÁZ, L. E. et al. Species identification, slime production and oxacillin susceptibility in coagulase-negative Staphylococci isolated from nosocomial specimens. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 45-51, 2003.

ALDEA-MANSILLA, C. et. al. Comparison of phenotypic with genotypic procedures for confirmation of coagulase-negative *Staphylococcus* catheter-related bloodstream infections. **Journal of Clinical Microbiology**, n. 44, v. 10, p. 3529-3532, 2006.

ALEF, K.; NANNIPIERI, P. (ed). **Methods in applied soil microbiology and biochemistry**. 1ª Ed. San Diego: Academic Press, 576 p., 1998.

ANTUNES, A. L. S. et. al. Evaluation of oxacilin and cefoxitin disks for detection of resistance in coagulase negative staphylococci. *Memorial do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 102, n. 6, p. 719-723, 2007.

ARAÚJO, G. L. et al. Commensal isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* are also well equipped to produce biofilm on polystyrene surfaces. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, p. 855-864, 2006.

ARCIOLA, C. R.; BALDASSARRI, L.; MONTANARO, L. Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. **Journal of Clinical Microbiology**, n. 39, v. 6, p. 2151-2156, 2001.

ARCIOLA, C. R. et al. Detection of slime production by means of an optimised Congo red agar plate test based on a colourimetric scale in *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates genotyped for *ica* locus. **Biomaterials**, v. 23, p. 4233-4239, 2002.

ASHOUR, H. M.; EL-SHARIF, A. Microbial spectrum and antibiotic susceptibility profile of Gram-positive aerobic bacteria isolated from cancer patients. **Journal of Clinical Oncology**, v. 25, p. 5763-5769, 2007.

BANNERMAN, T. M. *Staphylococcus*, *Micrococcus* and other catalase-positive cocci that grow aerobically. In: Murray (Ed.). *Manual of Clinical Microbiology*, Eighth Edition. Washington, DC: ASM Press, v. 1, p. 384-404, 2003.

BEEKMANN, S. E.; DIEKEMA, D. J.; DOERN, G. V. Determining the clinical significance of coagulase-negative *Staphylococci* isolated from blood cultures. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 26, n. 6, p. 559-566, 2005.

BEGHETTO, M.; VICTORINO, J.; TEIXEIRA, L. Fatores de risco para infecção relacionada a cateter venoso central. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 14, n. 3, p. 107-113, 2002.

BEN-AMI, R. et al. Erroneous reporting of coagulase-negative *Staphylococci* as *Kocuria* spp. by the Vitek 2 system. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 1448-1450, 2005.

BENZIES, K. M. Advanced maternal age: Are decisions about the timing of child-bearing a failure to understand the risks? **Canadian Medical Association Journal**, v. 178, n. 2, p. 183-184, 2008.

BERNARDI, A.C.A.; PIZZOLITTO, E.L.; PIZZOLITTO, A.C. Detecção da produção de slime por estafilococos coagulase-negativa isolados de cateter venoso central. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.28, n.1, p.57-66, 2007.

BRIGANTE, G. et al. Identification of coagulase-negative *Staphylococci* by using the BD Phoenix system in the low-inoculum mode. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 11, p. 3826-3828, 2008.

BOUZA, E.; BURILLO, A.; MUNOZ, P. Catheter-related infections: diagnosis and intravascular treatment. **Journal of Chemotherapy**, v. 13, p. 224-233, 2001.

BOUZA, E.; BURILLO, A.; MUNÓZ, P. Catheter-related infections: diagnosis and intravascular treatment. **Clinical Microbiology Infection**, v. 8, p. 265-274, 2002.

BOUZA, E. et al. A European perspective on intravascular catheter-related infections: report on the microbiology workload, etiology, and antimicrobial susceptibility (ESGNI-004 study). **Clinical Microbiology**, v. 10, p. 838-842, 2004.

CAIERÃO, J. et al. Evaluation of phenotypic methods for methicillin resistance characterization in coagulase-negative staphylococci (CNS). **Journal of Medical Microbiology**, v. 53, p. 1195-1199, 2004.

CARBON, C. MRSA AND MRSE: is there an answer? **Clinical Microbiology and Infection**, v. 6, p. 17-22, 2000.

CARBONNELLE, E. et. al. Rapid identification of Staphylococci isolated in clinical microbiology laboratories by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. **Journal of Clinical Microbiology**, n. 45, v. 7, p. 2156-2161, 2007.

CAUWELIER, B. et al. Evaluation of a disk diffusion method with cefoxitin (30 µg) for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 23, p. 389-392, 2004.

CERCA, N. et al. Comparative assessment of antibiotic susceptibility of coagulase-negative staphylococci in biofilm versus planktonic culture as assessed by bacterial enumeration or rapid XTT colorimetry. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, p. 331-336, 2005.

CERI, H. et al. The calgary biofilm device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 6, p. 1771-1776, 1999.

CHAMBERS, H. F. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, n. 4, p. 781-791, 1997.

CHAMBERS, H. F. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, p. 178-182, 2001.

CHAVES, F. et al. Nosocomial spread of *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus* strain causing sepsis in a neonatal intensive care unit. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 9, p. 4877-4879, 2005.

CRHISTENSEN, G. D. et al. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. **Infection and Immunity**, v.37, n. 1, p. 318-326, 1982.

CHRISTENSEN, G. D. et al. Adherence of coagulase-negative *Staphylococci* to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of *Staphylococci* to medical devices. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 22, n. 6, p. 996-1006, 1985.

CHRISTENSEN, G. D.; BALDASSARI, L.; SIMPSON, W. A. Colonization of medical devices by coagulase-negative staphylococci. In: BISNO, A. L.; WALDVOGEL, F. A. Infection associated with indwelling medical devices. 2^a . ed. Washington: ASM Press, p. 45-78, 1994.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI – formerly National Committee for Clinical Laboratory Standards – NCCLS).. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; seventeenth Informational Supplement.** M100-S15. Wayne, 2005.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI – formerly National Committee for Clinical Laboratory Standards – NCCLS).. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; seventeenth Informational Supplement.** M100-S17, M2A9, v.27, n.1, 2007.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE 2008. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 18th informational supplement. CLSI document M100-S18. CLSI, Wayne, PA.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE 2009. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 19th informational supplement. CLSI document M100-S19. CLSI, Wayne, PA.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE 2010. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 20th informational supplement. CLSI document M100-S20. CLSI, Wayne, PA.

CLSI (2003). M7-A6. Methods for dilution antimicrobial susceptibility testing for bacteria that grow aerobically; Approved standard. Wayne, Pa. USA, Clinical and Laboratory Standards Institute - National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS).

CONLON, K. M.; HUMPHREYS, H.; O'GARA, J. P. *icaR* Encodes a transcriptional repressor involved in environmental regulation of *ica* operon expression and biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis*. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 16, p. 4400-4408, 2002.

CORDEIRO, D.N.G. Significância clínica da presença de *Staphylococcus* coagulase-negativo isolados de recém-nascidos de uma Unidade de Terapia Intensiva Neonatal em Brasília-DF. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade de Brasília, 2007.

COUTO, I. et. al. Identification of clinical *Staphylococcal* isolates from humans by internal transcribed spacer PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, n. 39, v. 9, p. 3099-3103, 2001.

CUNHA, M. L. R. S.; SINZATO, Y. K.; SILVEIRA, L. V. A. Comparison of methods for the identification of coagulase-negative *Staphylococci*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 8, p. 855-860, 2004.

D'AZEVEDO, P. A. et al. Oxacilin-resistant Coagulase-Negative *Staphylococci* (CONS) bacteremia in a general hospital at São Paulo city, Brasil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 631-635, 2008.

D'AZEVEDO, P. A. et al. Evaluation of the automated system Vitek2 for identification and antimicrobial susceptibility testing of Brazilian Gram-positive cocci strains. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 13, n. 2, p. 107-110, 2009.

DE GIUSTI, M. et. al. Phenotypic detection of nosocomial *mecA*-positive coagulase-negative staphylococci from neonates. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 44, p. 351-358, 1999.

DELIALIOGLU, N. Inducible clindamycin resistance in *Staphylococci* from clinical samples. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 58, p. 104-106, 2005.

DE PAULIS, A. et. al. Five-test simple scheme for species-level identification of clinically significant coagulase-negative staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 3, p. 1219-1224, 2003.

DIEKEMA, D. J. et al. Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific Region for the SENTRY antimicrobial surveillance program, 1997-1999. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, p.114-132, 2001.

DONLAN, R. M. Biofilms: Microbial life on surfaces. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 9, p. 881-890, 2002.

EIFF, C. von; HEILMANN, C.; PETERS, G. New aspects in the molecular basis of polymer-associated infections due to staphylococci. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 18, p. 843-846, 1999.

EIFF, C. von; et al. Nationwide German multicenter study on prevalence of antibiotic resistance in Staphylococcal bloodstream isolates and comparative in vitro activities of Quinupristin-Dalfopristin. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 8, p. 2819-2823, 2000.

EIFF, C. von; PROCTOR, R. A.; PETERS, G. Coagulase-negative staphylococci. Pathogens have major role in nosocomial infections. **Postgrad Med**, v. 110, p. 63-76, 2001.

EIFF, C. von; PETERS, G.; HEILMANN, C. Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. **Lancet Infectious Diseases**, v. 2, p. 677-685, 2002.

EIFF, C. von. et al. Modern strategies in the prevention of implant-associated infections. **The International Journal of Artificial Organs**. v. 28, n. 11, p. 1146-1156, 2005.

FALCONE, M. F. et al. *Staphylococcus haemolyticus* endocarditis: clinical and microbiologic analysis of 4 cases. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v. 47, p. 325-331, 2007.

FAVRE, B. et al. Nosocomial bacteremia: clinical significance of a single blood culture positive for coagulase-negative Staphylococci. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 26, n. 8, p. 697-702, 2005.

FELTEN, A. et al. Evaluation of three techniques for detection of low-level methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a disk diffusion method with cefoxitin and moxalactam, the Vitek 2 system, and the MRSA-screen latex agglutination test. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 8, p. 2766-2771, 2002.

FERREIRA, R. B. R. et al. Simultaneous detection of the *mecA* and *ile-S-2* genes in coagulase-negative staphylococci isolated from Brazilian hospitals by multiplex PCR. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v. 42, p. 205-212, 2002.

FERREIRA, R. B. R. et al. Coagulase-negative Staphylococci: comparison of phenotypic and genotypic oxacillin susceptibility tests and evaluation of the Agar screening test by using different concentrations of oxacillin. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 8, p. 3609-3614, 2003.

FIEBELKORN, K. R. et al. Practical disk diffusion method for detection of inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* and Coagulase-Negative *Staphylococcus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 10, p. 4740-4744, 2003.

FITZPATRICK, F. et. al. Environmental regulation of biofilm formation in intensive care units isolates of *Staphylococcus epidermidis*. **Journal of Hospital Infection**, v. 42, p. 212-218, 2002.

FLUIT, A. C.; VISSER, M. R.; SCHMITZ, F. Molecular detection of antimicrobial resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 4, p. 836-871, 2001.

FREDHEIN, E. G. A. et al. Biofilm formation by *Staphylococcus haemolyticus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 1172-1180, 2009.

FRIDKIN, S. K.; HILL, H. A.; VOLKOVA, N. V. The intensive care antimicrobial resistance epidemiology (CARE) project hospitals. Temporal change in prevalence of antimicrobial resistance in 23 U.S. hospitals. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, p. 697-701, 2002.

FRIGATTO, E. A. M. et al. Is the cefoxitin disk test reliable enough to detect oxacillin resistance in coagulase-negative staphylococci? **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 2028-2029, 2005.

FUJITA, S. I. et al. Rapid identification of Staphylococcal strains from positive-testing blood culture bottles by internal transcribed spacer PCR followed by microchip gel electrophoresis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 1149-1157, 2005.

GARCIA, P. et al. Coagulase-negative staphylococci: clinical, microbiological and molecular features to predict true bacteremia. **Journal of Medical Microbiology**, v. 53, p. 67-72, 2004.

GALES, A. C. et al. Antimicrobial susceptibility of Gram-positive bacteria isolated in Brazilian hospitals participating in the SENTRY program (2005-2008). **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 13, n. 2, p. 90-98, 2009.

GILBERT, D. N. et al. The Sanford: Guia para terapia antimicrobiana. 33^o edição, Rio de Janeiro. EPUC, 2003.

GILL, S. R. et al. 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 *Staphylococcus epidermidis* strain. **Journal of Bacteriology**, v.187, n. 7, p. 2426-2438, 2005.

GÖTZ, F. *Staphylococcus* and biofilms. **Molecular Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 1367-1378, 2002.

GRECO, C. et. al. Assessment of biofilm-forming ability of coagulase-negative staphylococci isolated from contaminated platelet preparations in Canada. **Transfusion**, v. 48, p. 969-977, 2008.

GUINAN, J. L.; McGUICKIN, M.; NOWELL, P. C. Management of health-care-associated infections in the oncology patient. **Oncology**, v. 17, p. 415-420, 423-426, 2003.

HANBERGER, H. et al. Surveillance of antibiotic resistance in European ICUs. **Journal of Hospital Infection**, v. 48, p. 161-176, 2001.

HANNA, H. et al. Comparative in vitro efficacies and antimicrobial durabilities of novel antimicrobial central venous catheters. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 10, p. 3283-3288, 2006.

HEIKENS, E. et al. Comparison of genotypic and phenotypic methods for species-level identification of clinical isolates of Coagulase-Negative Staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.5, p.2286-2290, 2005.

HIDRON, A. I. et al. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the national healthcare safety network at the centers for disease control and prevention, 2006-2007. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 29, p. 996-1011, 2008.

HIRAMATSU, K. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 40, p. 135-136, 1997.

HIRAMATSU, K.; KATAYAMA, Y.; ITO, T. Molecular genetics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 292, p. 67-74, 2002.

HUSSAIN, Z. et al. Correlation of oxacillin MIC with *mecA* gene carriage in coagulase-negative staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 38, p. 752-754, 2000.

HUSSAIN, Z. et al. Detection of methicillin resistance in primary blood culture isolates of coagulase-negative staphylococci by PCR, slide agglutination, disk diffusion, and a commercial method. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 40, n. 6, p. 2251-2253, 2002.

JAIN, A.; AGARWAL, A.; VERMA, R. K. Cefoxitin disc diffusion test for detection of methicillin-resistant staphylococci. **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, p. 957-961, 2008.

KEARNS, A. M. et. al. Rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococci* by multiplex PCR. **Journal of Hospital Infection**, v. 43, p. 33-37, 1999.

KIM, M. et al. Comparison of the MicroScan, Vitek 2, and Crystal GP with 16S rRNA sequencing and MicroSeq 500 v2.0 analysis for coagulase-negative *Staphylococci*. **BMC Microbiology**, v. 8, p. 1-7, 2008.

KLINGENBERG, C. Persistent strains of coagulase-negative staphylococci in a neonatal intensive care unit: virulence factors and invasiveness. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 13, p. 1100-1111, 2007.

KLOOS, W. E.; SCHLEIFER, K. H. Simplified scheme for routine identification of human *Staphylococcus* Species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 1, n. 1, p. 82-88, 1975.

KLOOS, W. E.; BANNERMAN, T. L. Update on clinical significance of Coagulase-Negative Staphylococci . **Clinical Microbiology Reviews**, v. 7, n. 1, p. 117-140, 1994.

KLOOS, W. E.; BANNERMAN, T. L. *Staphylococcus* and *Micrococcus* In: Murray, P.R. et al. Manual of Clinical Microbiology, 7^o edição, ASM Press, Washington DC, 1999.

KOKSAL, F.; YASAR, H.; SAMASTI, M. Antibiotic resistance patterns of coagulase-negative staphylococcus strains isolated from blood culture of septicemic patients in Turkey. **Microbiological Research**, v. 164, p. 404-410, 2009.

KWAKMAN, P. H. S. et al. Treatment and prevention of *Staphylococcus epidermidis* experimental biomaterial-associated infection by bactericidal peptide 2. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n.12, p. 3977-3983, 2006.

LAYER, F. et al. Comparative study using various methods for identification of *Staphylococcus* species in clinical specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 8, p. 2824-2830, 2006.

LARGURA, A. et al. Análise crítica da pseudosepticemia e falso negativo: valor diagnóstico das hemoculturas. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 37, n. 1, p. 11-14, 2005.

LEÃO, L. S. N. O. et. al. Fenotipagem de bactérias isoladas em hemoculturas de pacientes críticos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 5, p. 537-540, 2007.

LYYTIKÄINEN, O. et. al. Increased resistance among *Staphylococcus epidermidis* isolates in a large teaching hospital over a 12-year period. . **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 15, n. 2, p. 133-138, 1996.

LYYTIKÄINEN, O. et. al. Nosocomial bloodstream infections in finnish hospitals during 1999-2000. **Clinical Infectious Diseases**, v. 35, p.14-19, 2002.

LOWY, F. D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 111, p. 1265-1273, 2003.

MACHADO, A. B. M. P. et al. Distribution of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) types I, II, III and IV in coagulase-negative staphylococci from

patients attending a tertiary hospital in southern Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, p. 1328-1333, 2007.

MACK, D. et al. The intercellular adhesion involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. **Journal of Bacteriology**, v. 178, p. 175-183, 1996.

MACK, D. et al. Essential functional role of the polysaccharide intercellular adhesion of *Staphylococcus epidermidis* in hemagglutination. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 2, p. 1004-1008, 1999.

MACK, D. et al. Identification of three essential regulatory gene loci governing expression of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesion and biofilm formation. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 7, p. 3799-3807, 2000.

MACK, D. et al. Differential expression of methicillin resistance by different biofilm-negative *Staphylococcus epidermidis* transposon mutant classes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 1, p. 178-183, 2002.

MACK, D. et al. Mechanisms of biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*: functional molecules, regulatory circuits, and adaptive responses. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 294, p. 203-212, 2004.

MACK, D. et al. Biofilm formation in medical device-related infection. **The International Journal of Artificial Organs**, v. 29, n. 4, p. 343-359, 2006.

MAKI, D. G.; WEISE, C. P. E.; SARAFIN, H. W. A semiquantitative culture method for identifying intravenous catheter infection. **The New England Journal of Medicine**, v. 296, n.23, p. 1305-1309, 1977.

MANFREDI, R.; SABBATANI, S. Novel pharmaceutical molecules against emerging resistant gram-positive cocci. **Brazilian Journal of Infection Diseases**, v. 14, n. 1, p. 96-108, 2010.

MARSHAL, S. A. et al. *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci from blood stream infection: frequency of occurrence, antimicrobial susceptibility, and molecular (*mecA*) characterization in the SCOPE program. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v. 30, p. 205-214, 1998.

MENDES, E.R. et al. Ability of Latin America laboratories to detect antimicrobial resistance patterns: experience of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2000). **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 7, p. 282-289, 2003.

MENEZES, E. A. et al. Caracterização bacteriana em culturas de ponta de cateter no hospital geral de Fortaleza. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 34, n. 3, p. 151-154, 2002.

MENICHETTI, F. Current and emerging serious Gram-positive infections. **Clinical Microbiology and Infection**, v.11, p. 22-28, 2005.

MERMEL, L. A. Guidelines for the management of intravascular catheter-related infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, p. 1249-1272, 2001.

MICHELIM, L. et. al. Pathogenicity factors and antimicrobial resistance of *Staphylococcus epidermidis* associated with nosocomial infections occurring in intensive care units. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 17-23, 2005.

MIMICA, M. J., MENDES, C. M. F. Diagnóstico laboratorial da resistência à oxacilina em *Staphylococcus aureus*. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, p. 399-406, 2007.

MIRRET, S. et al. Relevance of the number of positive bottles in determining clinical significance of the Coagulase-Negative Staphylococci in blood cultures. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 9, p. 3279-3281, 2001.

MORALES, M. et al. Biofilm: the microbial “bunker” for intravascular catheter-related infection. **Support Care Cancer**, v. 12, p. 701-707, 2004.

MOUSSALLEM, B. C., KURY, C. M. H., MEDINA-ACOSTA, E. Detecção dos genes *mecA* e *femA*, marcadores moleculares de resistência a meticilina, em *Staphylococcus* spp. Isolados de pacientes admitidos em uma unidade neonatal de tratamento intensivo. **Revista Científica da Faculdade de medicina de Campos**, v. 2, p. 02-09, 2007.

MUNSON, E. L. et. al. Detection and treatment of bloodstream infection: laboratory reporting and antimicrobial management. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 495-497, 2003.

MUÑOZ, P. et al. Clinical-epidemiological characteristics and outcome of patients with catheter-related bloodstream infections in Europe (ESGNI-006 Study). **Clinical Microbiology and Infection**, v. 10, p. 843-845, 2004.

National Nosocomial Infections Surveillance System - NNIS. American Journal of Infection Control. v. 31, p. 481-498, 2003.

NATOLI, S. et al. Characterization of coagulase-negative staphylococcal isolates from blood with reduced susceptibility to glycopeptides and therapeutic options. **BMC Infectious Diseases**, v. 9, n. 83, 2009.

NEELY, A. N.; MALEY, M. Survival of Enterococci and Staphylococci on hospital fabrics and plastic. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 724-726, 2000.

NUNES, A. P. F. et al. Genomic characterization of oxacillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus* isolated from Brazilian medical centres. **Journal of Hospital Infection**, v. 59, p. 19-26, 2005.

NUNES, A. P. F. et al. Heterogeneous resistance to vancomycin in *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus warneri* clinical strains: characterization of glycopeptide susceptibility profiles and cell wall thickening. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 27, p. 307-315, 2006.

O'GARA, J.; HUMPHREYS, H. *Staphylococcus epidermidis* biofilms: importance and implications. **Journal of Medical Microbiology**, v. 50, p. 582-587, 2001.

ORSI, G. B. et al. Hospital-acquired, laboratory-confirmed bloodstream infection: increased hospital stay and direct costs. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 23, p. 190-197, 2002.

OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis* – the “accidental” pathogen. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 8, p. 555-567, 2009.

PALAVENCINO, E. Métodos recomendados para el estudio de susceptibilidad en *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulasa* negative y *Staphylococcus saprophyticus*: Nuevos puentes de corte e interpretación de resultados. **Revista Chilena de Infectología**, v. 19, p. S 119-124, 2002.

PALAZZO, I. C.V. et al. *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus* strains causing nosocomial bloodstream infection in Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 62, p. 1222-1226, 2008.

PATRICK, C. C. Coagulase-negative staphylococci: pathogens with increasing clinical significance. **The Journal of Pediatrics**, v. 16, n. 4, p. 497-507, 1990.

PAZZINI, L. T. Caracterização genotípica de microrganismos isolados de infecções da corrente sanguínea relacionadas a cateteres em recém-nascidos. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, São Paulo, 2010.

PERAZZI, B. et. al. Accuracy of cefoxitin disk testing for characterization of oxacillin resistance mediated by penicillin-binding protein 2a in Coagulase-Negative Staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 10, p. 3634-3639, 2006.

PEREZ, L. R. R. et al. Use of the D test method to detect inducible clindamycin resistance in coagulase negative staphylococci (CoNS). **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.11, n. 2, p. 186-188, 2007.

PEREZ, L. R. R.; d'AZEVEDO, P. A. Evaluation of the accuracy of various phenotypic testes to detect oxacillin resistance in Coagulase-Negative Staphylococci. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 12, n. 3, p. 210-212, 2008.

POYART, C.; et al. Rapid and accurate species-level identification of Coagulase-Negative Staphylococci by using the *sodA* gene as a target. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 12, p. 4296-4301, 2001.

PREDARI, S. C.; LIGOZZI, M.; FONTANA, R. Genotypic identification of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci by polymerase chain reaction. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 35, p. 2568-2573, 1991.

RACHID, S. et al. Effect of subinhibitory antibiotic concentrations on polysaccharide intercellular adhesion expression in biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 12, p. 3357-3363, 2000.

REIMER, L. G.; WILSON, M. L.; WEINSTEIN, M. P. Update on detection of bacteremia and fungemia. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, n. 3, p. 444-465, 1997.

ROGERS, K. L.; FEY, P. D.; RUPP, M. E. Coagulase-negative Staphylococcal infections. **Infectious Diseases Clinics of North America**, v. 23, p. 73-98, 2009.

ROHDE, H. et al. Pathogenesis of staphylococcal device-related infections: from basic science to new diagnostic, therapeutic and prophylactic approaches. **Reviews in Medical Microbiology**, v. 17, p. 45-54, 2006.

ROHDE, H. et al. Structure, function and contribution of polysaccharide intercellular adhesin (PIA) to *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation and pathogenesis of biomaterial-associated infections. **European Journal of Cell Biology**, v. 89, p. 103-111, 2010.

ROSSI, F.; ANDREAZZI, D. B. Resistência bacteriana – interpretando o antibiograma. 1º Edição, São Paulo. Atheneu, 2004.

RUPP, M. E.; ARCHER, G. L. Coagulase-negative staphylococci: pathogens associated with medical progress. **Clinical Infectious Diseases**, n. 19, p. 231-245, 1994.

SADER, H. S. et al. Results of the 1997 SENTRY antimicrobial surveillance program in three Brazilian medical centers. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.3, n. 21, p. 63-79, 1999.

SADER, H. S. et al. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY antimicrobial surveillance program. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 5, n. 4, p. 200-214, 2001.

SADER, H. S. et al. SENTRY Antimicrobial surveillance program report: Latin American and Brazilian results for 1997 through 2001. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 8, p. 25-79, 2004.

SADER, H. S. et al. Antimicrobial activity of tigecycline tested against nosocomial bacterial pathogens from patients hospitalized in the intensive care unit. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 52, p. 203-208, 2005.

SAMPATH, L. A. et al. In vitro and in vivo efficacy of catheters impregnated with antiseptics or antibiotic: evaluation of the risk of bacterial resistance to the antimicrobials in the catheters. **Journal of Hospital Infection**, v. 22, n. 10, p. 640-646, 2001.

SCHOENFELDER, S.M.K. et al. Success through diversity – How *Staphylococcus epidermidis* establishes as a nosocomial pathogen. **International Journal of Medical Microbiology**. 2010 [in press].

SILVA, G. D. I. et al. The ica operon and biofilm production in coagulase-negative staphylococci associated with carriage and disease in a neonatal intensive care unit. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 382-388, 2002.

SPENCER, R. C. Novel methods for the prevention of infection of intravascular devices. **Journal of Hospital Infection**, n. 43, p. 127-135, 1999.

STEPANOVIC, S. et. al. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiology Methods**, v. 40, p. 175-179, 2000.

STEPANOVIC, S. Influence of dynamic conditions on biofilm formation by Staphylococci **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 20, p. 502-504, 2001.

STEVENS, D. The role of vancomycin in the treatment paradigm. **Clinical Infectious Diseases**, v. 42, p. S51-S57, 2006.

STEWART, P. S.; CONSTERTON, J. W. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. **Lancet**, v. 358, p. 135-138, 2001.

STORTI, A. et al. Biofilme detectado em ponta de cateter venoso central por cultura usando método quantitativo. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 39, n. 3, p. 183-187, 2007.

STREIT, J. M. et al. Assessment of pathogen occurrences and resistance profiles among infected patients in the intensive care unit: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (North America, 2001). **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 24, p. 111-118, 2004.

TAN, T. Y.; NG, S. Y.; NG, W. X. Clinical significance of coagulase-negative staphylococci recovered from nonsterile sites. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 9, p. 3413-3414, 2006.

TENOVER, F. C. et al. Characterization of Staphylococci with reduced susceptibilities to vancomycin and other glycopeptides. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 4, p. 1020-1027, 1998.

TENOVER, F. C. et al. Methods for improved detection of oxacillin resistance in Coagulase-Negative Staphylococci: Results of a multicenter study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 12, p. 4051-4058, 1999.

TERASAWA, L. B. Caracterização da resistência à oxacilina em estafilococos coagulase negativa isolados no hospital de clínicas de Curitiba-Paraná. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, 2006.

THYLEFORS, J. D.; HARBARTH, S.; PITTET, D. Increasing bacteremia due to coagulase-negative staphylococci: fiction or reality? **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 19, n. 8, p. 581-589, 1998.

TYGACIL PACKAGE INSERT. Wyeth Pharmaceuticals Inc.; Philadelphia, PA, USA, June 2005.

VEENSTRA, G. C. et al. Ultrastructural organization and regulation of a biomaterial adhesion of *Staphylococcus epidermidis*. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 2, p. 537-541, 1996.

VIALE, G.; STEFANI, S. Vascular catheter-associated infections: a microbiological and therapeutic update. **Journal of Chemotherapy**, v. 18, p. 235-249, 2006.

VINCENT, J.L. Nosocomial infections in adult intensive-care units. **Lancet**, v. 361, p. 2068-2077, 2003.

VOGEL, L. et al. Biofilm production by *Staphylococcus epidermidis* isolates associated with catheter related bacteremia. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v. 36, p. 139-141, 2000.

VUONG, C.; OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis* infections. **Microbes and Infection**, v. 4, p. 481-489, 2002.

VUONG, C. et al. Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) protects *Staphylococcus epidermidis* against major components of the human innate immune system. **Cellular Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 269-275, 2004.

WEINSTEIN, M. P. et al. Clinical importance of identifying Coagulase-Negative Staphylococci isolated from blood cultures: evaluation of MicroScan rapid and dried overnight Gram-Positive panels versus a conventional reference method. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 7, p. 2089-2092, 1998.

WEINSTEIN, M. P. Blood culture contamination: persisting problems. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 6, p. 2275-2278, 2003.

WIDERSTRÖM, M. et. al. Molecular epidemiology of *Staphylococcus saprophyticus* isolated from women with uncomplicated community-acquired urinary. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 5, p. 1561-1564, 2007.

WISPLINGHOFF, H. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. **Clinical Infectious Diseases**, v. 39, p. 309-317, 2004.

WOODS, W. et al. Oxacillin susceptibility testing of coagulase-negative staphylococci using the disk diffusion method and the Vitek GPS-105 card. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v. 42, p. 291-294, 2002.

ZHANG, Y. Q. et al. Genome-based analysis of virulence genes in a *Staphylococcus epidermidis* strain (ATCC 12228). **Molecular Microbiology**, v. 49, n. 6, p. 1577-1593, 2003.

ZIEBUHR, W. et al. Detection of the intercellular adhesion gene cluster (*ica*) and phase variation in *S. epidermidis* blood culture strain and mucosal isolates. **Infection and Immunity**, v.65, p. 890-896, 1997.

ZIEBUHR, W. et al. Nosocomial infections by *Staphylococcus epidermidis*: how a commensal bacterium turns into a pathogen. **International Journal of Antimicrobial Agents**, s. 28, p. S14-S20, 2006.

9 – ANEXOS

9.1 Artigo aceito pela Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical

O artigo em anexo está de acordo com as normas indicadas pela revista a qual foi submetido o artigo.

Bacteremias por *Staphylococcus* coagulase negativos (SCN) oxacilina resistentes em um hospital escola na cidade de Santa Maria, Brasil

Oxacillin-Resistant Coagulase-Negative *Staphylococci* (CONS) bacteremia in a teaching hospital at Santa Maria city, Brazil

Bacteremias por SCN oxacilina resistentes em um hospital escola

Fabiane Rigatti¹; Máisa Kraulich Tizotti¹; Vanessa Oliveira Domingues¹; Rosiéli Martini¹; Letícia E. Mayer¹; Fábio Teixeira Khun²; Chirles Araújo de França³; Mateus Matiuzzi da Costa³, Rosmari Hörner⁴

- 1- Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.
- 2- Curso de Farmácia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.
- 3- Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, PE.
- 4- Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.

Endereço para correspondência: Prof. Rosmari Hörner. Laboratório de Bacteriologia/Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas/Universidade Federal de Santa Maria/Prédio 26/Sala 1201/Campus UFSM, 97105-900 Santa Maria, RS. Telefax: (55) 3220 8751. E-mail : rosmari.ufsm@gmail.com

RESUMO

Introdução: Neste estudo objetivou-se caracterizar a prevalência e o perfil de suscetibilidade de cepas de SCN resistentes à oxacilina isoladas de culturas de sangue, em um hospital escola, localizado na cidade de Santa Maria. Além disso, buscou-se comparar ao teste genotípico de referência, diferentes metodologias fenotípicas para a caracterização da resistência mediada pelo gene *mecA*. **Métodos:** Após identificação (MicroScan – Siemens), os isolados foram submetidos a testes de sensibilidade antimicrobiana a partir da difusão do disco e automação (MicroScan – Siemens). A presença do gene *mecA* foi evidenciada através da técnica molecular de reação em cadeia da polimerase (PCR). **Resultados:** a espécie prevalente foi *Staphylococcus epidermidis* (67%). O gene *mecA* foi detectado em 90% das cepas e conforme análise dos perfis de sensibilidade, observou-se um índice elevado de resistência a várias classes de antimicrobianos. Contudo, todos os isolados mostraram-se uniformemente sensíveis à vancomicina e tigeciclina. O disco de cefoxitina foi a metodologia fenotípica que melhor correlacionou-se com o padrão ouro. **Conclusões:** a análise da significância clínica de SCN isolados de hemoculturas e a detecção precisa da resistência à oxacilina, representam fatores decisivos para a instituição correta da antibioticoterapia. Apesar da vancomicina constituir o tratamento usual na maioria dos hospitais brasileiros, tem a redução de seu emprego recomendada.

Palavras Chaves: bacteremia, infecção hospitalar, *Staphylococcus* coagulase negativos, gene *mecA*, cefoxitina.

ABSTRACT

Introduction: This study we sought to characterize the prevalence and susceptibility profile of Oxacillin-Resistant CONS strains isolated from blood cultures in a teaching hospital, located in Santa Maria. In addition, we sought to compare the genotypic testing of reference, different methodologies for the phenotypic characterization of oxacillin resistance mediated by *mecA*. **Methods:** After identification (MicroScan - Siemens), the isolates were tested for antimicrobial sensitivity from the disk diffusion and Automation (MicroScan - Siemens). The presence of *mecA* gene was identified by molecular technique of polymerase chain reaction (PCR). **Results:** The most prevalent species was *Staphylococcus epidermidis* (n = 40/67%). The *mecA* gene was detected in (n = 54/90%) strains, and as the profiles of sensitivity analysis, we observed a high rate of resistance to multiple classes of antimicrobials. However, all isolates were uniformly sensitive to vancomycin and tigecycline. The cefoxitin disc was the phenotypic methodology that best correlated with the gold standard. **Conclusions:**

Keywords: bacteremia, nosocomial infection, Coagulase-Negative *Staphylococci*, *mecA* gene, cefoxitin.

INTRODUÇÃO:

As infecções da corrente sanguínea (ICS) estão entre as mais frequentes no ambiente hospitalar e representam uma grave complicação em pacientes críticos¹, neonatos e imunocomprometidos^{2,3,4}, estando associadas a elevadas taxas de mortalidade e prolongamento do tempo de hospitalização^{1,2,3}.

Durante as décadas de 60 e 70, microrganismos Gram-negativos foram mais frequentemente isolados de pacientes com ICS. Desde então, devido ao incremento no uso de dispositivos médicos invasivos e maior número de pacientes imunodeprimidos hospitalizados, os cocos Gram-positivos, especialmente os *Staphylococcus* coagulase negativos (SCN), têm emergido como um dos principais agentes etiológicos destas infecções^{3,5}.

No entanto, os SCN também constituem um dos contaminantes mais comuns em hemoculturas. Por este motivo, torna-se necessária a utilização de diferentes critérios clínicos e laboratoriais a fim de distinguir contaminação de bacteremias clinicamente significativas^{1,6,7}.

De acordo com dados americanos, os SCN são responsáveis por 20,2% das ICS⁸. Já no Brasil, este percentual varia entre 10% e 20%, sendo que, 70% a 90% dos isolados apresentam resistência à oxacilina^{9,10}. Esta resistência está relacionada à presença do gene cromossômico *mecA*, o qual codifica a produção de proteínas ligadoras de penicilina (PBP) alteradas, denominadas PBP2a ou PBP2', com baixa afinidade por antibióticos β -lactâmicos^{4,11}.

Nos últimos anos, o aumento substancial nos índices de resistência à oxacilina em SCN, tem gerado maior preocupação acerca de diagnósticos laboratoriais precisos, visto que, são fundamentais para orientar a terapêutica e promover o uso racional de antimicrobianos glicopeptídeos¹².

Em decorrência disso, diferentes metodologias fenotípicas têm sido empregadas para caracterizar a resistência à oxacilina em SCN. Contudo, a emergência de cepas com resistência heterogênea dificulta a interpretação dos testes de difusão do disco na rotina laboratorial^{9,13,14}.

A partir de 2004, o *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI) passou a recomendar o uso do disco de cefoxitina (30µg) em conjunto com o disco de oxacilina (1µg) para a detecção da resistência à oxacilina mediada pelo gene *mecA*. Em 2009, o CLSI excluiu o disco de oxacilina na previsão da resistência dos SCN frente aos agentes β-lactâmicos¹⁵.

A detecção do gene *mecA* por métodos moleculares é considerada *gold standard* para avaliação qualitativa da resistência à oxacilina. No entanto, estes métodos ainda encontram-se pouco difundidos na rotina diagnóstica^{9,16}.

O objetivo deste estudo foi avaliar as bacteremias e os perfis de sensibilidade de SCN isolados nas hemoculturas de pacientes admitidos no Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM), durante o período de janeiro de 2008 a janeiro de 2009. Além disso, buscou-se comparar metodologias fenotípicas com o teste genotípico de referência na detecção da resistência à oxacilina mediada pelo gene *mecA*.

MATERIAIS E MÉTODOS:

Isolamento e Identificação. Durante o período de janeiro de 2008 a janeiro de 2009 foram selecionadas, de forma consecutiva, 60 amostras de SCN isolados de hemoculturas efetuadas no sistema automatizado Bactec 9240® (Becton Dickinson, Sparks, MD), de pacientes atendidos no HUSM. A identificação dessas cepas foi realizada utilizando-se o sistema automatizado MicroScan® (Siemens). Na sequência, as cepas foram estocadas a – 20 °C em caldo simples com 15% de glicerol.

Crêterios de inclusão. Foram selecionadas as cepas provenientes de hemoculturas monomicrobianas e que apresentavam resistência   oxacilina em pelo menos um dos testes fenotípicos realizados previamente (automa o e/ou difusão do disco).

Significância clínica dos isolados. A análise foi efetuada com base nos prontuários médicos dos pacientes. Foram avaliadas variáveis como: aspectos clínicos, doenças de base, resultados de testes laboratoriais, terapia antimicrobiana empregada, tempo de internaq o e fatores de risco relacionados   ICS (imunossupressão e uso de dispositivos médicos invasivos).

Testes de sensibilidade. Os isolados foram testados para suscetibilidade   oxacilina, eritromicina, ciprofloxacina, clindamicina, rifampicina, levofloxacina, gentamicina, cefoxitina e sulfametoxazol/trimetoprima pelo método de difusão do disco em  gar Mueller Hinton (Himedia®) de acordo com o CLSI 2009¹⁵. Apesar do disco de oxacilina não ser mais recomendado para previsão da resistência   oxacilina desde 2009, incluímos neste estudo com o objetivo de comparar o seu desempenho com o disco de cefoxitina. A suscetibilidade ao novo antimicrobiano tigeciclina também foi avaliada na técnica de difusão do disco, porém, ainda não há critérios interpretativos definidos pelo CLSI e, portanto, foram considerados os valores aprovados pelo U. S. Food and Drug Administration (FDA)¹⁷. Testes de sensibilidade utilizando automa o MicroScan® (Siemens) também foram efetuados; nesta análise não foram avaliados cefoxitina e tigeciclina, mas incluiu-se o antimicrobiano vancomicina. Microdilui o em caldo para vancomicina, conforme documento M7-A6- NCCLS/CLSI 2003, também foi realizada.

Detec o do gene *mecA*. Extra o do DNA: foi efetuada através de aquecimento com posterior choque térmico, onde o DNA foi mantido em banho de gelo por 4 minutos¹⁸. Em seguida, procedeu-se a centrifuga o do material, retirando o sobrenadante, que foi armazenado a -20  C até o momento da análise.

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR): realizada para detectar o gene *mecA*, utilizando a metodologia previamente descrita por Kearns, AM e colaboradores, 1999¹⁹. Empregou-se o seguinte par de *primers*: SA-1 (5' CGG TAA CAT TGA TCG CAA CGT TCA 3') e SA-2 (5' CTT TGG AAC GAT GCC TAA TCT CAT 3') (Ludwig Biotec®). Todas as reações foram realizadas com dois microlitros do DNA e 48µl do mix, o qual continha 15pmol dos iniciadores, 200µM dos desoxirribonucleotídeos (Ludwig Biotec®), Tampão de *Taq* 1x (Ludwig Biotec®) e 5U de *Taq*DNA polimerase (Ludwig Biotec®).

Avaliação do padrão dos amplicons de DNA: o produto amplificado de cada reação foi submetido à eletroforese em gel de agarose 2% (Pronadisa®) com brometo de etídio (0,5µg/mL) durante 1 hora e visualizado em UV (312nm) com auxílio de transiluminador Fusion – FX7 – 7026 – WL/LC/26MX (Vilber Lourmat®). O resultado positivo para a presença do gene *mecA* foi evidenciado através da amplificação do fragmento com 214 pares de base. O que foi confirmado pelo controle positivo e pelo marcador de peso molecular, (Figura 1).

Microrganismo controle: a cepa de *S. aureus* ATCC 43330 foi utilizada como controle.

ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo recebeu aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Santa Maria, sob número 0117.0.243.000-08.

RESULTADOS

Durante o período de janeiro de 2008 a janeiro de 2009, foram solicitadas, aproximadamente, 4379 hemoculturas ao Laboratório de Análises Clínicas (LAC) do HUSM. Deste total, 625 (14%) foram positivas e destas, 124 (19,8%) resultaram em isolados de SCN.

Para a elaboração deste estudo, foram selecionadas 60 cepas de SCN resistentes à oxacilina (60 de 124/48,4%).

Dentre as 60 cepas selecionadas, a espécie prevalente foi o *Staphylococcus epidermidis* (40 de 60/67%). As demais foram identificadas como *Staphylococcus haemolyticus* (12 de 60/20%), *Staphylococcus* coagulase negativos (7 de 60/11%) e *Staphylococcus hominis subs. novobiosepticus* (1 de 60/2%).

Os setores hospitalares nos quais houve a prevalência das cepas selecionadas foram os Centros de Terapia Intensiva (CTIs) adulto (15 de 60/25%) e neonatal (12 de 60/20%), seguidos pelo Centro de Transplante de Medula Óssea (CTMO) (5 de 60/8%) e Centro de Tratamento de Criança com Câncer (CTcriac) (5 de 60/8%), totalizando 61% dos isolados.

A avaliação da significância clínica pôde ser efetuada para 38 cepas (38 de 60/63,3%). Já para 22 cepas, houve dificuldades na realização desta análise devido a dados clínicos insuficientes. Dessa forma, verificou-se que grande parte dos isolados avaliados foi responsável por bacteremia verdadeira (30 de 38/78,95%) e que somente oito mostraram-se contaminantes (8 de 38/21,05%).

De acordo com a sensibilidade a agentes antimicrobianos, efetuada pelo método de difusão do disco (**Tabela 1**), as cepas de SCN apresentaram resistência significativa a várias classes de antimicrobianos. As maiores sensibilidades obtidas foram frente aos antimicrobianos rifampicina (43 de 60/72%) e tigeciclina (60 de 60/100%). Além disso, foram identificados sete perfis de sensibilidade antimicrobiana prevalentes. Aqueles que não se enquadraram entre os perfis prevalentes mostraram-se bastante distintos entre si e por este motivo foram agrupados como “outros”.(**Tabela 2**).

O método automatizado MicroScan® (Siemens) também evidenciou um índice elevado de resistência entre os SCN selecionados. (**Tabela 3**).

Em relação ao antimicrobiano vancomicina, todas as cepas mostraram-se uniformemente sensíveis, apresentando CIM ≤ 2 $\mu\text{g/ml}$ a partir da automação e da microdiluição em caldo.

Na **Tabela 4** estão relacionados os resultados referentes aos testes fenotípicos para caracterização da resistência à oxacilina, bem como os resultados do teste genotípico de referência (detecção do gene *mecA*). Na difusão do disco, (54 de 60/90%) dos SCN foram resistentes à oxacilina e (57 de 60/95%) foram resistentes à cefoxitina. O gene *mecA* foi detectado em (54 de 60/90%) das amostras testadas.

Através da análise estatística dos resultados, obteve-se sensibilidade de 92% para o disco de oxacilina e de 96% para a cefoxitina, quando comparados ao teste genotípico de referência.

DISCUSSÃO

Neste estudo, as cepas de SCN prevalentes foram *S. epidermidis* (40 de 60/67%) e *S. haemolyticus* (12 de 60/20%). Estas duas espécies têm sido relatadas em estudos nacionais e internacionais como as mais frequentes entre os SCN isolados de infecções nosocomiais^{1,9,20,21,22,23}.

Do ponto de vista epidemiológico, o *S. epidermidis* tem desenvolvido estratégias interessantes para conquistar o ambiente hospitalar e se transformar em um patógeno notório. Destaca-se a sua capacidade de colonizar a superfície inerte de dispositivos médicos invasivos, formando biofilmes de difícil tratamento, bem como, o carregamento de diferentes elementos genéticos móveis, os quais são responsáveis pela resistência à oxacilina²⁴.

O *S. haemolyticus* também desempenha um papel considerável em infecções oportunistas relacionadas a dispositivos médicos implantados. Contudo, para esta espécie, as bases moleculares da formação do biofilme ainda não foram totalmente elucidadas. Os níveis elevados de resistência aos antimicrobianos, incluindo a heterorresistência aos glicopeptídeos,

compreendem características importantes, que tornam infecções por *S. haemolyticus* uma ameaça grave^{20,25}.

Em nosso estudo, sete isolados de SCN (7 de 60/20%) não foram identificados satisfatoriamente em nível de espécie pelo sistema automatizado. Apesar das vantagens oferecidas por este sistema, tais como, logística no fluxo de trabalho e rapidez no fornecimento de resultados, ele pode apresentar limitações na identificação e determinação da suscetibilidade de alguns patógenos²⁶.

Devido à emergência de infecções nosocomiais associadas a SCN, a identificação das cepas em nível de espécie torna-se um fator importante, a fim de definir o seu significado clínico e realizar estudos epidemiológicos adequados²⁶.

O percentual de significância clínica dos nossos isolados foi superior ao descrito na literatura¹. Todavia, deve-se considerar que os critérios de inclusão utilizados podem ter influenciado este resultado, já que o seu emprego dificultou a inclusão de um maior número de cepas, possivelmente contaminantes.

As cepas de SCN selecionadas para este estudo foram provenientes, principalmente, de pacientes admitidos em unidades críticas (CTIs adulto e neonatal) e unidades hematológicas (CTMO e CTCRIAC). Dessa forma, os dados obtidos neste estudo estão de acordo com relatos da literatura, nos quais a prevalência de SCN foi observada em hemoculturas de pacientes internados em CTIs¹, recém-nascidos, imunocomprometidos^{4,28} e transplantados de medula óssea³.

Nestes setores hospitalares, grande parte das ICS está relacionada a procedimentos invasivos, uso de cateteres e imunossupressão²⁷. Além disso, uma característica relevante das cepas provenientes desses locais é a taxa expressiva de resistência à oxacilina, o que dificulta o tratamento, conduzindo ao emprego de múltiplos antimicrobianos e pressão seletiva²⁷.

Nossos isolados apresentaram um índice considerável de resistência a diferentes antimicrobianos (Tabelas 1, 2 e 3). Algumas variações entre os resultados obtidos a partir do método convencional (Tabela 1) e do automatizado (Tabela 3) foram encontradas. A maior sensibilidade à clindamicina, sulfametoxazol/trimetoprima e levofloxacina, evidenciada na automação, poderá conduzir a erros maiores, visto que, há possibilidade das cepas apresentarem falsa sensibilidade. Com os antimicrobianos gentamicina e oxacilina, os resultados da difusão do disco poderão direcionar a erros maiores.

Conforme exposto na Tabela 2 (difusão do disco), as cepas com perfis I e V caracterizaram-se pela resistência a maioria dos antimicrobianos testados, apresentando sensibilidade apenas à tigeciclina. O perfil V diferiu do perfil I, devido apresentar resistência intermediária à levofloxacina. Já as cepas com perfil II mostraram-se sensíveis à tigeciclina e rifampicina, assemelhando-se às cepas com perfil VI, nas quais houve resistência intermediária à gentamicina. Os perfis III e IV apresentaram maior sensibilidade que os anteriormente citados, sendo as cepas sensíveis à tigeciclina, rifampicina, clindamicina, ciprofloxacino e levofloxacino.

Adicionalmente verificamos que as cepas que apresentaram estes sete perfis de sensibilidade prevalentes, foram provenientes, principalmente, de pacientes internados nas UTIs. Esta é uma característica importante das cepas de origem hospitalar, corroborando que em unidades críticas, há maior multirresistência^{27,29}.

A partir do método genotípico, verificou-se que 54 (54 de 60/90%) das cepas carreavam o gene *mecA* e que em 6 (6 de 60/10%) ele estava ausente. Já na difusão do disco, o gene *mecA* foi detectado com 96% e 92% de sensibilidade, utilizando os discos de cefoxitina (30µg) e oxacilina (1µg), respectivamente (Tabela 4). Este dado é compatível com o descrito em outros estudos^{9,30,31,32} nos quais o disco de cefoxitina também apresentou maior correlação com o padrão ouro.

Analisando os índices de resistência à oxacilina obtidos através da automação e do disco de cefoxitina pôde-se constatar a ocorrência de superestimação, em relação ao encontrado no padrão ouro. A resistência à oxacilina sem a presença do gene *mecA* pode ser devida a hiperprodução de penicilinase ou por modificação nas proteínas de ligação da penicilina (PBP 1, 2 e 4) ¹⁴.

Em relação à sensibilidade aos glicopeptídeos, todos os isolados mostraram-se sensíveis à vancomicina. Contudo, relatos de cepas de SCN e *S. aureus* apresentando suscetibilidade reduzida à vancomicina em diversos países, incluindo o Brasil, têm gerado dilemas terapêuticos na prática clínica ³³.

Nos últimos anos, novas opções terapêuticas surgiram como alternativa à vancomicina. Daptomicina e quinupristina / dalfopristina foram aprovadas recentemente pelo FDA para o tratamento de bacteremias ocasionadas por cocos Gram-positivos multirresistentes. Tigeciclina, oritavancina, linezolida e ceftobiprole, também fazem parte deste novo arsenal terapêutico, porém, ainda não foram aprovados para o tratamento de infecções da corrente sanguínea ³⁴.

CONCLUSÃO:

Neste contexto, salienta-se que a análise da significância clínica de SCN isolados de hemoculturas, bem como, a detecção precisa da resistência à oxacilina, representam fatores decisivos para a instituição correta da antibioticoterapia. A vancomicina continua sendo o tratamento de escolha para infecções graves associadas a SCN oxacilina resistentes neste hospital terciário. Entretanto, devido ao surgimento de cepas de *Enterococcus* spp. vancomicina resistentes (EVR) e *Staphylococcus* spp. com suscetibilidade reduzida à vancomicina, a redução do uso deste antimicrobiano têm sido recomendada. Sendo assim, sugere-se que novas opções terapêuticas sejam utilizadas a fim de resguardar este glicopeptídeo.

REFERÊNCIAS:

- 1- Leão LSNO, Passos XS, Reis C, Valadão LMA, Silva MRR, Pimenta FC. Fenotipagem de bactérias isoladas de hemoculturas de pacientes críticos. *Rev Soc Bras Med Trop* 2007; 40:537-540.
- 2- Grisarú-Soen G, Sweed Y, Lerner-Geva L, Hirsh-Yechezkel G, Boyko V, Vardi A, et al. Nosocomial bloodstream infections in a pediatric intensive care unit: 3-year survey. *Med Sci Monit* 2007; 13:251-257.
- 3- Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: Analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis* 2004; 39:309-317.
- 4- Perazzi B, Fermepin MR, Malimovka A, Garcia SD, Orgambide M, Vay CA, et al. Accuracy of cefoxitin disk testing for characterization of oxacillin resistance mediated by penicillin-binding protein 2a in coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol* 2006; 44:10:3634-3639.
- 5- Natoli S, Fontana C, Favaro M, Bergamini A, Testore GP, Minelli S, et al. Characterization of coagulase-negative staphylococcal isolates from blood with reduced susceptibility to glycopeptides and therapeutic options. *BMC Infect Dis* 2009;9:83.
- 6- Karchmer AW. Nosocomial bloodstream infections: organisms, risk factors, and implications. *Clin Infect Dis* 2000; 31:139-143.
- 7- Beekmann SE, Diekema DJ, Doern GV. Determining the clinical significance of coagulase-negative staphylococci isolated from blood cultures. *Infection control and hospital epidemiology* 2005; 26:559-66.
- 8- Mendes RE, Jones RN, Deshpande LM, Ross JE, Sader HS. Daptomycin activity tested against linezolid-nonsusceptible Gram-Positive clinical isolates. *Microb Drug Resist* 2009; 15:4:245-249.

9- Perez LRR, d'Azevedo PA. Evaluation of the accuracy of various phenotypic tests to detect oxacillin resistance in coagulase-negative staphylococci. *Braz J Infect Dis* 2008; 12:3:210-212.

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

11- Moussalem BC, Kury CMH, Medina-Acosta E. Detecção dos genes *mecA* e *femA*, marcadores moleculares de resistência a meticilina, em *Staphylococcus* spp. isolados de pacientes admitidos em uma Unidade Neonatal de Tratamento Intensivo. *Revista Científica da FMC* 2007; 2:02-09.

12- Caierão J, Superti S, Dias CAG, d'Azevedo PA. Automated systems in the identification and determination of methicillin resistance among coagulase negative staphylococci. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101:277-279.

13- Ferreira RB, Iorio NL, Malvar KL, Nunes APF, Fonseca LS, Bastos CCR, et al. Coagulase-negative staphylococci: comparison of phenotypic and genotypic oxacillin susceptibility tests and evaluation of the agar screening test by using different concentrations of oxacillin. *J Clin Microbiol* 2003; 41:3609-3614.

14- Antunes ALS, Secchi C, Reiter KC, Perez LRR, Freitas ALP, d'Azevedo PA. Evaluation of oxacillin and cefoxitin disks for detection of resistance in coagulase negative staphylococci. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007; 102:6:719-723.

15- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Nineteenth Informational Supplement Approved Standard M100-S19. CLSI, Wayne, Pennsylvania, USA, 2009.

16- Brown DFJ. Detection of methicillin/oxacillin resistance in staphylococci. *J Antimicrob Chemother* 2001;48:65-70.

- 17- Tygacil Package Insert. Wyeth Pharmaceuticals Inc.; Philadelphia, PA, USA, June 2005.
- 18- Greco C, Mastronardi C, Pagotto F, Mack D, Ramirez-Arcos S. Assessment of biofilm-forming ability of coagulase-negative staphylococci isolated from contaminated platelet preparations in Canada. *Transfusions* 2008; 48:969-77.
- 19- Kearns AM, Seiders PR, Wheeler J, Freeman R, Steward M. Rapid detection of methicillin-resistant Staphylococci by multiplex PCR. *Journal of Hospital Infection* 1999; 43:33-37.
- 20- D' Azevedo PA, Secchi C, Antunes ALS, Sales T, Silva FM, Tranchesi R, et al. Oxacilin-Resistant Coagulase-Negative Staphylococci (CONS) bacteremia in a general hospital at São Paulo city, Brasil. *Braz J Microbiol* 2008;39:631-635.
- 21- Lyytikäinen O, Lumio J, Sarkkinen H, Kolho E, Ruutu P, and the Hospital Infection Surveillance Team. Nosocomial bloodstream infections in Finnish hospital during 1999-2000. *Clin Infect Dis* 2002; 35:14-19.
- 22- Michelim L, Lahude M, Araújo PR, Giovanaz DSH, Müller G, Delamare APL, et al. Echeverrigaray S. Pathogenicity factors and antimicrobial resistance of *Staphylococcus epidermidis* associated with nosocomial infections occurring in intensive Care units. *Braz J Microbiol* 2005; 36:17-23.
- 23- Aldea-Mansilla C, Viedma DG, Cercenado E, Martín-Rabadán P, Marín M, Bouza E. Comparison of phenotypic with genotypic procedures for confirmation of coagulase-negative *Staphylococcus* catheter-related bloodstream infections. *J Clin Microbiol* 2006;44:3529-3532.
- 24- Schoenfelder SMK, Lange C, Eckart M, Hennig S, Kozytska S, Ziebuhr W. Success through diversity – How *Staphylococcus epidermidis* establishes as a nosocomial pathogen. *Int J Med Microbiol* 2010 [in press].

- 25- Fredheim EGA, Klingenberg C, Rohde H, Frankenberger S, Gaustad P, Flægstad T, et al. Biofilm Formation by *Staphylococcus haemolyticus*. J Clin Microbiol 2009;47:1172-1180.
- 26- D'Azevedo PA, Siquiera I, Gugel J, Antunes ALS, Secchi C, Pasternak J. Evaluation of the Automated System Vitek2 for Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Brazilian Gram-Positive Cocci Strains. Braz J Infect Dis 2009;13:107-110.
- 27- Agvald-Öhman C, Lund B, Edlund C. Multiresistant coagulase-negative staphylococci disseminate frequently between intubated patients in a multidisciplinary intensive care unit. Critical Care 2004; 8:42-47.
- 28- Picazzo JJ, Betriu C, Culebras E, Rodríguez-Avial I, Gómez M, López F, the VIRA Study Group. Activity of daptomycin against staphylococci collected from bloodstream infections in Spanish medical centers. Diagn Microbiol Infect Dis 2009; 64:448-451.
- 29- Vincent J. Nosocomial infections in adult intensive-care units. Lancet 2003; 361:2068-2077.
- 30- Pottumarthy S, Fritsche TR, Jones RN. Evaluation of alternative disk diffusion methods for detecting mecA-mediated oxacillin resistance in an international collection of staphylococci: validation report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. Diagn Microbiol Infect Dis 2005; 51:57-62.
- 31- Skov R, Smyth R, Larsen AR, Frimodt-Møller N, Kahlmeter G. Evaluation of cefoxitin 5 and 10 microg discs for the detection of methicillin resistance in staphylococci. J Antimicrob Chemother 2005;55:157-161.
- 32- Zhu LX, Zhang ZW, Wang C, Yang HW, Zhang Q, Cheng J. Evaluation of the CLSI cefoxitin 30-microg disk-diffusion method for detecting methicillin resistance in staphylococci. Clin Microbiol Infect 2006;12:1039-1042.

- 33- Nunes APF, Teixeira LM, Iorio NLP, Bastos CCR, Fonseca LS, Souto-Padrón T, et al. Heterogeneous resistance to vancomycin in *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus warneri* clinical strains: characterisation of glycopeptide susceptibility profiles and cell wall thickening. *J. Antimicrobial Agents* 2006;27:307-315
- 34- Manfredi R, Sabbatani S. Novel pharmaceutical molecules against emerging resistant gram-positive cocci. *Braz J Infect Dis* 2010;14:96-108.

TABELA 1 – Sensibilidade aos antimicrobianos das 60 cepas de SCN isoladas das hemoculturas realizadas no HUSM, no período de janeiro de 2008 a janeiro de 2009, utilizando-se o método de difusão do disco

Antimicrobianos	Sensíveis		Intermediários		Resistentes		Total
	N	%	N	%	n	%	%
Cefoxitina	3	5%	-	-	57	95%	100%
Ciprofloxacina	24	40%	4	7%	32	53%	100%
Clindamicina	23	38%	-	-	37	62%	100%
Eritromicina	9	15%	-	-	51	85%	100%
Gentamicina	17	28%	6	10%	37	62%	100%
Levofloxacina	28	47%	5	8%	27	45%	100%
Oxacilina	6	10%	-	-	54	90%	100%
Rifampicina	43	72%	1	2%	16	26%	100%
Sulfametoxazol/Trimetoprima	20	33%	-	-	40	67%	100%
Tigeciclina	60	100%	-	-	-	-	100%

TABELA 2 – Perfis de sensibilidade aos antimicrobianos das 60 cepas de SCN isoladas de Hemoculturas realizadas no HUSM, conforme método de difusão do disco.

Perfil	TIG	RIF	LEV	CIP	CLI	SUT	GEN	ERI	OXA	CFO	N (%)
I	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	10
II	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	6
III	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	5
IV	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	4
V	S	R	I	R	R	R	R	R	R	R	3
VI	S	S	R	R	R	R	I	R	R	R	2
Outros	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	29

TGC = tigeciclina. RIF = rifampicina. LEV = levofloxacina. CIP = ciprofloxacina. CLI = clindamicina. SUT = Sulfametoxazol/Trimetoprima. GEN = gentamicina. ERI = eritromicina. OXA = oxacilina. CFO = cefoxitina.

TABELA 3 - Sensibilidade aos antimicrobianos das 60 cepas de SCN isoladas das hemoculturas realizadas no HUSM, no período de janeiro de 2008 a janeiro de 2009, utilizando-se a automação

Antimicrobianos	Sensíveis		Intermediários		Resistentes		Total
	N	%	N	%	n	%	%
Ciprofloxacina	28	47%	-	-	32	53%	100%
Clindamicina	28	47%	-	-	32	53%	100%
Eritromicina	16	27%	-	-	44	73%	100%
Gentamicina	13	22%	1	2%	46	76%	100%
Levofloxacina	28	47%	12	21%	20	32%	100%
Oxacilina	1	2%	-	-	59	98%	100%
Rifampicina	45	76%	2	3%	13	24%	100%
Sulfametoxazol/Trimetoprima	32	53%	-	-	28	47%	100%
Vancomicina	60	100%	-	-	-	-	100%

TABELA 4 - Resultados dos testes para caracterização da resistência à oxacilina das 60 cepas de SCN isoladas das hemoculturas de pacientes atendidos no HUSM, no período de janeiro de 2008 a janeiro de 2009

	Disco		Disco	
	Oxacilina		Cefoxitina	
	R	S	R	S
Gene <i>mecA</i> +	50/54	4/54	52/54	2/54
Gene <i>mecA</i> -	4/6	2/6	5/6	1/6
Total	54/60	6/60	57/60	3/60