

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

**COMPARAÇÃO DE METODOLOGIAS PARA
DETECÇÃO DA RESISTÊNCIA À METICILINA EM
*Staphylococcus aureus***

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Lívia Gindri

Santa Maria, RS, Brasil.

2013

COMPARAÇÃO DE METODOLOGIAS PARA DETECÇÃO DA RESISTÊNCIA À METICILINA EM *Staphylococcus aureus*

Lívia Gindri

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Análises Clínicas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas.**

Orientadora: Prof^a Dra. Rosmari Hörner

Santa Maria, RS, Brasil.

2013

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Gindri, Livia
Comparação de metodologias para detecção da resistência à meticilina em *Staphylococcus aureus* / Livia Gindri.-2013.
51 p.; 30cm

Orientadora: Rosmari Hörner
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2013

1. *Staphylococcus aureus*. 2. Resistência 3. Meticilina 4. Prevalência 5. Reação em Cadeia da Polimerase I. Hörner, Rosmari II. Título.

© 2013

Todos os direitos autorais reservados a Livia Gindri. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

E-mail: biagindri@yahoo.com.br

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

**COMPARAÇÃO DE METODOLOGIAS PARA
DETECÇÃO DA RESISTÊNCIA À METICILINA EM
*Staphylococcus aureus***

elaborada por
Lívia Gindri

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

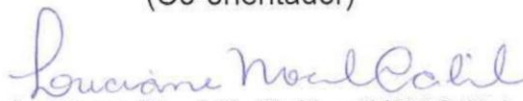
Comissão Examinadora



Rosmari Hörner, Dra.
(Presidente/Orientador)



Daniel Ângelo Sganzerla Graichen, Dr.(UFSM)
(Co-orientador)



Luciane Noal Calil, Dra.(UFRGS)



Maria do Carmo dos Santos Araújo, Dra.(UFSM)

Santa Maria, 29 de novembro de 2013.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Luiz Henrique Frigo Gindri e Zélia Gindri, mesmo com dificuldades não mediram esforços para que eu chegasse até aqui.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer primeiramente a Deus, por sempre iluminar meus caminhos, me amparar nos momentos difíceis, me dar força para superar as dificuldades, fazendo com que eu não perdesse minha fé.

Aos meus pais, Zélia e Luiz Henrique, que sempre estiveram ao meu lado, me apoiando e incentivando, acreditando em mim até mesmo quando eu já não acreditava mais. Pelos ensinamentos e orientações que me fizeram ser uma pessoa de caráter e a nunca desistir dos meus sonhos. Obrigada por todo amor e carinho dedicados a mim. Amo muito vocês.

À minha orientadora, professora Dra Rosmari Hörner, pela oportunidade, por acreditar e confiar em mim, mostrando-me o caminho da ciência.

Ao professor Dr Daniel Ângelo Sganzerla Graichen, meu co-orientador, pelos conhecimentos transmitidos e colaboração.

À minha irmã Lucélia pela força e incentivo para que eu concluísse mais essa etapa em minha vida.

Ao meu noivo Vinícius, que soube compreender as minhas ausências, me incentivando e apoiando, sempre transmitindo pensamentos positivos quando o desânimo chegava.

À Mônica de Abreu Rodrigues que é muito mais que uma amiga, é um anjo na minha vida. Sempre ao meu lado, me ajudando nos momentos difíceis e compartilhando as alegrias, nossa amizade vai muito além das paredes do laboratório. Vou te levar para sempre em meu coração. Obrigada pelo apoio e amizade incondicionais. Este título também é seu.

Quero agradecer a minha querida amiga Liliana Urdangarin de Sousa, pelos vários anos de amizade, carinho e cumplicidade. Tua amizade sincera e verdadeira desde o primeiro dia de aula da graduação me fez acreditar que ainda existem pessoas em quem podemos confiar. Você é muito especial em minha vida.

Às minhas colegas do Laboratório de Bacteriologia, pelos momentos vividos juntos, pelo companheirismo e amizade. Obrigada por dividir comigo as angústias e alegrias e ouvirem minhas bobagens. Foi bom poder contar com vocês. Agradeço especialmente as minhas amigas Cláudia, Maísa, Silvana, que me acolheram muito

bem desde o primeiro dia que cheguei ao laboratório, e me acompanharam durante esta caminhada sempre com palavras de incentivo.

Não poderia deixar de agradecer às minhas estagiárias, Aniélen e Camille, pela dedicação que tiveram para realização desse trabalho, sempre prestativas, nunca mediram esforços, com uma alegria contagiante, além da amizade e companheirismo dedicados. Vocês fazem parte dessa dissertação.

Ao Hospital Universitário de Santa Maria e às farmacêuticas do Setor de Microbiologia do Laboratório de Análises Clínicas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, desta universidade, pelo apoio sempre concedido para a realização desta pesquisa.

A CAPES pelo apoio financeiro, pois com o auxílio da bolsa pude me dedicar integralmente a esse trabalho.

Enfim, agradeço a todos os amigos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho. Proporcionaram-me mais que a busca de conhecimento técnico e científico, mas uma lição de vida.

NINGUÉM VENCE SOZINHO! OBRIGADA!

RESUMO

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

COMPARAÇÃO DE METODOLOGIAS PARA DETECÇÃO DA RESISTÊNCIA À METICILINA EM *Staphylococcus aureus*

AUTORA: LÍVIA GINDRI

ORIENTADORA: ROSMARI HÖRNER

CO-ORIENTADOR: DANIEL ÂNGELO SGANZERLA GRAICHEN

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 29 de Novembro de 2013.

Staphylococcus aureus é considerado como um microrganismo pertencente à microbiota normal dos seres humanos, podendo ser tanto um colonizador como um patógeno infeccioso. *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) emergiu como uma das principais causas de infecções nosocomiais e comunitárias. O elevado aumento na resistência a diferentes antimicrobianos tem limitado as opções terapêuticas. Assim, a realização adequada de testes de sensibilidade a essas drogas é vital para garantir o adequado tratamento dessas infecções, e o emprego de metodologias capazes de detectar esta resistência de forma rápida e precisa, torna-se imprescindível no diagnóstico clínico. O objetivo desse estudo foi comparar métodos fenotípicos manual e automatizado com o genotípico, baseado na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), para detectar cepas MRSA. Um total de 139 amostras de *S. aureus* foram analisadas por meio de métodos fenotípicos manuais e automatizado e comparadas com a determinação do gene *mecA* por PCR. De um total de 139 amostras, 37 (26,6%) apresentaram o gene pesquisado. O disco de oxacilina apresentou sensibilidade de 62,2% e especificidade de 95,1%, enquanto que para o disco de cefoxitina estes parâmetros foram 67,6% e 94,1%, respectivamente. O método automatizado foi o que obteve as maiores percentagens de sensibilidade (67,6%) e especificidade (96,1%). Algumas divergências foram observadas quando comparamos os métodos fenotípicos com a PCR. A combinação de metodologias pode ser considerada como uma alternativa eficiente no diagnóstico de infecções causadas por MRSA.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*. Resistência. Meticilina. Prevalência. Reação em Cadeia da Polimerase.

ABSTRACT

Master's Dissertation
Graduate Program in Pharmaceutical Sciences
Federal University of Santa Maria

COMPARISON OF METHODS FOR DETECTION OF RESISTANCE IN *Staphylococcus aureus* METHICILLIN

AUTHOR: LÍVIA GINDRI

GUIDANCE: ROSMARI HÖRNER

CO-ADVISOR: DANIEL ÂNGELO SGANZERLA GRAICHEN

Date and Place of Defence: Santa Maria, November 29th, 2013.

Staphylococcus aureus is considered as a microorganism belonging to the normal flora of humans, being both a settler as an infectious pathogen. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) has emerged as a major cause of nosocomial infections and community. The large increase in resistance to antimicrobials has limited therapeutic options. Thus the proper conduct of testing the susceptibility to drugs is vital to ensure the proper treatment of these infections, and the use of methods capable of detecting resistance quickly and accurately, it is essential in clinical diagnosis. The aim of this study was to compare manual and automated phenotypic methods with genotypic based on Polymerase Chain Reaction (PCR) to detect MRSA strains. A total of 139 samples of *S. aureus* were analyzed using automated and manual methods phenotypic and compared with the determination of the *mecA* gene by PCR. A total of 139 samples, 37 (26.6 %) had the gene searched. The oxacillin had a sensitivity of 62.2% and specificity of 95.1 %, while cefoxitin disk for these parameters were 67.6% and 94.1 %, respectively. The automated method was the one that had the highest percentages of sensitivity (67,6 %) and specificity (96.1 %). Some differences were observed when comparing the phenotypic methods with PCR. A combination of methods can be considered as an efficient alternative for the diagnosis of infections caused by MRSA.

Keywords: *Staphylococcus aureus*. Methicillin-resistance. Prevalence. Polymerase Chain Reaction.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Colônias típicas de <i>Staphylococcus aureus</i>	15
Quadro 1 – Diferenças entre HA-MRSA e CA-MRSA.....	24
Figura 2 – Gel de agarose evidenciando amostras de <i>S. aureus mecA</i> positivas (145pb).....	29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	– <i>American Type Culture Collection</i>
BEC	– Clone Endêmico Brasileiro
BORSA	– <i>Borderline Oxacillin Resistant Staphylococcus aureus</i>
CA-MRSA	– <i>Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>
<i>Ccr</i>	– <i>CassetteChromosomeRecombinases</i>
CIM	– Concentração Inibitória Mínima
CLSI	– <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DNAse	– Desoxirribonuclease
g	– gramas
HA-MRSA	– <i>Healthcare-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>
HUSM	– Hospital Universitário de Santa Maria
kDa	– quilodalton
LAC	– Laboratório de Análises Clínicas
<i>mecA</i>	– gene cromossômico responsável pela resistência à metilina
<i>mecI</i>	– gene repressor do <i>mecA</i>
<i>mecR1</i>	– gene indutor do <i>mecA</i>
mg	– miligramas
MH	– Müeller Hinton
mL	– mililitro
mm	– milímetro
MODSA	– <i>Modified Penicillin Binding Protein Staphylococcus aureus</i>
MRSA	– <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à metilina
MSSA	– <i>Staphylococcus aureus</i> sensíveis à metilina
<i>orfX</i>	– gene no qual os SCC <i>mec</i> estão integrados
pb	– pares de base
PBP	– Proteína Ligadora de Penicilina
PCR	– Reação em cadeia da Polimerase
PVL	– Panton-Valentine Leucocidina
<i>S. aureus</i>	– <i>Staphylococcus aureus</i>
SCC <i>mec</i>	– Cassete Cromossômico Estafilocócico <i>mec</i>

TSST-1 – toxina-1 da síndrome do choque tóxico
UFC – unidades formadoras de colônia
 β -lactamases – beta-lactamases
 β -lactâmicos – classe de antimicrobianos beta-lactâmicos
 μg – microgramas
 μL – microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 <i>Staphylococcus aureus</i>.....	14
1.1.2 Patogênese.....	15
1.1.3 Virulência.....	16
1.1.3.1 Enzimas e toxinas estafilocócicas.....	17
1.2 Resistência aos antimicrobianos.....	18
1.3 Resistência à penicilina.....	19
1.4 <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilina.....	19
1.4.1 Resistência à metilina/ Gene <i>mecA</i>	20
1.4.2 <i>Staphylococcal Cassette Chromosome (SCCmec)</i>	21
1.4.2.1 Tipos de <i>SCCmec</i>	22
1.4.3 MRSA hospitalar (HA-MRSA) e comunitário (CA-MRSA).....	23
1.4.4 MRSA pelo mundo.....	25
1.5 Testes para detecção da resistência à oxacilina.....	26
1.5.1 Fenotípicos.....	26
1.5.1.1 Difusão do disco.....	26
1.5.1.2 Detecção da concentração inibitória mínima.....	27
1.5.1.3 Teste em equipamentos automatizados.....	28
1.5.2 Genotípicos	28
1.5.2.1 Reação em Cadeia da Polimerase.....	29
1.6 Justificativa.....	29
1.7 Objetivos.....	30
1.7.1 Objetivo geral.....	30
1.7.2 Objetivos específicos.....	31
2 Manuscrito.....	32
Resumo.....	32

Introdução.....	33
Objetivo.....	34
Metodologia.....	34
Resultados.....	36
Discussão.....	37
Conclusões.....	39
Referências.....	39
3 CONCLUSÕES.....	43
REFERÊNCIAS.....	44

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus* foi descoberto na década de 1880, pelo escocês Alexandre Ogston, em uma amostra de pus de abscesso cirúrgico (DEURENBERG, 2009). Entre as espécies deste gênero, o *Staphylococcus aureus* é o mais relevante, fazendo parte da microbiota residente ou transitória de seres humanos, principalmente da pele e mucosa das fossas nasais, orofaringe e intestino (BHATIA e ZAHOOR, 2007).

O *S. aureus* pertence à família *Staphylococcaceae* (KONEMAN et al., 2008), é caracterizado como coco Gram positivo, catalase positiva, medindo cerca de 1,0 mm de diâmetro, imóveis, normalmente não encapsulado (CROSSLEY et al., 2009; SOUSA, 2012). Esses microrganismos podem apresentar-se isolados, aos pares, em cadeias curtas, agrupados irregularmente ou em cachos (SANTOS et al., 2007).

A semeadura realizada para o isolamento deste patógeno utiliza meios de cultura não seletivos, em condições aeróbias e anaeróbias, ocorrendo após um período de incubação de 18-24 horas. Crescem formando colônias douradas, lisas, arredondadas e brilhantes, como na figura 1, sendo que algumas características como teste da coagulase e desoxirribonuclease (DNase) positivas e fermentação de manitol são importantes para a sua identificação (LOWY, 1998).

O *S. aureus* é resistente ao meio ambiente, podendo após vários meses ser isolado em secreções orgânicas ressecadas. Quando exposto aos desinfetantes, como clorexidina e fenóis sintéticos, bem como ao calor a 60°C por 30 minutos morrem rapidamente (MARTINS JÚNIOR et al., 2009).

Possui a capacidade de formar biofilmes na superfície de materiais estranhos ao organismo, como em cateteres endovenosos e próteses, os quais funcionam como locais protegidos contra a ação de antibióticos e do sistema imunológico do hospedeiro (DAVIS, 2005).

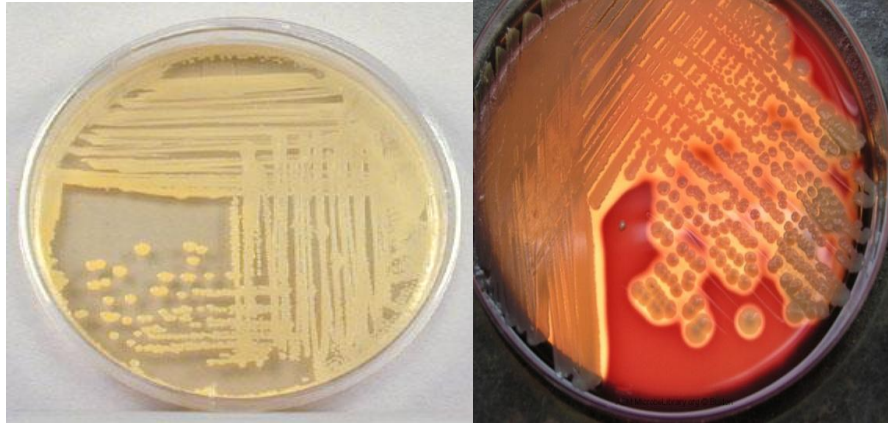


Figura 1: Colônias típicas de *Staphylococcus aureus*. Fonte: American Society for Microbiology, disponível em <http://jb.asm.org/content/vol186/issue9/cover.dtl>

1.1.2 Patogênese

S. aureus é bactéria ubíqua, considerada microbiota normal na cavidade nasal e outros sítios como as axilas, virilhas e trato gastrointestinal, podendo ser tanto um colonizador como um patógeno infeccioso (GORDON, LOWY; 2008; MONECKE, 2011).

De acordo com o Centers for Disease Control and Prevention (CDC, 2010), estima-se que em torno de 25 a 30% da população seja portadora dessa bactéria. Relatos sugerem que indivíduos colonizados por *S. aureus* possuem risco aumentado para desenvolvimento de infecções estafilocócicas. No entanto, o processo infeccioso depende de fatores de virulência do patógeno e de mecanismos de defesa do hospedeiro (ROSA, 2009).

S aureus provocam infecções que vão desde pequenos furúnculos até sepse grave, sendo o principal causador de doenças comunitárias e infecções hospitalares, além de ser considerado como um dos patógenos resistentes mais encontrados na clínica (CRUVINEL; SILVEIRA; SOARES, 2011; PILLAI, 2012). Podem ocasionar infecções de pele e tecidos moles, pneumonia, septicemia e síndrome do choque tóxico (MONECKE, 2011).

Infecções estafilocócicas acometem principalmente pacientes hospitalizados, pelo fato de apresentarem sistema imunológico comprometido e frequentemente

serem submetidos a procedimentos invasivos. As infecções adquiridas em ambiente hospitalar, bem como as doenças associadas representam uma problemática, devido à sua elevada frequência e às altas taxas de morbidade e mortalidade (PLATA; ROSATO; WEGRZYN, 2009; RATTI; SOUSA, 2009).

1.1.3 Virulência

As infecções causadas pelo *S. aureus* podem ocorrer devido à invasão direta e destruição tecidual, por bacteremia primária ou serem provocadas pelas toxinas que esta espécie produz (ANDRIOLO, 2005; SANTOS et al., 2007).

A quebra da barreira cutânea da pele, presença de doenças subjacentes, como diabetes e síndrome da imunodeficiência adquirida, ou defeitos de neutrófilos, podem ser considerados fatores do hospedeiro predisponentes à infecção (CHAMBERS, 2009). Após invadir o epitélio, esse microrganismo utiliza várias estratégias para conseguir sobreviver e proliferar-se no organismo hospedeiro. Essas estratégias envolvem a opsonização do complemento, a neutralização da fagocitose e a inibição das respostas imune humoral e celular (SANTOS et al., 2007).

Uma peculiaridade nas infecções estafilocócicas é a capacidade de um fator de virulência estar diretamente relacionado a diversas manifestações patogênicas, assim como por vários fatores de virulência desempenhar a mesma função contra o sistema imune do hospedeiro (GORDON; LOWY, 2008).

A colonização e a patogenicidade do *S. aureus* são consideradas uma consequência de seus fatores de virulência, os quais apresentam papel relevante na adesão celular, na captação de nutrientes e na sua evasão da resposta imunológica do hospedeiro (SANTOS et al., 2007).

Esses fatores estão relacionados com a aderência às células do hospedeiro ou à matriz extracelular, como a produção de moléculas de fibrinogênio, fibronectina, colágeno ou da enzima coagulase. Eles também podem estar relacionados com a evasão da defesa do hospedeiro, como diversas enterotoxinas estafilocócicas, a toxina da síndrome do choque tóxico (TSST), a proteína A, lipases e polissacarídeos capsulares, bem como outros relacionados com a invasão na célula do hospedeiro e

a penetração nos tecidos ou adesão de superfícies de cateteres e próteses, os quais incluem as proteínas (toxinas) α , β , δ , γ e ϵ – hemolisinas (VELÁZQUEZ-MEZA, 2005).

1.1.3.1 Enzimas e toxinas estafilocócicas

O *S. aureus* possui um alto potencial infeccioso que está relacionado com a sua facilidade de multiplicação e disseminação nos tecidos, à produção de enzimas e toxinas, moléculas com grande poder patogênico (SANTOS et al., 2007).

Entre as enzimas produzidas estão as β -lactamases, coagulases, hialuronidases e catalases, além de DNAses, lipases, proteases e esterases. A regulação da produção destas enzimas é feita por elementos genéticos como plasmídeos e transposons, os quais desempenham papel fundamental nas infecções pelo microrganismo, através do rompimento da membrana citoplasmática das células hospedeiras, ocasionando lise celular. Além disso, acredita-se que tais enzimas forneçam aporte nutricional para o crescimento bacteriano (SILA; SAUER; KOLAR, 2009).

As toxinas produzidas por esse patógeno podem induzir uma resposta imune diferente em cada hospedeiro, sendo responsáveis pelas manifestações clínicas do processo infeccioso e determina o grau de severidade dos sintomas sistêmicos. Dentre as toxinas destacam-se: (IWATSUKI, 2006).

- toxinas citolíticas alfa (α), beta (β), delta (δ), gama(γ) e leucocidina Panton-Valentine (PVL), que causam dano na membrana citoplasmática de leucócitos, eritrócitos, plaquetas, macrófagos e fibroblastos do hospedeiro através de lise osmótica;
- toxinas esfoliativas A e B, promovem a clivagem do estrato granuloso da epiderme, causando síndromes cutâneas severas como por exemplo a síndrome da pele escaldada e impetigo bolhoso;
- enterotoxinas (A, B, C, D, E, G, H, I), são toxinas protéicas pirogênicas, termoestáveis, responsáveis pela intoxicação alimentar, podendo provocar vômitos e diarreias;

- toxina-1 da síndrome do choque tóxico (TSST-1), a qual provoca febre, choque e envolvimento de sistemas orgânicos múltiplos, incluindo erupção cutânea descamativa.

1.2 Resistência aos antimicrobianos

Uma das maiores preocupações de saúde pública enfrentado nas últimas décadas foi o agravamento da resistência a antimicrobianos em populações bacterianas, principalmente no ambiente hospitalar, que originam problemas clínicos e epidemiológicos, complicando consideravelmente o tratamento destas infecções (SAVI; COL; ONOFRE, 2009; MIMICA, 2012; MISHRA, 2012).

A resistência é na maioria das vezes, adquirida a partir de fontes externas, por transferência horizontal de genes (CHAMBERS; DELEO, 2009). A prescrição de terapia antimicrobiana prolongada nos pacientes e o uso empírico podem resultar no aumento de cepas multirresistentes devido à pressão seletiva dos microrganismos, contribuindo ainda para este fenômeno a descontinuidade ou falta de adesão ao tratamento pelos pacientes (ANDRADE; LEOPOLDO; HAAS, 2006; RATTI; SOUSA, 2009).

Várias cepas infecciosas têm apresentado resistência aos antibióticos mais utilizados na prática clínica, tornando necessários uma vigilância global e um controle rígido no uso de antimicrobianos, além de aumentar as pesquisas a fim de compreender melhor os mecanismos subjacentes à patogênese e resistência antimicrobiana (CHAMBERS; DELEO, 2009).

O *S. aureus* possui uma expressiva capacidade de adquirir resistência aos antibióticos. As infecções causadas por esse patógeno têm ocorrido em surtos de epidemias ou pandemias relatadas a partir dos anos 60 (CHAMBERS, DELEO 2009; DELEO, CHAMBERS, 2009).

1.3 Resistência à penicilina

Descoberta em 1928, pelo médico e bacteriologista escocês Alexander Fleming, a penicilina é um antibiótico natural derivado de um fungo, o *Penicillium notatum*, disponível como fármaco desde 1941, sendo o primeiro antibiótico a ser empregado com sucesso (DAUM, 2007).

Com a introdução da penicilina, o prognóstico dos pacientes com infecções causadas por *S. aureus* melhorou significativamente (LOWY, 2003), entretanto, em 1942 já foram relatadas cepas de *S. aureus* resistentes. (CHAMBERS; DELEO, 2009; SOUSA et al., 2011). A resistência a esse antibiótico foi detectada inicialmente em cepas hospitalares e, depois, na comunidade. Porém, as taxas de resistência tanto hospitalares como comunitárias chegaram a 90% e 70%, respectivamente, no final dos anos 1960 em alguns países da Europa (JESSEN, 1969). Atualmente, a maioria das cepas de *S. aureus* é resistente à penicilina (GARCÍA-SÁNCHEZ et al, 2012).

O gene que codifica a produção de β -lactamases é chamado de *blaZ*, normalmente localizado em um plasmídeo ou em um transposon. As β -lactamases hidrolisam e inativam o anel β -lactâmico da penicilina, essencial para sua atividade antimicrobiana, sendo que a sua expressão é induzida na presença desses antibióticos (CHAMBERS; DELEO, 2009; PLATA; ROSATO; WEGRZYN, 2009).

1.4 *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA)

Na década de 1950, foi isolado o ácido 6-amino-penicilânico tornando possível a produção de penicilinas semi-sintéticas, englobando agentes resistentes à ação hidrolítica das β -lactamases. Oxacilina e meticilina foram os primeiros agentes disponíveis para uso clínico que solucionaram o problema causado pela resistência do *S. aureus* à penicilina temporariamente (MIMICA, 2012).

Em 1961 foi relatado o primeiro caso de *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) (SENER, 2013). A partir desse fato, se reconheceu a notória propriedade de multirresistência deste patógeno, intrínseca a todos os antibióticos β -lactâmicos,

fazendo com que as opções terapêuticas se tornassem limitadas, além de estarem associadas ao aumento da morbidade, mortalidade e nos custos do tratamento (STEFANI, 2010; DE KRAKER, 2011; MCKINNON, 2011).

1.4.1 Resistência à meticilina / Gene *mecA*

A resistência causada pelo MRSA aos β -lactâmicos em utilização clínica ocorre devido a expressão de uma proteína ligadora de penicilina (PBP) alterada, denominada PBP2a ou PBP2' a qual é codificada pelo gene *mecA* (DREISBACH et al., 2010; ITO et al., 2012; MONECKE, 2013). Estas enzimas são responsáveis pela estabilidade e integridade da parede celular durante o crescimento bacteriano e processo de divisão, atuando na síntese dos peptidoglicanos (MONTE, 2005).

A PBP2a é uma proteína que apresenta alto peso molecular (78kDa), sendo reconhecida por apresentar baixa afinidade aos β -lactâmicos. Cepas bacterianas se tornam resistentes à oxacilina pois conseguem crescer em concentrações de antibiótico que inativariam todas as PBPs. Assim, os β -lactâmicos tornam-se incapazes de inativar as enzimas e com isso não irão interferir no processo de síntese da parede bacteriana (GELATTI et al., 2009; PLATA; ROSATO; WEGRZYN, 2009).

O gene *mecA* é carregado em um elemento genético móvel denominado cassete cromossômico estafilocócico *mec* (*Staphylococcal Cassette Chromosome - SCCmec*) (IWG-SCC, 2009). Além disso, a presença de *SCCmec* pode ser associado à genes de resistência adicionais, que possuem elementos como transposons e plasmídeos, conferindo resistência a outras classes de antimicrobianos (MALACHOWA; DELEO, 2010).

Mecanismos de resistência à meticilina/oxacilina menos comuns podem ser encontrados em cepas de *S. aureus* com resistência *borderline* à oxacilina (*Borderline Oxacillin Resistant Staphylococcus aureus* - BORSA) mediada por plasmídeo, que se caracterizam pela hiperprodução de β -lactamases. Além desse mecanismo também são conhecidas cepas *Modified Penicillin Binding Protein Staphylococcus aureus* (MODSA), que produzem PBPs modificadas, que não a PBP2a. BORSA e MODSA apresentam graus diferentes de afinidade pelos β -

lactâmicos e ausência do gene *mecA* em seus cromossomos bacterianos (ROSSI; ANDREAZZI, 2005).

1.4.2 *Staphylococcal Cassette Chromosome (SCC_{mec})*

Uma análise comparativa de três genomas de *S. aureus* revelou que a plasticidade nas espécies é conferida através da transferência horizontal de elementos genéticos grandes e de origem desconhecida, que se inserem no genoma estafilocócico (ITO et al. 2003). Devido a sua evolução e proteção contra pressão seletiva, as cepas de MRSA adquiriram e integraram ao seu genoma um elemento genético móvel de 21 a 67 kb, denominado *Staphylococcal Cassette Chromosome (SCC_{mec})* (MA et al., 2002). O *SCC_{mec}* é considerado uma ilha genômica que está inserida na porção final 3' de uma região de fase aberta de leitura (*orf*, *open reading frame*) denominada *orfX*, localizada próxima à origem de replicação de *S. aureus*, cuja função foi determinada há pouco tempo, sendo caracterizada como um rRNA 23S metiltransferase (CHAMBERS; DELEO, 2009; SHORE, 2011)

A partir do descobrimento da primeira cepa MRSA, outros tipos de *SCC_{mec}* foram identificados através do seqüenciamento de nucleotídeos. O gene *mecA* está localizado no *SCC_{mec}*, caracterizado pela presença de repetições terminais diretas e invertidas e por dois elementos genéticos essenciais (complexo *mec* e complexo *ccr*) e as regiões *junkyard* (IWG-SCC, 2009).

O complexo *mec* é composto por elementos estruturais como as sequências de inserção, que são responsáveis pela codificação de genes adicionais que irão determinar resistência (IS431 e IS1272), genes reguladores da expressão de PBP2a que codificam um receptor de membrana (*mecRI*) e um gene repressor (*mecI*), além do *mecA*, que codifica a resistência a β -lactâmicos através da expressão da PBP2a (IWG-SCC, 2009).

O complexo gênico *ccr* contém os genes *ccrA* e *ccrB*, que aparecem juntos e *ccrC*, que codificam as recombinases A, B e C da família invertase/resolvase, responsáveis pela motilidade do *SCC_{mec}* (HIGUCHI et al., 2008; CHLEBOWICZ et al., 2010, 2011).

Outra região presente no *SCCmec* é denominada *junkyard* (J), que contém vários genes que codificam resistência para antibióticos não β -lactâmicos e metais pesados, alguns dos quais são oriundos de plasmídeos ou transposons (IWG-SCC, 2009). A classificação dos tipos de *SCCmec* é determinada pelo complexo *mec* e pelo alotipo *ccr*, sendo que até o momento foram caracterizados 11 tipos (I -XI) (IWG-SCC, 2009; TURLEJ, 2011).

1.4.2.1 Tipos de *SCCmec*

Atualmente já foram caracterizados onze tipos de *SCCmec*. O *SCCmec* tipo I foi relatado primeiramente no Reino Unido em 1960 Este clone é conhecido como o clone Arcaico e espalhou-se pelo mundo na mesma década. Em 1982 no Japão, foi identificado um MRSA carreador do *SCCmec* tipo II, chamado de clone New York/Japan e logo disseminou-se para diversos países. O *SCCmec* tipo III foi identificado em 1985 na Nova Zelândia (DEURENBERG; STOBBERINGH, 2009). No Brasil o clone epidêmico brasileiro (BEC) carrega esse tipo de *SCCmec*, clone de MRSA mais comum circulando em hospitais brasileiros (MIMICA, 2013).

Vários clones de MRSA carreadores de *SCCmec* tipo IV foram relatados no mundo desde o início dos anos 90. Em 2004, *SCCmec* tipo V foi descrito na cepa de MRSA chamada WIS, na Austrália. Em Portugal foi observado entre isolados de MRSA o *SCCmec* tipo VI, sendo a cepa identificada como HDE288. O *SCCmec* tipo VII foi observado em isolados no Taiwan (DEURENBERG; STOBBERINGH, 2009). Os *SCCmec* dos tipos IX e X foram descritos por Li e colaboradores (2011), apresentando resistência a metais. O tipo XI foi caracterizado recentemente na Irlanda (SHORE et al., 2011).

Os *SCCmec* tipos I, IV, V, VI e VII possuem o gene *mecA* como o único determinante de resistência, apresentando resistência apenas a antibióticos β -lactâmicos. Já os tipos II e III têm múltiplos determinantes para a resistência, como plasmídeos integrados (pUB110, pl258 e pT181) e transposons (Tn554 e ψ Tn554), causando a multirresistência, normalmente encontrada em cepas hospitalares (ZETOLA et al., 2005; BOYLE e DAUM, 2007; DEURENBERG, R.H.; STOBBERINGH, 2009).

A transferência horizontal dos SCC*mec* tipo II e III é mais difícil quando comparados com o tipo IV devido ao seu maior tamanho, e a disseminação destes elementos ocorre principalmente como resultado da pressão seletiva da exposição a antibióticos (ZETOLA et al., 2005; BOYLE e DAUM, 2007). As cepas SCC*mec* tipo IV por apresentar menor tamanho e ausência de outros genes de resistência, são provavelmente mais móveis, conferindo uma vantagem fora da pressão relacionada a antibióticos em ambiente hospitalar, assim sua disseminação torna-se mais rápida na comunidade (COHEN, 2007).

1.4.3 MRSA hospitalar (HA-MRSA) e MRSA comunitário (CA-MRSA)

Existem diferenças consideráveis entre CA-MRSA e HA-MRSA em termos de tipagem do SCC*mec*, distribuição de genes de toxinas, fatores de risco e susceptibilidade aos antimicrobianos (DRYDEN, 2008).

Infecções definidas como àquelas desenvolvidas em indivíduos hospitalizados por um período superior a 48 horas; em indivíduos submetidos à terapia intravenosa ambulatorial; ou em pacientes com hospitalização recentes em clínicas de hemodiálise ou serviços de cuidados prolongados são geralmente caracterizadas como infecções por HA-MRSA (ROSA, 2009).

HA-MRSA tem sido relacionado com SCC*mec* dos tipos I, II e III, apresentando estruturas grandes que carregam vários elementos genéticos adicionais. Além disso, podem conter fatores de virulência e elementos de resistência para numerosas classes de antibióticos, incluindo macrolídeos, lincosamidas, aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, tetraciclina e sulfonamidas (GELATTI et al., 2009; ROSA, 2009).

Cepas de MRSA foram consideradas primeiramente agentes patogênicos causadores de infecções adquiridas em hospitais (HA-MRSA), porém, as infecções por CA-MRSA têm sido cada vez mais relatadas (SONG et al., 2011). A partir dos anos 90 começaram a surgir relatos em todo mundo de infecções por CA-MRSA em pacientes sem fatores de risco identificáveis para aquisição de MRSA (GEMMELL et al., 2006).

Os critérios estabelecidos pelo Centers for Disease Control and Prevention (CDC) para o diagnóstico de CA-MRSA incluem: pacientes que não foram internados em hospitais no ano anterior à infecção; que não foram submetidos a procedimentos médicos como diálise, cirurgia ou cateter; que apresentaram cultura positiva para MRSA até 48 horas após admissão no hospital; que não possuem histórico de infecção ou colonização por MRSA.

Além de infectarem indivíduos sem fatores de risco aparentes, essas cepas apresentam alta prevalência dos genes que codificam a produção da exotoxina leucocidina Panton-Valentine (PVL), a qual está associada a infecções graves de pele e tecidos moles, bem como a pneumonia necrotizante (MIMICA; MENDES, 2007).

Cepas CA-MRSA são em geral sensíveis aos antimicrobianos (entre 85% e 100%) como clindamicina, gentamicina, ciprofloxacino, sulfametaxazol/trimetoprim e vancomicina; mostrando-se resistentes apenas à oxacilina e a outros β -lactâmicos. A diferença no perfil de resistência entre cepas HA-MRSA e CA-MRSA pode ser explicada pelo tamanho e distribuição dos cassetes cromossômicos (*SCCmec*) que contém os determinantes de resistência à oxacilina. Os *SCCmec* tipos IV e V encontrados nas cepas CA-MRSA, são os menores, o que facilitaria a perda dos genes de resistência a diversos antibióticos (SANTOS et al., 2007).

	HA-MRSA	CA-MRSA
Epidemiologia	Idosos, imunocomprometidos, com fatores de risco associados a cuidados médicos	Jovens e crianças saudáveis, atletas, sem fatores de risco
Clínica	Infecções de trato respiratório, sítio operatório, bacteremias (invasivo)	Infecções de pele e tecidos moles, pneumonia necrotizante
Fatores de risco	Hospitalização prolongada, uso de antimicrobiano por longo período, hemodiálise, dispositivos intravasculares	Contato físico, uso de drogas intravenosas, lesões de pele
Fenótipo de	Na maioria das vezes são	Somente aos β -lactâmicos

resistência	multirresistentes (β -lactâmicos e não- β -lactâmicos)	
Marcadores genéticos	PVL em < 5% dos isolados; SCC <i>mec</i> tipos I, II e III (principalmente)	PVL em > 95% dos isolados; SCC <i>mec</i> tipos IV e V

Quadro 1: Principais diferenças entre HA-MRSA e CA-MRSA

Fonte: Distribuição dos SCC*mec* tipos I, II, III e IV em *Staphylococcus aureus* metilicina-resistente isolados de pacientes do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Reiter 2009.

1.4.4 MRSA pelo mundo

Após o surgimento de cepas com resistência a metilicina, o MRSA tornou-se um dos principais causadores de infecções nosocomiais bem como na comunidade, atingindo proporções elevadas no mundo todo. (ISOBE, 2012; MIMICA, 2012).

Na América Latina o MRSA é a principal causa de infecções hospitalares, sendo que as infecções comunitárias estão aumentando com frequência (GUZMÁN-BLANCO, 2009). Em um estudo realizado por González et al., em 2012 foram analisados 3.126 isolados de *S. aureus* de diversos países da América Latina no período de 2004 a 2010, onde 1.467 (46,9%) foram identificados como resistentes a metilicina. O maior número de *S. aureus* foi encontrado no México (n=846), Argentina (n=740) e Colômbia (n=445). No Brasil essa taxa foi de 52,7% entre 2005 e 2010, sendo que dos 241 *S. aureus* isolados, 127 eram MRSA (GARZA-GONZÁLEZ, DOWZICKY, 2013).

Pesquisa realizada por Perez et al., em três Hospitais de Porto Alegre no ano de 2006, mostrou uma prevalência de 48,7% de infecções por *S. aureus*, sendo 41,3% causadas por MRSA (PEREZ et al., 2007).

O relatório do *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC), do ano de 2010 estimou uma prevalência global de MRSA na Europa de 24,4% (ECDC, 2011). Entretanto, diferenças significativas entre os diversos países foram observados, sendo a prevalência consideravelmente mais baixa (<5%) na Escandinávia e na Holanda, e mais elevada (> 25%) no sul e no leste da Europa. Em

2008, Portugal foi o único país europeu cuja prevalência de MRSA foi superior a 50% (EUROPAN, 2008). Em pesquisas realizadas nos EUA a prevalência global de MRSA foi de 6,64% (JARVIS; JARVIS; CHINN, 2012).

1.5 Testes para detecção da resistência à oxacilina

1.5.1 Fenotípicos

Diferentes métodos laboratoriais têm sido empregados para a detecção da resistência à oxacilina no *S. aureus*. Muitas vezes, essa detecção pode se tornar difícil, principalmente devido ao fenômeno da heterorresistência (MIMICA, 2012).

O exacerbado aumento na resistência a diferentes antimicrobianos tem dificultado sobremaneira as opções terapêuticas. Assim, a realização adequada de testes de susceptibilidade a essas drogas é vital para garantir o adequado tratamento dessas infecções (MIMICA, 2012).

1.5.1.1 Difusão do disco

O teste de difusão do disco é historicamente o mais utilizado, permite a classificação da maioria das cepas bacterianas como sensíveis, intermediárias ou resistentes a uma variedade de agentes antimicrobianos (JORGENSEN, 2003). O método apresenta várias vantagens como: fácil reprodução e execução, os reagentes utilizados são de baixo custo e não requer equipamentos especiais. Devido à ocorrência do fenômeno da heterorresistência, um índice não desprezível de erro é evidenciado ao empregar essa metodologia (ANVISA, 2010).

O teste consiste na aplicação de um inóculo padronizado de bactérias (aproximadamente $1-2 \times 10^8$ UFC/mL) à superfície de uma placa de ágar Mueller-Hinton. Discos de papel-filtro impregnados com uma concentração fixa de antibiótico são aplicados na superfície inoculada do ágar. As placas são incubadas por 16-18

horas em temperatura de $35^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$. Os diâmetros das zonas de inibição de crescimento ao redor de cada disco de antibiótico são medidos em milímetros analisando-se a placa com luz refletida (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2010).

O teste com oxacilina, até meados da década passada, era o teste de escolha. Porém, diversos autores demonstraram a boa acurácia do teste de difusão-disco com cefoxitina para prever resistência à oxacilina, possivelmente por induzir de maneira mais potente a expressão do gene *mecA* (MIMICA, 2007; BROEKEMA et al., 2009). Em 2006 o Clinical and Laboratory Standard Institute incluiu esse teste em suas recomendações, e em 2007 modificou os pontos de corte com o objetivo de aumentar a sensibilidade do método (CLSI, 2007).

O disco de cefoxitina produz, para leitura, uma zona de inibição de fácil interpretação, podendo ser determinada tanto com uso de luz transmitida como da refletida e sofre menos interferência pelo padrão heterogêneo da resistência à oxacilina (MATHEWS et al., 2010).

O CLSI preconiza para o *S. aureus* a utilização de disco de cefoxitina 30 μg ou oxacilina 1 μg para a detecção de resistência à oxacilina mediada pelo gene *mecA*. De acordo com o resultado da cefoxitina, é reportado o resultado da oxacilina como suscetível ou resistente (CLSI, 2011; CLSI 2012).

Os MRSA devem ser relatados também como resistentes a outros β -lactâmicos, como penicilinas, carbapenêmicos, cefalosporinas e combinações de β -lactâmicos com inibidores de β -lactamases, independente dos resultados dos testes *in vitro* com esses antimicrobianos, pelo fato de apresentarem o mesmo mecanismo de resistência, além dos testes com esses antimicrobianos demonstrarem menor acurácia como preditivos da presença do gene *mecA* do que os testes com oxacilina ou cefoxitina (CHAMBERS, 1997; VELASCO et al., 2005; CLSI, 2012).

1.5.1.2 Detecção da concentração inibitória mínima

Quando se tem a necessidade de quantificar a concentração mínima de um agente antimicrobiano, em microgramas por mililitro ($\mu\text{g}/\text{mL}$), a alternativa é o emprego da metodologia para detecção de concentração inibitória mínima (CIM) necessária para inibir o crescimento de um microrganismo (ROSSI; ANDREAZZI,

2005). Os agentes antimicrobianos são testados em diluições seriadas múltiplas de dois, e a menor concentração que inibe o crescimento visível de um microrganismo é considerada a CIM (CLSI, 2011). Essa técnica inclui diluição em ágar e em caldo (macrodiluição e microdiluição), e de gradiente de difusão em ágar (Etest®, AB Biodisk, Solna, Suécia). Embora esses métodos possibilitem uma avaliação quantitativa da resistência à oxacilina, além de ser um método que pode ser utilizado como confirmatório em isolados com padrão de suscetibilidade duvidoso ou de difícil diagnóstico, parecem não ter acurácia significativamente maior para detectar o gene *mecA* do que os testes fenotípicos qualitativos, e ainda necessitam de longo período de execução e intensa carga de trabalho (MIMICA; MENDES, 2007).

1.5.1.3 Teste em equipamentos automatizados

Os sistemas automatizados são opções de testes rápidos de sensibilidade aos antimicrobianos. Existem vários equipamentos com esta finalidade, destacando-se Vitek® (bioMérieux Vitek, USA) MicroScan Walkaway® (Dade Behring), Sensititre ARIS® (Radiometer America, USA) e ATB-plus® (bioMérieux, France). Alguns estudos evidenciaram taxas de sensibilidade e especificidade comparáveis a dos testes de disco-difusão, enquanto outros encontraram baixa acurácia (SWENSON, 2001; FELTEN, 2002; SWENSON; TENOVER, 2005).

O sistema Vitek 2® é um dos métodos mais utilizados entre os aparelhos automatizados, por possuir monitoramento contínuo do crescimento dos microrganismos e um algoritmo que calcula a CIM cinética (BÉMER, 2005). Em relação ao Vitek® e o MicroScan®, sua acurácia foi avaliada em alguns estudos. Porém, é difícil comparar os resultados desses trabalhos, visto que há mudanças contínuas dos softwares e diferentes cartões ou painéis são disponibilizados.

1.5.2 Genotípicos

1.5.2.1 PCR para detecção do gene *mecA*

Nos últimos anos o método da CIM foi substituído por métodos moleculares que detectam o gene *mecA*. A detecção desse gene pela Polymerase Chain Reaction (PCR) é considerada como método padrão ouro para confirmação de isolados oxacilina resistentes, incluindo aqueles com resistência heterogênea. Entretanto, o uso desses ensaios é restrito a centros de referência, e não são empregados como testes de rotina em laboratórios clínicos de microbiologia (RAHBAR et al., 2006; ADALETI et al.,2008).

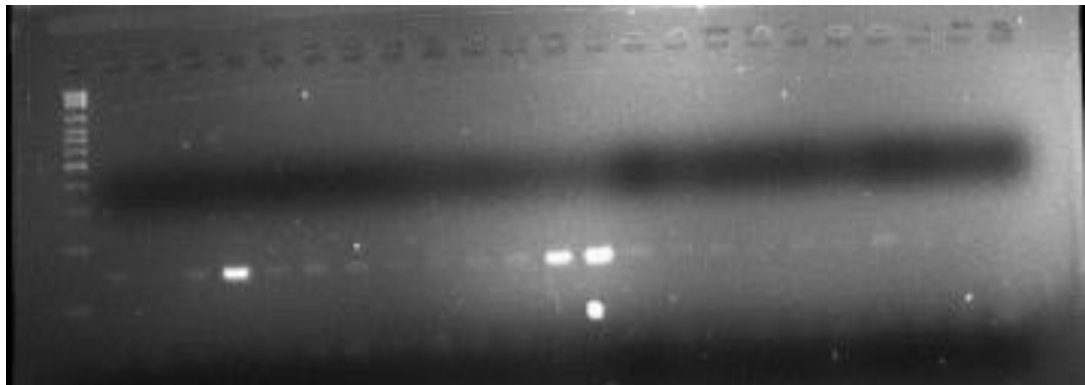


Figura 2: Gel de agarose evidenciando amostras de *S. aureus mecA* positivas (145pb).

1.6 Justificativa

O aumento crescente da frequência de infecções causadas pelo *S. aureus* aliado a elevadas taxas de amostras resistentes à meticilina/oxacilina torna-se de extrema importância à investigação epidemiológica e controle da disseminação deste patógeno.

A resistência antimicrobiana tem sido reconhecida como um importante problema de saúde pública há muitas décadas, sendo que um dos microrganismos

mais virulentos é o *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), causando infecções tanto de origem hospitalar como comunitária.

Uma detecção precisa de resistência à meticilina em *S. aureus* é determinante para garantir um tratamento eficaz para o paciente infectado e evitar sua disseminação. Os métodos fenotípicos para o diagnóstico desta resistência são de fácil execução e tempo para realização relativamente curto (24 horas). Porém, em alguns estudos, um índice não desprezível de erro já foi demonstrado.

De acordo com o CLSI o emprego do método de difusão do disco utilizando cefoxitina ou oxacilina é uma alternativa fidedigna para detecção de MRSA nas cepas portadoras do gene *mecA*. O reconhecimento destas cepas, sugerindo esse determinante genético é bastante importante, visto o aspecto fulminante da infecção desenvolvida. A presença de características fenotípicas e genéticas distintas entre as cepas de *Staphylococcus aureus* fazem da investigação clínica e do cultivo laboratorial, apoiado em técnicas de biologia molecular um conjunto cada vez mais importante na contenção deste patógeno.

No Brasil, a ampla distribuição e prevalência do MRSA indicam a necessidade de um programa de vigilância que desenvolva estratégias para melhorar o controle e tratamento de colonização e infecção por MRSA.

1.7. Objetivos

1.7.1 Objetivo geral

Caracterizar através de metodologias fenotípicas e genotípicas isolados de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) presentes em amostras clínicas de pacientes internados de maio a dezembro de 2011, no Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM).

1.7.2 Objetivos específicos

- Analisar os isolados de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina (MRSA) através de métodos fenotípicos manuais e automatizado;
- Determinar o gene *mecA* através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).
- Determinar os parâmetros metodológicos como: especificidade, sensibilidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo dos testes utilizados nesse estudo.
- Determinar a prevalência de MRSA no período estudado

2. MANUSCRITO

O referido manuscrito será submetido à revista: Diagnostic Microbiology & Infectious Disease

Qualis Capes: B1

Detecção de cepas resistentes à meticilina: Estudo comparativo de metodologias fenotípicas convencionais e genotípica em *Staphylococcus aureus*

Lívia Gindri¹, Mônica de Abreu Rodrigues¹, Daniel Ângelo Sganzerla Graichen², Rosmari Hörner^{1,3}

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

²Professor Adjunto do Departamento de Zootecnia e Ciências Biológicas, UFSM

³Professora Associada do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas (DACT), UFSM

RESUMO

Introdução: *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) emergiu como uma das principais causas de infecções nosocomiais e comunitárias, sendo que o emprego de metodologias capazes de detectar esta resistência de forma rápida e precisa, torna-se imprescindível no diagnóstico clínico. **Objetivo:** O objetivo desse estudo foi comparar testes fenotípicos convencionais com o genotípico, baseado na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), para detectar cepas MRSA. **Metodologia:** Um total de 139 amostras de *S. aureus* foram analisadas através de métodos fenotípicos manuais e automatizado e comparadas com a detecção do gene *mecA* por PCR. **Resultados:** Dentre as 139 amostras, 37 (26,6%) apresentaram o gene pesquisado. O disco de oxacilina apresentou sensibilidade de 62,2% e especificidade de 95,1%, enquanto que para o disco de cefoxitina estes parâmetros foram 67,6% e 94,1%, respectivamente. O método automatizado foi o

que obteve as maiores percentagens de sensibilidade (67,6%) e especificidade (96,1%). Algumas divergências foram observadas quando comparamos os métodos fenotípicos com a PCR. **Conclusão:** A combinação de metodologias pode ser considerada como uma alternativa eficiente no diagnóstico de infecções causadas por MRSA.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*, PCR, métodos fenotípicos, MRSA.

INTRODUÇÃO

Atualmente, o *Staphylococcus aureus* representam uma importante preocupação em várias instituições de cuidados em saúde (BROEKEMA et al., 2009). *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) surgiu logo após a introdução da meticilina na prática clínica, tornando-se uma das principais causas, tanto de infecções nosocomiais quanto comunitárias (SHORE et al., 2011; ISOBE et al., 2012). O primeiro relato de MRSA ocorreu em 1961 e desde a sua descoberta um contínuo aumento na sua prevalência tem sido observado em todo mundo, ocasionando altas taxas de mortalidade e morbidade (ALÓS, 2008; SHORE, 2011; SENER, 2013).

Alguns mecanismos podem explicar a resistência à meticilina em *Staphylococcus* spp.. O tipo de resistência mais frequente se deve à presença do gene *mecA*, que confere baixa afinidade aos antibióticos beta-lactâmicos por codificar a produção de proteínas ligadoras de penicilina alteradas (PBP2a ou PBP2') (CHAMBERS; DELEO, 2009). A determinação deste gene pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) é considerada o padrão ouro na detecção de cepas MRSA (MIMICA et al., 2007; ANAND et al., 2009), porém é um método demorado e de alto custo, o que dificulta a sua utilização pela maior parte dos laboratórios de rotina (PRAMODHINI et al., 2011).

Outros mecanismos, porém mais raros, podem ser encontrados em cepas de *S. aureus* com resistência boderline à oxacilina (Borderline Oxacillin Resistant *Staphylococcus aureus* - BORSA), que se caracterizam pela hiperprodução de beta-lactamases e também em cepas conhecidas como Modified Penicillin Binding Protein *Staphylococcus aureus* (MODSA), que produzem PBPs modificadas, que

não a PBP2a. Tanto BORSA quanto MODSA possuem afinidade variada pelos beta-lactâmicos e ausência do gene *mecA* (ROSSI; ANDREAZZI, 2005; SANTHOSH et al., 2008).

O objetivo desse estudo foi avaliar os testes de difusão dos discos de cefoxitina e oxacilina e de microdiluição em caldo da oxacilina, como marcadores fenotípicos para o MRSA, e compará-los com a detecção molecular do gene *mecA* por PCR.

METODOLOGIA

Coleta e identificação das amostras de *S. aureus*

Este trabalho trata-se de um estudo prospectivo, onde foram coletadas 139 amostras de *S. aureus*, isoladas de diversos espécimes clínicos de diferentes pacientes do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM), de maio a dezembro de 2011. Apenas uma amostra por paciente foi incluída nesta pesquisa, submetida ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Santa Maria e aprovado sob número 0117.0.243.000-08.

Os *S. aureus* foram identificados no Laboratório de Análises Clínicas do HUSM, através de provas fenotípicas manuais e automatizada (MicroScan® - Siemens) (KONEMAN, 2008).

Método manual de difusão do disco de cefoxitina e oxacilina

Os isolados clínicos obtidos foram submetidos a testes fenotípicos utilizando-se a técnica de difusão do disco (Kirby-Bauer) de cefoxitina 30 µg e oxacilina 1 µg, para classificar a cepa como sensível ou resistente à oxacilina (CLSI, 2011).

Após a reativação dos isolados em ágar Tripton de Soja (TSA) e incubação por 18-24hs, em estufa bacteriológica, a 35 °C ± 2 °C, ar ambiente, foi preparado o inóculo bacteriano, em solução fisiológica estéril, ajustando-se sua turbidez com a escala 0,5 de MacFarland (1-2 x 10⁸ UFC/mL). Esta suspensão foi semeada com

swab estéril em placas de petri contendo ágar Mueller Hinton, sendo que posteriormente foram dispostos os discos de cefoxitina e oxacilina e reincubadas nas condições anteriormente citadas. A leitura foi realizada após 16-18 horas de incubação para a oxacilina, sendo consideradas sensíveis as cepas que apresentaram halos de inibição ≥ 13 mm; intermediárias de 11-12 mm e resistentes com halos ≤ 10 mm. Já para a cefoxitina, a leitura foi feita após 24 horas de incubação, considerando-se sensíveis as cepas com halos ≥ 22 mm e resistentes ≤ 21 mm. O controle de qualidade dos discos foi realizado utilizando-se a cepa de *S. aureus* ATCC 25923.

Método automatizado de microdiluição em caldo da oxacilina

Todos os isolados foram testados segundo esta metodologia automatizada, utilizando-se o Painel Combo gram-positivos - PC 29, do aparelho MicroScan® - Siemens, de acordo com as normas preconizadas pelo CLSI (CLSI, 2011).

Detecção do gene *mecA*

A extração do DNA foi realizada no laboratório de Biologia Molecular da UFSM, na cidade de Palmeira das Missões, RS. Seguiu-se o protocolo modificado desenvolvido por Oliveira et al (OLIVEIRA et al., 2009). Na determinação do gene *mecA* foi utilizado como iniciador o seguinte par de primers: *mecA_f* (AGT TAG ATT GGG ATC ATA GCG) e *mecA_r* (CGA TGC CTA TCT CAT ATG CTG) (Ludwig Biotec®).

Cada amostra de DNA (2 μ L) foi misturada à 2,0 μ L de uma mistura de dNTPs, 2,5 μ L de buffer + cloreto de magnésio ($MgCl_2$), 0,2 μ L de *Taq* Polimerase (Neogen®) e 1,25 μ L de cada primer. O volume foi completado com água Mili Q até que o volume final de 25 μ L fosse atingido.

As condições empregadas para a amplificação do DNA foram: desnaturação por 4 min a 94 °C, seguido por 30 ciclos de 30s a 94 °C, anelamento a 60 °C por 30s, extensão a 72 °C por 60s e uma extensão final de 4 min a 72 °C.

O produto amplificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,5% com brometo de etídio (0,5 µg/mL); a 80 V, durante 40min e visualizado em luz UV (312 nm), com auxílio de transiluminador.

RESULTADOS

Dos 139 isolados clínicos de *S. aureus* testados para o gene *mecA* pela técnica de PCR, 37 cepas foram consideradas MRSA por apresentarem este gene (taxa de prevalência de 26,6%). A tabela comparativa de sensibilidade e especificidade, juntamente com os valores preditivos positivo e negativo de todos os métodos é demonstrada na Tabela 1.

Tabela 1 - Comparação da eficácia de diferentes métodos na detecção de MRSA

Métodos	Amostras <i>mecA</i> positivas	Especificidade	Sensibilidade	VPP	VPN
DD de Oxacilina	23	95,1%	62,2%	82,1%	87,2%
DD de Cefoxitina	25	94,1%	67,6%	80,6%	88,9%
Automação	25	96,1%	67,6%	86,2%	89,1%
PCR	37	100%	100%	100%	100%

As Tabelas 2 e 3 evidenciam as discrepâncias existentes entre os métodos testados, em algumas amostras, comparando-se com a PCR.

Tabela 2 – Amostras *mecA* negativas com discrepância nos resultados dos métodos fenotípicos

Nº de amostras	DD Cefoxitina	DD Oxacilina	Automação	PCR
3	S	R	S	-
2	R	S	S	-
2	S	S	R	-
1	R	S	R	-
1	R	R	S	-
1	R	R	R	-

Tabela 3 – Amostras *mecA* positivas com discrepância nos resultados dos métodos fenotípicos

Nº de amostras	DD Cefoxitina	DD Oxacilina	Automação	PCR
6	S	S	S	+
4	S	S	R	+
3	R	S	S	+
2	S	R	S	+
1	R	R	S	+
1	R	S	R	+

DISCUSSÃO

A determinação precisa da resistência à meticilina é de extrema importância na rápida identificação de infecções causadas por *S. aureus*, em especial dos MRSA (ANAND et al., 2009), não somente para a escolha da antibioticoterapia adequada, mas também para o controle de sua disseminação (BROEKEMA et al., 2009; PRAMODHINI et al., 2011).

A detecção do gene *mecA* é considerado o padrão ouro para a confirmação de MRSA, por ser uma técnica eficiente em detectar este gene. Assim como outros autores, nós consideramos a PCR como método de referência para os testes fenotípicos (MIMICA et al., 2007; WILSON et al., 2007; ANAND et al., 2009). Em nosso estudo foi confirmada a presença deste gene em 37 das 139 amostras de *S. aureus* isoladas. Outros trabalhos que também utilizaram a PCR como método

referência, demonstraram boa precisão desta técnica no que se refere à identificação de cepas resistentes (MIMICA et al., 2007; KAYA et al., 2009; DATTA et al., 2011; PILLAI et al., 2012).

Diversas técnicas de identificação dos MRSA são utilizadas atualmente nos laboratórios de rotina, com destaque para as fenotípicas. O teste de difusão do disco, por se tratar de um método prático e de baixo custo, tem sido o mais empregado (MIMICA, 2012). Em relação à esta metodologia, nossos resultados demonstraram sensibilidade de 62,2% para o disco de oxacilina e 67,6% para o disco de cefoxitina. A especificidade dos métodos foi de 95,1% para a oxacilina e 94,1% para a cefoxitina. Vários estudos tem demonstrado a superioridade da cefoxitina em detectar MRSA (BROEKEMA et al., 2009; DATTA et al., 2011; PRAMODHINI et al., 2011; SANGEETHA et al., 2012), possivelmente por induzir de forma mais potente a expressão do gene *mecA* do que o disco de oxacilina (MIMICA; MENDES, 2007; MIMICA et al., 2007; BROEKEMA et al., 2009).

No que se refere à técnica de microdiluição em caldo por sistema automatizado (MicroScan®), obtivemos resultados de especificidade e sensibilidade de 96,1% e 67,6%, respectivamente. Estes sistemas são empregados por serem considerados rápidos, no entanto apresentam uma eficácia diagnóstica inferior em relação ao teste de difusão do disco, uma vez que não são influenciados por fatores como temperatura e tempo de incubação e turvação do inóculo (GIL D de M, 2000). Porém, em nossa pesquisa a metodologia automatizada apresentou superioridade em relação a manual em todos os parâmetros analisados.

Algumas divergências puderam ser observadas entre os métodos utilizados. Em dez amostras o gene *mecA* não foi detectado, porém em pelo menos uma técnica fenotípica essas cepas se mostraram resistentes (Tabela 2). Esses resultados justificam-se pelo fato destas cepas possivelmente possuírem outros mecanismos de resistência, como as BORSA ou MODSA (MIMICA, 2012).

Em seis amostras onde o gene *mecA* foi detectado não verificou-se a resistência fenotipicamente por nenhuma metodologia, enquanto que em outras onze amostras *mecA* positivas, a detecção da resistência por métodos fenotípicos foi variável (Tabela 3). A expressão fenotípica da resistência à metilina mediada pelo gene *mecA* pode ser influenciada por diferentes fatores, dentre eles a temperatura, o pH e a osmolaridade (MADIRAJU et al., 1987) assim como a existência de cepas

heterorresistentes (CAVASSINI et al., 1999), o que pode explicar nossos resultados e justificar a sensibilidade e a especificidade dos métodos empregados.

CONCLUSÃO

Concluimos que para a rápida e correta identificação de cepas MRSA na rotina laboratorial, a combinação de metodologias, continua a ser a melhor alternativa, aliada ao diagnóstico clínico. A PCR para identificação do gene *mecA*, apesar de seu custo elevado para a prática microbiológica, poderia ser uma opção naqueles casos onde houvesse divergências entre as técnicas fenotípicas empregadas.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Setor de Microbiologia do HUSM e ao apoio financeiro concedido pela CAPES.

REFERÊNCIAS

BROEKEMA, N. M.; VAN, T. T.; MONSON, T. A.; MARSHALL, S. A.; WARSHAUER, D. M. Comparison of cefoxitin and oxacillin disk diffusion methods for detection of *mecA*-mediated resistance in *Staphylococcus aureus* in a large-scale study. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 47, n. 1, p. 217-219, 2009.

SHORE, A. C.; DEASY, E. C.; SLICKERS, P.; BRENNAN, G.; O'CONNELL, B.; MONECKE, S.; EHRLICH, R.; COLEMAN, D. C. Detection of staphylococcal cassette chromosome *mec* Type XI carrying highly divergent *mecA*, *mecI*, *mecR1*, *blaZ*, and *ccr* genes in human clinical isolates of clonal complex 130 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. ***Antimicrobial Agents and Chemotherapy***, v. 55, n. 8, p. 3765–3773, 2011.

ISOBE, M.; UEJIMA, E.; SEKI, M.; YAMAGISHI, Y.; MIYAWAKI, K.; YABUNO, K.; MASAOKA, M.; HAMAGUCHI, S.; YOSHIOKA, N.; TOMONO, K. Methicillin-resistant

Staphylococcus aureus bacteremia at a university hospital in Japan. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 18, p. 841-847, 2012.

ALÓS, J. I.; GARCÍA-CAÑAS, A.; GARCÍA-HIERRO, P.; RODRÍGUEZ-SALVANÉS. Vancomycin MICs did not creep in *Staphylococcus aureus* isolates from 2002 to 2006 in a setting with low vancomycin usage. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 62, n. 4, p. 773–775, oct. 2008.

SENER, A. G.; KIRDAR, S.; AFSAR, I.; DEMIRCI, M. Evaluation of three methods for detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **World Journal of Translational Medicine**, v. 2, n. 2, aug. 2013.

CHAMBERS, H. F.; DELEO, F. R. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 9, p. 629-641, sept. 2009.

MIMICA, M. J.; BEREZIN, E. N.; CARVALHO, R. L. B.; MIMICA, I. M.; MIMICA, L. M. J.; SÁFADI, M. A. P.; SCHNEIDER, E.; CAIAFFA-FILHO, H. H. Detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from pediatric patients: is the cefoxitin disk diffusion test accurate enough? **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 11, p. 415-417, 2007.

ANAND, K. B.; AGRAWAL, P.; KUMAR, S.; KAPILA, K. Comparison of cefoxitin disc diffusion test, oxacillin screen agar, and PCR for *mecA* gene for detection of MRSA. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 27, n. 1, p. 27-29, 2009.

PRAMODHINI, S.; THENMOZHIVALLI, P. R.; SELVI, R.; DILLIRANI, V.; VASUMATHI, A.; AGATHA, D. Comparison of various phenotypic methods and *mecA* based PCR for the detection of MRSA. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 5, n. 7, p. 1359-1362, nov. 2011.

ROSSI, F.; ANDREAZZI, D. B. Resistência bacteriana: Interpretando o antibiograma. São Paulo: Atheneu, 2005. 118 p.

SANTHOSH, D. V. et al. Phenotypic detection and rate of nasal carriage of heterotypic borderline oxacillin resistant *Staphylococcus aureus* in pre-clinical medical students from Malaysia. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 2, n. 4, p. 985-990, aug. 2008.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**, nineteenth informational supplement, document M100-S21. Wayne, PA, USA: CLSI, 2011.

KONEMAN, E. W. et al. **Diagnóstico Microbiológico - Texto e Atlas Colorido**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008. 1760 p.

OLIVEIRA, L. F. V.; WALLAU, G. L.; LORETO, E. L. S. Isolation of high quality DNA: a protocol combining “rennet” and glass milk. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 2, p. 1-6, abr. 2009.

WILSON S, M.; CAROLA OTTH L, GUSTAVO MEDINA S, LAURA OTTH R, HERIBERTO FERNÁNDEZ J, MARÍA ARCE, ANGELA ZAROR C, VÍCTOR LIZAMA, MÓNICA GIL, ANA MARÍA VON CHRISMAR. Genotipos de *Staphylococcus aureus* con fenotipo meticilino resistente, aislados de pacientes del Hospital Base de Valdivia. *Rev Méd Chile*, vol. 135, p. 596-601, 2007.

KAYA, E. G., KARAKOÇ, E.; YAGCI, S.; YÜCEL, M. Evaluation of phenotypic and genotypic methods for detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **African Journal of Microbiology Research**, v. 3, n. 12, p. 925-929, dec. 2009.

DATTA, P.; GULATI, G.; SINGLA, I.; VASDEVA, H. R.; BALA, K.; CHANDER, J.; GUPTA, V. Evaluation of various methods for the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains and susceptibility patterns. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, p. 1613–1616, 2011.

PILLAI, M. M.; LATHA, R.; SARKAR, G. Detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* by Polymerase Chain Reaction and conventional methods: a comparative study. **Journal of Laboratory Physicians**, v. 4, n. 2, p. 83-88, 2012.

MIMICA, M. J. Atualização sobre detecção laboratorial de resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus aureus*. **Arquivos Médicos do Hospital e da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa São Paulo**, v. 57, p. 129-134, 2012.

SANGEETHA, G.; JAMES, J.; RANJITH, J. Comparison of different phenotypic methods with PCR detection of *mecA* gene for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, p. 495-497, 2012.

MIMICA, M. J.; MENDES, C. M. F. Diagnóstico laboratorial da resistência à oxacilina em *Staphylococcus aureus*. **J Bras Patol Med Lab**, v. 43, n. 6, p. 399-406, dez. 2007.

GIL D de M, M. *Staphylococcus aureus*: Microbiología y aspectos moleculares de la resistencia a meticilina. **Revista Chilena de Infectología**, v. 17, p. 145-152, 2000.

MADIRAJU, M. V. V. S.; BRUNNER, D. P.; WILKINSON, B. J. Effects of temperature, NaCl, and methicillin on penicillin-binding proteins, growth, peptidoglycan synthesis, and autolysis in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 31, n. 11, p. 1727–1733, nov. 1987.

CAVASSINI, M. et al. Evaluation of MRSA-Screen, a simple anti-PBP 2a slide latex agglutination kit, for rapid detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*, v. 37, p. 1591-4, 1999.

3 CONCLUSÕES

- A taxa de prevalência de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina encontrada nesse estudo foi de 26,6%;
- Analisando-se os halos de inibição para oxacilina e cefoxitina, através da metodologia fenotípica de difusão do disco obtivemos 23 e 25 cepas MRSA, respectivamente, e pela metodologia automatizada foi possível identificar 25 cepas com resistência a metilina;
- Verificou-se que o emprego da PCR para detecção dos MRSA foi muito eficiente, identificando 37 cepas com a presença do gene *mecA*;
- Os parâmetros metodológicos avaliados nos testes empregados nesse estudo apresentaram valores de especificidade, sensibilidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo para difusão do disco de oxacilina de 95,1%, 62,2%, 82,1% e 87,2%, respectivamente; para a cefoxitina foi de 94,1% de especificidade, 67,6% de sensibilidade, 80,6% de valor preditivo positivo e 87,2% de valor preditivo negativo. Já para a metodologia automatizada as porcentagens foram de 96,1% de especificidade, 67,6% de sensibilidade, 86,2% de valor preditivo positivo e 89,1% de valor preditivo negativo. A PCR obteve 100% em todos os parâmetros avaliados.

REFERÊNCIAS

ADALETI, R. et al. Comparison of polymerase chain reaction and conventional methods in detecting methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **The Journal Infection in Developing Countries**, v. 2, n. 1, p. 46-50, feb 2008.

ANDRADE, D.; LEOPOLDO, V. C.; HAAS, V. J. Ocorrência de Bactérias multirresistentes em um Centro de Terapia Intensiva de Hospital Brasileiro de Emergências. **Revista Brasileira Terapia Intensiva**, v.18, n.01, p. 27-33, mar.2006.

ANDRIOLO, A. **Guias de medicina ambulatorial e hospitalar**. São Paulo: Editora Manole, 2005.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/propriedades2.htm> Acesso em: 10 abril, 2010.

BHATIA, A.; ZAHOR, S. *Staphylococcus aureus* enterotoxins: a review. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 1, n. 2, p. 188-197, abr. 2007.

BROEKEMA, N.M. et al. Comparison of cefoxitin and oxacillin disk diffusion methods for detection of mecA-mediated resistance in *Staphylococcus aureus* in a large-scale study. **Journal of clinical microbiology**, v. 47, n. 01, p. 217-219, jan 2009.

BOYLE-VAVRA, S.; DAUM, R.S. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the role of Panton-Valentine leukocidin. **Laboratory Investigation**, v. 87, n.1, p. 3-9, dec 2007.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Disponível em <www.cdc.gov/ncidod/aip/research/mrsa.html#what_is_staph>. Acesso em: 03 abr. 2010.

CHAMBERS, H.F. Methicillin resistance in Staphylococci: Molecular and biochemical basis and clinical implications. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, n. 04, p. 781-91, oct 1997.

CHAMBERS, H. F.; DELEO, F. R. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 9, p. 629-641, sept. 2009.

CHLEBOWICZ, M.A. et al. Recombination between *ccrC* genes in a type V (5C2&5) *staphylococcal cassette chromosome mec* (SCC*mec*) of *Staphylococcus aureus* ST398 leads to conversion from methicillin resistance to methicillin susceptibility in vivo. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.54, n. 02, p. 783–791, feb 2010.

CHLEBOWICZ, M.A.; VAN DIJL, J.M.; BUIST, G. Considerations for the distinction of *ccrC*-containing staphylococcal cassette chromosome *mec* elements. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 04, p. 1823–1824, apr 2011.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, sixteenth informational supplement, M100-S16**. Wayne, PA, USA: CLSI, 2006.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, seventeenth informational supplement, M100-S17**. Wayne, PA, USA: CLSI, 2007.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**, nineteenth informational supplement, document M100-S21. Wayne, PA, USA: CLSI, 2011

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement, M100-S22**. Wayne, PA, USA: CLSI, 2012.

COHEN, P. R. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin infections: a review of epidemiology, clinical features, management, and prevention. **International Journal of Dermatology**, v. 46, n. 01, p. 1-11, jan 2007.

CROSSLEY, K.B. et al. **Staphylococci in human disease**. New York: Wiley-Blackwell, 2009. 398 p.

CRUVINEL, A. R.; SILVEIRA, A. R.; SOARES, J. S. Perfil antimicrobiano de *Staphylococcus aureus* isolado de pacientes hospitalizados em UTI no Distrito Federal. **Cenarium Farmacêutico**, v.4, n. 04, p. 1-10, maio/nov. 2011.

DAUM, R.S. Skin and soft-tissue infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **The New England Journal of Medicine**, v. 357, n. 04, p. 380-90, july 2007.

DAVIS, J. S. Management of bone and joint infections due to *Staphylococcus aureus*. **Internal Medicine Journal**, v. 35, n.04, p. 79S-96S, nov 2005.

DE KRAKER, M.E. et al. Clinical impact of antimicrobial resistance in European hospitals: excess mortality and length of hospital stay related to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bloodstream infections. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.55, n. 04, p.1598–605, apr 2011.

DELEO, F.R.; CHAMBERS, H.F. Reemergence of antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* in the genomics era. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 09, p. 2464–74, sept 2009.

DEURENBERG, R.H.; STOBBERINGH, E.E. The molecular evolution of hospital- and community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Current Molecular Medicine**, v. 9, n. 02, p. 100-115, mar 2009.

DREISBACH, A. et al. Profiling the surfacome of *Staphylococcus aureus*. **Proteomics**, v.10, n.17, p. 3082–3096, july 2010.

DRYDEN, M. Complicated skin and soft tissue infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology, risk factors, and presentation. **Surgical infections (Larchmt)**, v.9, n. 01 p. s3-10, out 2008.

European antimicrobial surveillance system annual report; 2008.
<http://www.rivm.nl/earss/database/>.

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL [ECDC] (2011). Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2010. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) Disponível em: http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/1111_SUR_AMR_data.

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. 08, p. 2766-2771, aug 2002.

GARCÍA-SÁNCHEZ, J. E. et al. Antibioterapia para el siglo XXI, antibacterianos para la segunda década. ¿Posibilidades o realidades en un futuro? **Revista Española de Quimioterapia**, v. 25, n. 2, p. 100-121, jun. 2012.

GELATTI, L. C. et al. Sepsis por *S. aureus* resistente à meticilina adquirida na comunidade sul do Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.42, n.4, p 458-460, jul-ago 2009.

GEMMELL, C. G. et al. Guidelines for the prophylaxis and treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections in the UK. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.57, n. 04, p. 589-608, feb. 2006

GORDON, R.J.; LOWY, F.D. Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. **Clinical Infection Diseases**, v. 46, n.5, p. 350-359, june 2008.

GARZA-GONZÁLEZ, E.; DOWZICKY, M. J. Changes in *Staphylococcus aureus* susceptibility across Latin America between 2004 and 2010. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.17, n.1, p.13–19, jan 2013.

GUZMÁN-BLANCO, M. et al. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Latin America. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 34, n. 04, p. 304–308, 2009.

HIGUCHI, W. et al. Structure and specific detection of staphylococcal cassette chromosome *mec* type VII. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 377, n. 03, p. 752–756, dec 2008.

ITO, T. et al. Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. **Drug Resistance Updates**, v. 6, n.1, p. 41-52, 2003.

ITO, T. et al. Guidelines for Reporting Novel *mecA* Gene Homologues. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n.10, p. 4997–4999, 2012.

IWATSUKI, K. et al. Staphylococcal cutaneous infections: invasion, evasion and aggression. **Journal of Dermatological Science**, v. 42, n. 3, p. 203-14, 2006.

INTERNATIONAL WORKING GROUP ON THE CLASSIFICATION OF STAPHYLOCOCCAL CASSETTE CHROMOSOME ELEMENTS (IWG-SCC): Classification of *staphylococcal cassette chromosome mec* (SCC*mec*): guidelines for reporting novel SCC*mec* elements. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 12, p.4961–4967, sept 2009.

JARVIS, W. R.; JARVIS, A. A.; CHINN, R. Y. National prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in inpatients at United States health care facilities, 2010. **American Journal of Infection Control**, v. 40, n. 3, p. 194-200, apr. 2012.

JESSEN, O. et al. Changing staphylococci and staphylococcal infections: a ten-year study of bacteria and cases of bacteremia. **The New England Journal of Medicine**, v. 281, n. 18, p. 627-35, set 1969.

KONEMAN, E. W. et al. **Diagnóstico Microbiológico - Texto e Atlas Colorido**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008. 1760 p.

LOWY, F. D. *Staphylococcus aureus* Infections. The New England Journal of Medicine, v. 339, n.27, p. 520-532, ago. 1998.

LOWY, F.D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 111, n.9, p. 1265–1273, may 2003.

MA, X. X. et al. Novel type of staphylococcal cassette chromosome *mec* identified in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 4, p. 1147-1152, apr. 2002.

MALACHOWA, N.; DELEO, F.R. Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, n. 18, p. 3057–3971, sept 2010.

MARTINS JÚNIOR, P. O. et al. Prevalência do *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, isolado em hemoculturas de pacientes internados em alguns hospitais do Distrito Federal, Brasil. **Brasília Med**, v. 46, n. 02, p. 125-130, jun. 2009.

MATHEWS, A. et al. Evaluation and comparison of tests to detect methicillin resistant *S. aureus*. **Indian Journal of Pathology and Microbiology**, v. 53, n. 01, p. 79-82, mar. 2010.

MCKINNON, P.S.; BOENING, A.J.; AMIN, A.N. Optimizing delivery of care for patients with MRSA infection: focus on transitions of care. **Hospital Practice**, v. 39, n. 02, p. 18–31, apr 2011.

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, n. 06, p. 399-406, dez 2007.

MIMICA, M. J. Atualização sobre detecção laboratorial de resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus aureus*. **Arquivos Médicos do Hospital e da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa São Paulo**, v. 57, p. 129-134, 2012.

MIMICA, M. J. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Brazil. **The New Microbiologica**, v. 36, n. 01, p. 107, jan. 2013.

MISHRA, R.P. et al. Vaccines and antibiotic resistance. **Current Opinion in Microbiology**, v.15, n. 05, p. 596–602, oct 2012.

MONECKE, S. et al. A field guide to pandemic, epidemic and sporadic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **PLoS ONE**, v. 6, n. 04, p. 17936, apr 2011.

MONECKE, S. et al. Detection of *mecC*-Positive *Staphylococcus aureus* (CC130-MRSA-XI) in Diseased European Hedgehogs (*Erinaceus europaeus*) in Sweden. **PLoS ONE**, v.8, n.6, p. 1-6, jun 2013.

MONTE, V.L. - **Detecção de *Staphylococcus aureus* resistente à metilina por meio de multiplex PCR em amostras de secreção respiratória de pacientes com fibrose cística**. 2005. 113 p. Tese (Docência livre) – Instituto de Microbiologia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. 960 p.

PEREZ, L. R. et al. Variations of agar screen tests for detection of methicillin-resistance in staphylococci: focus on cefoxitin. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 26, n. 4, p. 267-270, apr. 2007.

PILLAI, M. M.; LATHA, R.; SARKAR, G. Detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* by Polymerase Chain Reaction and conventional methods: a comparative study. **Journal of Laboratory Physicians**, v. 4, n. 2, p. 83-88, july-dec 2012.

PLATA, K.; ROSATO, A. E.; WĘGRZYN, G. *Staphylococcus aureus* as an infectious agent: overview of biochemistry and molecular genetics of its pathogenicity. **Acta Biochimica Polonica**, v. 56, n. 4, p.597–612, 2009.

RAHBAR, M.; SAFADEL, N. Evaluation of cefoxitin disk diffusion test for routine detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **Iranian Journal of Pathology**, v.1, n.4, p.145-148, oct 2006.

RATTI, R.P.; SOUSA, C.P. *Staphylococcus aureus* metilina resistente (MRSA) e infecções nosocomiais. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada**, v. 30, n. 2, p. 137-143, ago 2009.

ROSA, A. W. **Caracterização fenotípica e tipagem molecular de MRSA isolados na unidade de terapia intensiva do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná**. 2009. 85 f. Dissertação (Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia)- Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

ROSSI, F.; ANDREAZZI, D. B. **Resistência bacteriana: Interpretando o antibiograma**. São Paulo: Atheneu, 2005. 118 p.

SANTOS, A. L. S. et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 6, p. 413-423, dez. 2007.

SANTHOSH, D. V. et al. Phenotypic detection and rate of nasal carriage of heterotypic borderline oxacillin resistant *Staphylococcus aureus* in pre-clinical medical students from Malaysia. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 2, n. 4, p. 985-990, aug. 2008.

SAVI, D. C.; COL, A. P. de; ONOFRE, S. B. Seleção de cepas de *Staphylococcus aureus* β -lactamase positiva portadoras do gene *mecA*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 41, n. 1, p. 81-83, jan 2009.

SENER, A. G. et. al Evaluation of three methods for detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **World Journal of Translational Medicine**, v. 2, n. 2, aug. 2013.

SHORE, A. C. et al. Detection of staphylococcal cassette chromosome *mec*Type XI carrying highly divergent *mecA*, *mecI*, *mecR1*, *blaZ*, and *ccr* genes in human clinical isolates of clonal complex 130 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 8, p. 3765–3773, aug. 2011.

SILA, J.; SAUER, P.; KOLAR, M. Comparison of the prevalence of genes coding for enterotoxins, exfoliatins, panton-valentine leukocidin and *tsst-1* between methicillin-resistant and methicillin-susceptible isolates of *Staphylococcus aureus*. **Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacký**, v. 153, n. 03, p. 215-218, sept 2009.

SONG, J.H. et al. Spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* between the community and the hospitals in Asian countries: an ANSORP study. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 5, p. 1061–1069, feb 2011.

SOUSA, L. U. et al. Avaliação de metodologias para a detecção de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) e análise do perfil de sensibilidade frente aos antimicrobianos em um hospital terciário. **Saúde (Santa Maria)**, v. 37, n. 1, p. 23-30, 2011.

STEFANI, S.; GOGLIO, A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: related infections and antibiotic resistance. **Journal of Infectious Diseases**, v.14, n. 4, p.19–22, oct 2010.

SWENSON, J.M. et al. Performance of eight methods, including two new rapid methods, for detection of oxacillin resistance in a challenge set of *Staphylococcus aureus* organisms. **Journal Clinical Microbiology**, v. 39, n. 10, p. 3785-3788, oct 2001.

SWENSON, J. M.; TENOVER, F. C. Results of disk diffusion testing with cefoxitin Performance standards for antimicrobial correlate with presence of *mecA* in *Staphylococcus* spp. **Journal of clinical microbiology**, v.43, n. 8, p. 3818-3823, mar 2005.

TURLEJ, A., HRYNIEWICZ, W., EMPEL, J. *Staphylococcal Cassette Chromosomemec* (SCC*mec*) classification and typing methods: an overview. **Polish Journal of Microbiology**, v. 60, n. 02, p.95–103, may 2011.

VELASCO, D. et al. Evaluation of different methods for detecting methicillin (oxacillin) resistance in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 55, n. 03, p. 379-82, feb 2005.

VELÁZQUEZ-MEZA, M. E. *Staphylococcus aureus* methicillin-resistant: emergence and dissemination. **Salud Pública de México**, v. 47, n. 05, p. 381-7, set 2005.

ZETOLA, N. et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging threat. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 5, n. 5, p. 275-286, may 2005.