

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE
DOUTORADO EM SAÚDE**

Thiago César Nascimento

**Aspectos epidemiológicos, fisiológicos e moleculares da resistência à oxacilina em
Staphylococcus aureus e avaliação da sua susceptibilidade a novas moléculas sintéticas.**

Juiz de Fora

2014

Thiago César Nascimento

Aspectos epidemiológicos, fisiológicos e moleculares da resistência à oxacilina em *Staphylococcus aureus* e avaliação da sua susceptibilidade a novas moléculas sintéticas.

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Saúde – Área de concentração Saúde Brasileira, Faculdade de Medicina, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Galuppo Diniz

Coorientadoras: Profa. Dra. Vânia Lúcia da Silva
Profa. Kátia Regina Netto dos Santos

Juiz de Fora

2014

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Nascimento, Thiago César.

Aspectos epidemiológicos, fisiológicos e moleculares da resistência à oxacilina em *Staphylococcus aureus* e avaliação da sua susceptibilidade a novas moléculas sintéticas / Thiago César Nascimento. -- 2014.

176 p. : il.

Orientador: Cláudio Galuppo Diniz

Coorientadora: Vânia Lúcia da Silva

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Saúde Brasileira, 2014.

1. ORSA. 2. Resistência antimicrobiana. 3. Aminoálccois.
4. SCCmec. 5. Clonalidade. I. Diniz, Cláudio Galuppo, orient.
II. Silva, Vânia Lúcia da, coorient. III. Título.

Thiago César Nascimento

Aspectos epidemiológicos, fisiológicos e moleculares da resistência à oxacilina em *Staphylococcus aureus* e avaliação da sua susceptibilidade a novas moléculas sintéticas

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Saúde – Área de concentração Saúde Brasileira, Faculdade de Medicina, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Saúde.

Aprovada em: 25 de abril de 2014.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Cláudio Galuppo Diniz - Orientador
Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Adriana Gonçalves de Oliveira
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Profa. Dra. Marisa Fabiana Nicolás
Laboratório Nacional de Computação Científica

Profa. Dra. Rosângela Maria de Castro Cunha
Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Ana Carolina Moraes Apolônio
Universidade Federal de Juiz de Fora

Peço licença e desculpas a minha mãe, mas este dedico a meu pai, por todo exemplo de luta e dignidade na vida, principalmente, nos últimos meses. Cedo me ensinou que a vida apresenta obstáculos, à primeira vista, intransponíveis. No entanto também me fez crer, com sua experiência de vida, que quando desejamos algo, temos de lutar incessantemente até lograr êxito. Em seu exemplo de profissional responsável, dedicado e correto, sempre tentei perpetuar em minha conduta.

Assim, construí a sua imagem glamourosa de herói!

AGRADECIMENTOS

A memória não falha quando retorno a abril de 2005. Recordo-me fielmente quando entrei na Microbiologia ainda como monitor-aluno e a satisfação ao caminhar pelos corredores do Instituto de Ciências Biológicas logo após a aprovação. O tempo passou - aproximadamente 9 anos - monitoria, extensão, iniciação científica, mestrado, docência e por fim, doutorado. Não posso dizer que o longo caminho percorrido foi fácil, aliás, o que na vida o é? Sem as dificuldades, certamente não estaria atribuindo o digno e merecido valor ao título que, neste momento, conquisto. Cada ruga que adquiri pelo caminho, e que agora paira em minha face, teve seu significado e seu mérito. Todos os esforços não foram em vão. Na Microbiologia, pude conhecer pessoas, que levarei no meu coração e em pensamentos pelo resto de minha vida. E hoje, com muito orgulho, posso dizer que chegou o grande dia – o dia da minha última colação de grau. Assim, ao finalizar mais um capítulo do livro da minha vida, reservo este espaço para agradecer a todos que fizeram parte, direta ou indiretamente, deste trabalho e, assim, contribuíram para a sua realização, e até mesmo, àqueles que passaram pela minha vida de forma significativa, contribuindo para meu crescimento pessoal e profissional.

*A **Deus** por sempre iluminar meu caminho e guiar meus passos ao longo de mais esta etapa. Sei que em muitos momentos falto para com o senhor. Perdoe-me por todos os momentos que pude agradecer, mas não agradei. Perdoe-me pelo meu egoísmo. Agradeço ao Senhor pelo que conquistei até agora e peço sabedoria para conquistar muito mais.*

*Aos meus pais, **Válter e Maria do Carmo**. A meu pai pelos exemplos de caráter, dignidade, conduta pessoal e profissional. Com o senhor aprendi o caminho certo que devemos seguir e o respeito que devemos ter perante as pessoas que nos cerca. Quero dizer ao senhor que me sinto muito feliz e orgulhoso com o caminho pelo qual optei e trilho até hoje. A você mãe por todo o zelo e carinho que dispensou a mim todos esses anos. Se cheguei até aqui, devo muito a senhora principalmente pelos sacrifícios e renúncias pessoais. Enfim, a vocês por toda a atenção e dedicação dispensados a mim desde o início de minha vida.*

*Ao meu irmão **Fúlvio** por ser esse exemplo de profissional respeitado e admirado por todos os seus pares. Parabéns pela recente promoção e aprovação em um dos cursos mais difíceis da sua área. Sua família tem muito orgulho de você! Obrigado também a **Ana Paula** pelo apoio e incentivo, além dos sobrinhos queridos **Fúlvio Augusto e Ana Clara**, que trazem alegria e felicidade a nossa casa, cada vez que vêm nos visitar.*

*Ao meu irmão **Fabrcício**, também um exemplo de profissional. Obrigado por tudo!*

*Aos meus tios **Fernando e Vera**, presenças constantes em minha vida, obrigado por toda ajuda e apoio, em todos esses anos.*

A toda minha família, obrigado pelo apoio e incentivo.

*Ao **Prof. Cláudio Galuppo Diniz**, por quase 9 anos de orientação e ensinamentos. Obrigado pelo exemplo de profissionalismo, competência, pelas lições de saber e pela dedicação. Obrigado por repartir suas experiências de vida, de luta e dignidade e me auxiliar a trilhar este caminho, sempre me alertando sobre as responsabilidades que tenho que assumir, mostrando-me que o aprendizado é interminável. Obrigado por acreditar em mim, principalmente por aceitar a minha opção de estudo no doutorado. Hoje ao finalizar mais esta etapa, acredito que estou preparado para os desafios da vida acadêmica e muito desta preparação devo ao senhor. Desculpe-me pelas falhas durante esse tempo e obrigado por tudo!*

*À **Profa. Vânia Lúcia da Silva**, por todos esses anos de orientação. Seus ensinamentos sempre me fizeram crescer pessoal e profissionalmente. Obrigado pelos exemplos de luta, dignidade e perseverança. Obrigado pelas oportunidades e por acreditar no meu potencial. Saiba que a senhora terá a minha eterna gratidão e admiração.*

*Alguns os denominavam em relação a mim, de papai e mamãe. Mas eu sempre dizia que vocês, **Cláudio e Vânia**, até pela pouca idade, não mereciam um filho “deste tamanho”. De qualquer forma, obrigado por toda a convivência durante todos esses anos, por compartilhar momentos de suas vidas pessoais, incluindo esse garoto especial que é o **Enrico**. Obrigado por sempre acreditarem em mim. Permitam-me chama-los de amigos!*

*À **Profa. Rosângela Abreu Monteiro de Barros**, obrigado pelo carinho e zelo dispensados durante todos esses anos. A senhora me deu a chance de continuar na Microbiologia quando estive próximo de sair, ainda na graduação. Jamais esquecerei esse gesto.*

*Ao **Prof. Márcio Tavares Rodrigues**, pela confiança e por ter me apresentado e indicado ao Prof. Cláudio, quando este chegou ao departamento. Obrigado pela amizade, apoio e pelo exemplo de honestidade profissional.*

*À **Profa. Maria Luzia da Rosa e Silva**, que juntamente com o Prof. Márcio me deu a notícia de minha aprovação na monitoria e que foi o marco inicial de tudo isso que aconteceu em minha vida a partir de então. Obrigado pela confiança, amizade e pelas inestimáveis trocas de ideias.*

*À **Profa. Betânia Paiva Drumond** pela consideração e pelo apoio. Obrigado pela convivência, e por me fazer acreditar e compartilhar de sua crença de que devemos nos preocupar com o ensino universitário buscando alternativas para o aprendizado, demonstrando toda sua seriedade.*

*Às **Profas Aline Dias Paiva, Márcia Mercês Aparecida Bianchi dos Santos e Ana Carolina Morais Apolônio**. Apesar do pouco tempo de convívio, devido a recente entrada de vocês à Microbiologia, agradeço por toda consideração e respeito. Acredito que todo esse tempo que estou aqui, permite-me dizer: - Sejam bem vindas!*

À **Profa. Mariléia Leonel** da Faculdade de Enfermagem por todo incentivo desde a graduação até hoje ao fim do doutorado. A senhora me faz acreditar na idéia que nós profissionais da área de saúde não podemos nos esquecer da área de ciências básicas e é por isso que acredito e dou valor a este trabalho. Obrigado também por toda consideração.

Ao **Prof. Murilo Gomes de Oliveira** da Faculdade de Farmácia por aceitar a colaborar com a tese, principalmente por ceder as amostras para o trabalho e entender a importância deste para mim.

A todos os ex-professores da Microbiologia que tive a oportunidade de conviver durante esses anos todos, **Délcio, Francis, Jorge (Mr. Magoo), Natália, Tiago, Bruno, Márcia, Luciana, Fábio, Andressa, Luciene, Gizele, Thaís, Fred, Claudia, Carolina e Ivna**. Obrigado por toda a consideração.

Aos colegas de docência com quem tive a oportunidade de conviver e trabalhar, principalmente os integrantes da “mesa redonda”, **Profs. Cláudia, Carolina, Fred e Thaís**. Obrigado por me receberem bem, pelas conversas profissionais e descontraídas. Aprendi com cada um de vocês. Sinto saudades desta época.

Em especial, gostaria de deixar registrado um agradecimento a **Carolina e Cláudia** que sempre procuraram me apoiar e incentivar e nem sempre receberam o obrigado que mereciam. Peço desculpas ainda, pelos momentos de rispidez em algumas discussões. A você **Cláudia**, desejo felicidades como professora da UFJF em Governador Valadares e a você **Carolina**, sucesso na conclusão do seu doutorado. Obrigado por me “aturarem” todo esse tempo, fosse como professor ou como colega de doutorado.

Aos ex-funcionários da Microbiologia **Angélica e Leandro** por toda a ajuda nos momentos de sufoco, prestada no laboratório durante todos os anos que precisei até o início do doutorado, quando vocês se despediram de nós. Obrigado pelo excelente convívio e amizade há muito tempo.

Aos atuais funcionários, **Thaís e Filipe** por toda ajuda, e por sempre estarem solícitos quando preciso. Muito obrigado!

A todos os integrantes e ex-integrantes do Laboratório de Fisiologia e Genética Molecular Bacteriana, **Werlley, Maria Lúcia, Daniele Knupp, Danielle, Gabriela, Lorena, Patrícia, Thaís, Mariana, Juliana, Michele, Felipe**, agregados da Química, (**Angelina, Bianca, Camila e Rafael**), **Juliana, Natália Caçador, Jéssica, Fabrício, Letícia, Job, Rafaella, Renata, Natália Barbosa, Vanessa, Priscila, Mariana Alvim, Rafaela Alvim, Samuel, Débora, Mayara, Tamara, Pedro, Suzane, Márcia, Marina Barros, Daiana, Marina Fajardo, Karine, Luciana, LÍlian, Ariana, Aline, Anselmo, Guilherme, Douglas, Rito, Laura, Alessandra e Thaís**. Obrigado por todos os momentos de convivência e descontração.

Aqueles que estiveram envolvidos diretamente nas atividades do projeto, **Marina Barros, Samuel, Márcia, e Marina Fajardo** e aqueles que contribuíram de alguma forma em determinada etapa do mesmo, **Tamara, Mayara, Débora, Pedro e Suzane**. A preciosa ajuda de todos vocês jamais será esquecida. Muito obrigado e felicidades a todos vocês!

À **Michele, Daniele Knupp e Juliana**, três colegas e amigas da pós-graduação que caminham comigo há bastante tempo. Obrigado por toda a ajuda e pela agradável convivência durante todos esses anos. Só posso desejar felicidades a vocês!

À **Alessandra Barbosa Ferreira-Machado**, um obrigado pela parceria e importante ajuda na organização dos manuscritos. Felicidades com a chegada do herdeiro!

À **Angelina Almeida e Bianca Ferreira**, pela fundamental e importante parceria nos experimentos. Sucesso à vocês!

Ao grande amigo **Werlley de Almeida Januzzi**, um ser humano de enorme coração e inteligência, que pelo incentivo, foi o responsável direto pela minha escolha em entrar na Microbiologia. Quantos momentos divertidos vivemos no tempo em que trabalhamos juntos no laboratório!? Quis o destino que você procurasse sua felicidade ao seguir outro caminho. Já disse isso uma vez e repito o laboratório nunca mais foi o mesmo sem você. Não tenho dúvidas que a Medicina ganhou um profissional de excelência. Obrigado por tudo.

A doutoranda em Genética/UFRJ, **Gizele Duarte Garcia** por toda ajuda e apoio quando precisei durante a minha estada no Rio de Janeiro. Sucesso para você! Muito obrigado!

À doutoranda em Genética/UFMG, **Julliane Dutra Medeiros** por toda a ajuda que me prestou, sempre com boa vontade, principalmente na primeira metade dos experimentos. Obrigado pelas explicações, pelos auxílios, pela troca de idéias e até por dar uma de “mãezona” nos congressos (rs). Sucesso para você!

A todos os integrantes do **Laboratório de Virologia** e do **Laboratório de Micologia** do ICB pelos momentos agradáveis de convivência.

A todos os integrantes do **Laboratório Prof. Maurílio Baldi** do Hospital Universitário, em especial aos do **Laboratório de Microbiologia**, sempre receptivos quando precisei. Um agradecimento especial a **Udi**, que sempre me recebeu muito bem e me ajudou na logística de recuperação das amostras.

Ao **Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora**, pela permissão em realizar este trabalho.

Ao **Laboratório de Infecção Hospitalar do Departamento de Microbiologia Médica, Instituto de Microbiologia Paulo Góes, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro**, na pessoa da Profa. **Kátia Regina Netto dos Santos**, pelo espaço cedido para o término dos experimentos de biologia molecular.

À **Profa. Kátia Regina Netto dos Santos** por me receber em seu laboratório com todo carinho e atenção. Obrigado pelo convívio, pelo incentivo, por compartilhar sua sabedoria e pelos exemplos de dedicação e exigência profissional. A senhora é um exemplo de amor e dedicação naquilo que faz.

A todos os integrantes do **Laboratório de Infecção Hospitalar**, **Dennis, Fernanda, Raiane, Thainá, Yuri, Milena, Suelen, Ana Carolina, Sthefanie, Tamara, Bruna, Marcelle, Priscylla** e **Sra. Jupira** pela receptividade e ajuda em todos os dias que estive no laboratório. Em especial, ao **Dennis** pela troca de idéias, caronas e ajuda sempre que precisei; à **Fernanda** pela luz e sabedoria nos momentos de maior sufoco e pelos esclarecimentos

acerca dos experimentos; à **Raiane** por me fazer entender o Bionumerics e seus dendogramas; e a **Milena** e **Sthefanie** pelos ensinamentos e ajudas nas corridas do PFGE.

Aos integrantes do **Laboratório de Micobactérias**, em especial ao **Marlei** e **Karen** e do **Laboratório de Biologia Molecular Marinha**, do Instituto de Microbiologia Paulo Góes, pela ajuda quando precisei utilizar o espaço de vocês.

Ao doutorando da COPPE/UFRJ e amigo **Felipe Costa Alvim**, por me receber em seu apartamento no Rio de Janeiro ao longo de 6 meses. Obrigado pela hospitalidade e pelas trocas de idéias. Desculpe por qualquer incômodo e transtorno que posso ter causado. Jamais esquecerei sua ajuda. Aproveitando, um obrigado também a **Isabelle Guedes**, pelos poucos, mas ainda sim, bem descontraídos momentos, quando foi ao Rio de Janeiro.

Aos meus grandes amigos **Daniel A. Gouvea Gomes**, **Rafael Neves Cosendey** e **Vítor L. Del'Duca** por todos esses anos de amizade. Desculpe pelos momentos de afastamento durante o período do doutorado, mas sei que vocês sempre compreenderam a importância desse trabalho para mim. Desejo sempre felicidades a vocês.

A algumas pessoas importantes que sempre compreenderam e respeitaram a minha dedicação com o meu trabalho, **Rodrigo Oliveira**, **Anderson Marques**, **Míriam Marotta**, **Wando Costa**, **Marcus Tavares**, **Júlia Alvim**, **Thalita Miana**, **Thatiana Schiffler**. Independente da distância devido às circunstâncias da vida, obrigado por tudo!

Ao amigo **Dr. Didier**, por sempre me incentivar e torcer pelo meu sucesso. Obrigado pelo incentivo e amizade gratuita.

A todos os integrantes do Grupo de Discussão em Doenças Infecto-Parasitárias, **Natália**, **Letícia**, **Carlos**, **Geovane**, **João Vítor**, **Manoel** e mais recentemente a **Yve**. Não tenho dúvidas da grande capacidade de vocês e do quanto serão excelentes profissionais. Obrigado pelo excelente convívio e por compreenderem alguns momentos de ausência. Desejo sucesso a vocês!

A todos os **estudantes** com quem tive a oportunidade de conviver durante meu período como docente e mesmo depois, como estudante de doutorado. Apesar de algumas dificuldades, muitos de vocês me fazem crer que é possível sim acreditar em um ensino cada vez melhor.

Aos **pacientes** responsáveis pela origem destas amostras e sem as quais não existiria este trabalho. Embora, muitos de vocês já não estejam mais entre nós, saibam o quanto importante é a participação de vocês, direta ou indiretamente, nas pesquisas científicas. Espero que este, de alguma forma, contribua para o bem de todas as pessoas.

A todos os funcionários do **Serviço de Arquivo Médico (SAME)** do Hospital Universitário por toda a ajuda quando precisei principalmente na coleta de dados dos prontuários.

A todos os integrantes das **reuniões da DIP** às quinta-feiras, em especial a Profa Rosângela, Prof. Guilherme, Cassimiro e Rodrigo. Obrigado pela oportunidade, pelas oportunas discussões e pelo convívio.

Ao **Instituto de Ciências Biológicas**, na pessoa da Diretora Profa. Ana Paula Ferreira, por me acolher todos esses anos, constituindo minha segunda casa, na qual muitas vezes, chego a passar mais tempo do que em minha residência.

A todos os **professores e funcionários** do Instituto de Ciências Biológicas pela atenção que me foi concedida sempre que precisei.

A todos os integrantes dos **Laboratórios de Imunologia e Parasitologia**, que sempre me receberam muito bem, e nunca me negaram qualquer pedido ou favor que precisasse.

A todos os **funcionários da conservadora**, pelo excelente convívio.

Ao **Departamento de Enfermagem Básica**, da Faculdade de Enfermagem na pessoa da Profa. Bernadete Marinho Bara de Martim Gama, local que entrei há pouco mais de um mês e do qual me orgulho por estar como professor!

A todas as minhas colegas de profissão do **Departamento de Enfermagem Básica**, por me receberem muito bem, em especial a **Kelli, Elisa e Angélica**, por sempre me ajudarem quando eu mais preciso.

Ao Programa de Pós-Graduação em Saúde, na pessoa do Coordenador Geral, **Prof. Mateus Camaroti Laterza**.

A **Profa Darcília Maria Nagen de Souza** e os funcionários **Cristina e Carlos** sempre solícitos quando precisei, durante todo o período do doutorado.

A **Profa. Simone Gonçalves dos Santos** e **Prof. Guilherme Côrtes Fernandes** pelas inestimáveis sugestões que pontuaram no exame de qualificação de entrada para o doutorado e que com toda certeza acrescentaram e muito à mesma.

À **CAPES** pela bolsa a mim concedida durante o desenvolvimento desse trabalho.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (**CNPq**) e Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (**FAPEMIG**), por todo suporte financeiro para execução deste e outros projetos desenvolvidos neste laboratório.

“Eu posso aceitar a falha, todos falham em alguma coisa. Mas eu não posso aceitar não tentar”.

Michael Jordan

“Não importa o que você seja, quem você seja, ou o que deseja. Na vida, a ousadia em ser diferente reflete na sua personalidade, no seu caráter, naquilo que você é. E é assim, que as pessoas lembrarão de você um dia”.

“No que diz respeito ao desempenho, compromisso, ao esforço, à dedicação, não existe meio termo. Ou você faz uma coisa bem feita, ou não faz”.

“Quando penso que cheguei ao meu limite descubro que tenho forças para ir além”.

“Há um grande desejo em mim de sempre melhorar. Melhorar. É o que me faz feliz”.

Ayrton Senna

“Na Universidade se ensina porque se pesquisa”.

Carlos Chagas Filho

RESUMO

Staphylococcus aureus é uma das principais causas de infecções associadas à saúde em todo o mundo. O objetivo deste trabalho foi avaliar as características epidemiológicas, fisiológicas e moleculares de *S. aureus* resistente à oxacilina (ORSA), isolados de infecções em um hospital terciário universitário e avaliar sua susceptibilidade a novas moléculas sintéticas. Foram avaliadas um total de 103 amostras de ORSA quanto a dados clínicos e epidemiológicos relacionados aos pacientes, perfil de susceptibilidade a drogas antimicrobianas, avaliação da produção de biofilme e da capacidade hemolítica e confirmação da identidade genética, detecção do gene *mecA* e caracterização do SCC*mec*, por PCR. Para 45 amostras oriundas do CTI, também foram realizadas a análise do perfil de fragmentação do DNA cromossômico por PFGE e caracterização do CC, por PCR. Para 21 amostras foi avaliada a susceptibilidade a amins aromáticas alquiladas (aminoálcoois). Considerando-se as amostras clínicas, a maioria das amostras foi isolada no sexo masculino (71%) a partir de secreção traqueal (26,2%) e sangue (23,3%) seguido de swab de sítio cirúrgico e ponta do cateter (15,5%), exsudados (14,6%) e urina (4,9%), associados à infecção do sistema respiratório (34%) e bacteremia (20,4%), em unidade de terapia intensiva (43,7%). No geral, uma alta frequência de resistência foi observada contra clindamicina (100%), eritromicina (100%), azitromicina (99%), levofloxacina (93,2%), gentamicina (84,5%), sulfametoxazol-trimetoprim (75,7%), tetraciclina (77,6%), cloranfenicol (59,3%) e rifampicina (50,5%). Os aminoálcoois também apresentaram atividade antibacteriana contra a maioria dos isolados de ORSA. Tipos de SCC*mec* III (66,7%), II (17,8%), IV (4,4%), I (2,2%) foram encontrados. A maioria (66,7%) dos isolados foram relacionados ao clone epidêmico brasileiro (CEB)/CC8/SCC*mec* III, que prevaleceu entre 2005 e 2008, enquanto que a linhagem USA100/CC5/SCC*mec* II surgiu em 2007 e foi mais frequente em 2009 e 2010, na UTI. Os isolados que transportam o tipo de SCC*mec* IV (USA400/CC1 e USA800/CC5 linhagens) e I (USA500/CC5) também foram detectadas. Nossos dados são altamente relevantes para os sistemas de vigilância permitiu mapear em maior escala a circulação dinâmica de ORSA e levantar discussões sobre estratégias de contenção e uso racional da quimioterapia empírica.

Palavras-chave: ORSA, Resistência antimicrobiana, Aminoálcoois, SCC*mec*, Clonalidade.

ABSTRACT

Staphylococcus aureus is a major cause of health care associated infections worldwide. The aim of this work was to evaluate epidemiological, physiological and molecular characteristics of aureus oxacillin resistant *S. aureus* (ORSA) isolated from infections in a tertiary university hospital and evaluated their susceptibility to new synthetic molecules. A total of 103 samples of ORSA for clinical and epidemiological data related to patients susceptibility profile to antimicrobial drugs, assessment of biofilm production and hemolytic capacity and confirmation of genetic identity, detection of the *mecA* gene and characterization of SCC*mec* were evaluated, PCR. For 45 samples from CTI, also the profile of DNA analysis by PFGE and characterization of the CC, PCR were performed. For 21 samples susceptibility to alkylated aromatic amines was evaluated. Considering the clinical samples, most samples contained in males (71%) from tracheal secretion (26.2%) and blood (23.3%) followed by surgical site and swab tip of the catheter (15.5%), exudates (14.6 %) and urine (4.9%), associated with infection of the respiratory system (34%) and bacteremia (20.4%) in the intensive care unit (43.7%). Overall, a high frequency of resistance was observed against clindamycin and erythromycin (100%), azithromycin (99%), levofloxacin (93.2%), gentamicin (84.5%), trimethoprim-sulfamethoxazole (75.7%), tetracycline (77.6%), chloramphenicol (59.3%) and rifampicin (50.5%). The amino alcohols also showed antibacterial activity against most isolates of ORSA. SCC*mec* type III (66.7%), II (17.8%), IV (4.4%) and I (2.2%) were found. The majority (66.7%) isolates were related to the brazilian epidemic clone (CEB)/CC8/SCC*mec* III, which prevailed between 2005 and 2008, while the USA100/CC5/SCC*mec* lineage II emerged in 2007 and was more frequent in 2009 and 2010 in the ICU. The strains carrying the SCC*mec* type IV (USA400/CC1 and USA800/CC5 lineages) and I (USA500/CC5) were also detected. Our data are highly relevant to surveillance systems enabled map on a larger scale the dynamic movement of ORSA and raise discussions on containment strategies and rational use of empirical chemotherapy.

Keywords: MRSA, Antimicrobial resistant, Aminoalcohol, SCC*mec*, Clonality.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Fluxograma 1: Metodologia proposta para o estudo.....	49
Gráfico 1: Distribuição de isolamento, em valores absolutos, do gênero <i>Staphylococcus</i> no Laboratório Prof. Maurílio Baldi do HU/UFJF entre os anos de 2005 a 2010.....	61
Gráfico 2: Distribuição por sexo, das 103 amostras ORSA isoladas de pacientes no HU/UFJF, entre 2005 a 2010.....	62
Gráfico 3: Distribuição por setor, das 103 amostras ORSA isoladas de pacientes no HU/UFJF, entre 2005 a 2010.....	63
Gráfico 4: Distribuição por tipo de infecção relacionada às 103 amostras ORSA isoladas de pacientes no HU/UFJF, entre 2005 a 2010.....	64
Gráfico 5: Distribuição por espécime clínico relacionado às 103 amostras ORSA isoladas de pacientes no HU/UFJF, entre 2005 a 2010.....	64
Gráfico 6: Evolução dos pacientes a partir de infecções relacionadas as 103 amostras ORSA isoladas no HU/UFJF, entre 2005 a 2010.....	65
Gráfico 7: Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de linhagens ORSA isoladas a partir de pacientes internados no HU/UFJF, entre 2005 a 2010. AK, amicacina; CP, ciprofloxacina; CD, clindamicina; CL, cloranfenicol; EM, eritromicina; GM, gentamicina, TS, sulfametoxazol-trimetoprim; TE, tetraciclina; VA, vancomicina.....	66
Gráfico 8: Frequência de resistência aos antimicrobianos, entre 2005 a 2010, de linhagens ORSA isoladas a partir de pacientes internados no HU/UFJF, no período. AK, amicacina; CP, ciprofloxacina; CD, clindamicina; CL, cloranfenicol; EM, eritromicina; GM, gentamicina, TS, sulfametoxazol-trimetoprim; TE, tetraciclina.....	67
Fotografia 1: Eletroforegrama representativo da confirmação da identidade genética de <i>Staphylococcus aureus</i> segundo Strommenger e colaboradores (2003). Canaleta 1: Padrão molecular de tamanho de DNA (100pb ladder); Canaleta 2: Amostra controle de <i>S. aureus</i> ATCC 29213; Canaletas 3 a 13: Amostras do estudo.....	68

Fotografia 2: Eletroforegrama representativo da detecção do gene <i>mecA</i> nas linhagens <i>Staphylococcus aureus</i> segundo Zhang e colaboradores, (2004). Canaleta 1: Amostra controle <i>mecA</i> negativo <i>S. aureus</i> ATCC 29213; Canaleta 2: Padrão molecular de tamanho de DNA (100pb ladder); Canaleta 3: Amostra controle <i>mecA</i> positivo <i>S. aureus</i> ATCC 33591; Canaletas 4 a 11: Amostras do estudo.....	69
Fotografia 3: Eletroforegrama representativo dos tipos de <i>SCCmec</i> detectados por PCR multiplex em amostras nasais de ORSA, segundo Milheiriço, Oliveira e De Lencastre (2007). Canaleta 1: Padrão molecular de tamanho de DNA (100pb ladder); Canaletas 2 a 6: Amostras de <i>S. aureus</i> 119, Mu50, 63a, 522 e 577, controles dos tipos I, II, III, IV e V de <i>SCCmec</i> , respectivamente; Canaletas 7 a 10: Amostras do estudo.....	70
Dendograma 1: Genótipos representativos obtidos pela fragmentação do DNA cromossômico com enzima <i>SmaI</i> em linhagens de ORSA <i>SCCmec</i> tipo III e tipo II isoladas na UTI do HU/UFJF.....	72
Dendograma 2: Genótipos representativos obtidos pela fragmentação do DNA cromossômico com a enzima <i>SmaI</i> em linhagens de ORSA <i>SCCmec</i> tipo I, tipo IV e não tipáveis (NT) isoladas na UTI do HU/UFJF.....	73
Gráfico 9: Variação temporal dos clones de ORSA, CEB/CC8 e USA100/CC5 prevalentes na UTI do HU/UFJF.....	74
Gráfico 10: Avaliação da produção de biofilme em função da densidade ótica de 103 linhagens de ORSA isoladas no HU/UFJF entre 2005 e 2010.....	78
Gráfico 11: Avaliação da atividade hemolítica em função da densidade ótica de 103 linhagens de ORSA isoladas no HU/UFJF entre 2005 e 2010.....	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Oligonucleotídeos utilizados e amplicons obtidos na PCR multiplex para tipagem do SCCmec, de acordo com Milheiro, Oliveira e De Lencastre (2007).....	52
Tabela 2: Oligonucleotídeos utilizados, especificidade e amplicons obtidos nas 3 reações de PCR para determinação do complexo clonal, de acordo com Cockfield e colaboradores (2007).....	55
Tabela 3: Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos das linhagens bacterianas de ORSA, isolados no HU/UFJF entre 2005 a 2010.....	75
Tabela 4: Distribuição de fenótipos de resistência apresentados pelas 103 linhagens de ORSA, isolados no HU/UFJF entre 2005 a 2010.....	76
Tabela 5: Perfil de susceptibilidade a compostos químicos aminoalcoois lipofílicos de linhagens ORSA, isoladas no HU/UFJF.....	77
Tabela 6: Relação entre habilidades bacterianas relacionadas à agressão e frequência de resistência aos antimicrobianos em linhagens de ORSA isoladas de pacientes no HU/UFJF.....	80
Tabela 7: Associação da resistência aos antimicrobianos de acordo com o teste de diluição em ágar em 95 linhagens de ORSA isoladas de pacientes no HU/UFJF em relação aos diferentes tipos de SCCmec detectados.....	81
Tabela 8: Perfil de resistência das 45 linhagens de ORSA isoladas na UTI do HU/UFJF.....	82
Tabela 9: Associação entre os perfis genotípicos e perfil de resistência para as linhagens de ORSA isoladas na UTI do HU/UFJF entre 2005 e 2010.....	83

LISTA DE SIGLAS

AK	amicacina
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	adenosina trifosfato
AZI	azitromicina
BHI	infuso de cérebro e coração
CA-MRSA	<i>Community- Acquired MRSA</i>
CC	complexo clonal
CCIHs	Comissões de Controle de Infecções Hospitalares
<i>ccr</i>	<i>cassette chromosome recombinase</i>
CDC	Centers for Disease Control
CEB	clone Epidêmico Brasileiro
CIP/CP	ciprofloxacina
CD/CLI	clindamicina
CL/CLO	cloranfenicol
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standard Institute</i>
cm	centímetro
CMI	concentração mínima inibitória
CMI ₅₀	concentração mínima na qual 50% das amostras são inibidas
CMI ₉₀	concentração mínima na qual 90% das amostras são inibidas
dATP	desoxiadenosina trifosfato
dCTP	desoxicitosina trifosfato
dGTP	desoxiguanina trifosfato
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	desoxinucleotídeo trifosfato
DO	densidade ótica
dTTP	desoxitimina trifosfato
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EM/ERY	eritromicina
ES	tampão EDTA + lauril sarcosinato de sódio
GEN/GM	gentamicina
h	horas
HA-MRSA	<i>Hospital-Acquired MRSA</i>
HCl	ácido clorídrico
HU/UFJF	Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora
ICB/UFJF	Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora
IH	infecção hospitalar
IHs	infecções hospitalares
INICC	<i>International Nosocomial Infection Control Consortium</i>
IRAS	infecções relacionadas à assistência à saúde
Kb	quilobase

KCl	cloreto de potássio
KDa	quiloDalton
Kg	quilograma
LEV	levofloxacina
M	molar
mg	miligramas
MgCl ₂	cloreto de magnésio
min	minutos
mL	mililitro
MLEE	<i>Multilocus Enzyme Electrophoresis</i>
MLST	Tipagem por seqüenciamento do multilocus enzimático (<i>Multilocus Sequence Typing</i>)
mM	Milimolar
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
MSSA	<i>Staphylococcus aureus</i> sensível à meticilina
MSCRAMs	<i>Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix</i>
NaCl	cloreto de sódio
NNIS	<i>National Nosocomial Infections Surveillance System</i>
°C	graus Celsius
ORF	seqüência de leitura aberta (<i>open reading frame</i>)
ORSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à oxacilina
OSSA	<i>Staphylococcus aureus</i> sensível à oxacilina
pb	pares de base
PBPs	proteínas de ligação à penicilina
PBS	Tampão fosfato
PCR	reação em cadeia da polimerase (<i>polimerase chain reaction</i>)
PFGE	eletroforese em gel de campo pulsado (<i>pulsed-field gel eletrophoresis</i>)
pH	potencial hidrogeniônico
PIV	tampão Tris + HCl + NaCl
PVL	leucocidina de Panton-Valentine
RIF	rifampicina
RM	reação em cadeia da polimerase para determinação do complexo clonal
s	segundos
SCC _{mec}	cassete cromossômico estafilocócico <i>mec</i>
SCN	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativos
SDS	dodecil sulfato de sódio
SINAIS	Sistema Nacional de Informação para o Controle de Infecções em Serviços de Saúde
ST	<i>sequence typing</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
SXT/TS	sulfametoxazol/trimetoprim
TBE	tampão TRIS + ácido bórico + EDTA
TE	tampão Tris + EDTA
TE/TET	tetraciclina

TSA	agar trípcaseína de soja
TSB	caldo tripcaseína de soja
TSST-1	toxina da síndrome do choque tóxico
UFC	unidade formadora de colônia
UTI	unidade de terapia intensiva
UTIs	unidades de terapia intensiva
V	volts
v/v	volume/volume
µg	microgramas
µL	microlitros
µm	micrometros
ρM	picomoles

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	21
2	REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1	GENERALIDADES SOBRE INFECÇÕES HOSPITALARES (IHs).....	23
2.2	ASPECTOS GERAIS SOBRE O GÊNERO <i>Staphylococcus</i>	27
2.2.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	29
2.2.1.1	<i>Fatores de Virulência</i>	30
2.3	<i>Staphylococcus</i> E O FENÔNEMO DA RESISTÊNCIA BACTERIANA A DROGAS.....	33
2.3.1	<i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à metilina/oxacilina	35
2.3.2	Epidemiologia molecular das infecções por ORSA	38
2.4	RESISTÊNCIA BACTERIANA AOS ANTIMICROBIANOS E NOVAS ALTERNATIVAS TERAPÊUTICAS.....	41
3	OBJETIVOS	45
3.1	OBJETIVO GERAL.....	45
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	45
4	MATERIAIS E MÉTODOS	47
4.1	ORIGEM DAS AMOSTRAS.....	47
4.2	DESENHO DO ESTUDO.....	47
4.3	CONSIDERAÇÕES CLÍNICAS E ÉTICAS.....	47
4.4	AMOSTRAS BACTERIANAS.....	48
4.5	ESTUDOS MOLECULARES.....	49
4.5.1	Extração do DNA genômico	49
4.5.2	Confirmação da identidade bacteriana por biologia molecular	50
4.5.3	Deteção do gene <i>mecA</i>	50
4.5.4	PCR multiplex para caracterização do SCC<i>mec</i>	51
4.5.5	Análise do perfil de fragmentação do DNA cromossômico após tratamento com enzima de restrição e separação por eletroforese em campo pulsado (PFGE)	53
4.5.6	Caracterização do complexo clonal através de PCR (RM)	55
4.6	ESTUDOS FISIOLÓGICOS.....	56
4.6.1	Determinação da concentração inibitória mínima de antimicrobianos	56
4.6.2	Determinação da concentração inibitória mínima de amins aromáticas alquiladas	57
4.6.3	Avaliação da habilidade de formação de biofilmes	58
4.6.4	Avaliação da atividade hemolítica	59
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	60
5	RESULTADOS	61
5.1	ASPECTOS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICOS.....	62
5.2	ESTUDOS MOLECULARES.....	67
5.2.1	Confirmação da identidade bacteriana por biologia molecular e deteção do gene <i>mec</i>	67
5.2.2	Tipagem do cassete estafilocócico <i>mec</i> (SCC<i>mec</i>)	69

5.2.3	Caracterização molecular das amostras de ORSA isoladas na UTI por PFGE e RM.....	70
5.3	ESTUDOS FISIOLÓGICOS.....	74
5.3.1	Determinação da concentração inibitória mínima de antimicrobianos.....	74
5.3.2	Determinação da concentração inibitória a aminas aromáticas alquiladas.....	76
5.3.3	Avaliação da produção de biofilme.....	77
5.3.4	Avaliação da atividade hemolítica.....	78
5.3.5	Correlação entre fenótipo de resistência com a expressão do fenótipo de virulência.....	79
5.3.6	Associação entre resistência antimicrobiana e os tipos de SCC <i>mec</i>	80
5.3.7	Associação entre os perfis genotípicos detectados e susceptibilidade aos antimicrobianos para as linhagens de ORSA isoladas na UTI.....	81
6	DISCUSSÃO.....	85
6.3	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	94
7	CONCLUSÕES.....	96
	REFERÊNCIAS.....	97
	APÊNDICES.....	121
	ANEXOS.....	167

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Desde que existem os hospitais, existem as infecções hospitalares e, apesar, de não haver dados registrados, sabe-se que era alta a incidência de infecções adquiridas no hospital, principalmente devido à elevada prevalência de doenças epidêmicas na comunidade e às precárias condições de higiene. No entanto, foi apenas na primeira metade do século XIX que a questão da infecção hospitalar passou a ser considerada pelos profissionais de saúde, e somente a partir da década de 70 que as instituições hospitalares começaram a fazer estudos mais aprofundados sobre o assunto.

Nos últimos anos o termo infecções hospitalares (IHs) vem sendo substituído por infecções relacionadas à assistência a saúde (IRAS), constituindo aquelas adquiridas por pacientes durante um tratamento específico para outra patologia, estando diretamente relacionado a procedimentos assistenciais à saúde ou hospitalização. No entanto, para estudos restritos ao ambiente hospitalar, o termo infecção hospitalar é ainda aceito.

Atualmente, as infecções hospitalares bacterianas constituem uma importante causa de morbidade e mortalidade em instituições de saúde de todo o mundo, constituindo um grave problema de saúde pública, tanto em países desenvolvidos quanto em países em desenvolvimento. Um grande número de pacientes é acometido por infecções hospitalares anualmente, resultando em tempo de hospitalização prolongado e altos custos para estas instituições.

Entre as bactérias frequentemente associadas às infecções hospitalares, destacam-se as do gênero *Staphylococcus*, por representarem importantes patógenos humanos causadores de um amplo espectro de doenças sistêmicas potencialmente fatais, além de diversas infecções oportunistas.

A etiologia da espécie *Staphylococcus aureus* em doenças infecciosas é reconhecida desde a época pré-antimicrobiana, com elevadas taxas de mortalidade. Dado o seu potencial patogênico, o *S. aureus* figura como a espécie mais importante do gênero em infecções humanas, tanto de origem hospitalar quanto comunitária. Em geral, essas infecções são precedidas pela colonização nasal, tanto de indivíduos sadios quanto hospitalizados.

Em especial, destaca-se *S. aureus* resistente a meticilina/oxacilina, e seu perfil de multirresistência que tem sido causa de uma dificuldade terapêutica significativa em muitos países, tornando-se um grave problema de saúde pública. Assim, torna-se essencial a

investigação de fatores de risco que possam estar associados a infecções por tais microrganismos, de modo a propiciar medidas preventivas que impeçam sua disseminação, sobretudo, intra-hospitalar. Além disso, devido ao crescente aumento da resistência que gera limitações aos tratamentos disponíveis, a busca por novas alternativas como a síntese de novas moléculas que apresentem potencial biológico é de extrema importância para o tratamento de doenças infecciosas.

Devido à grande variabilidade genética dos microrganismos, a resistência a drogas antimicrobianas tem se tornado um grave problema, do ponto de vista ecológico e clínico. A cada dia surgem relatos da crescente resistência de bactérias isoladas tanto em indivíduos saudáveis, quanto naqueles apresentando as mais diversas patologias. Desta forma, diversos estudos sobre a diversidade genética de microrganismos têm sido realizados, a fim de se compreender melhor os aspectos biológicos de agentes infecciosos, assim como a epidemiologia das doenças relacionadas, objetivando contribuir para o controle da disseminação do microrganismo tanto em hospitais quanto na comunidade.

Além disso, cada vez mais tem se buscado alternativas para a terapêutica de infecções associadas a microrganismos multirresistentes e vários estudos tem sido conduzidos, principalmente em testes com substâncias sintéticas com estrutura semelhante a antimicrobianos já disponíveis.

A contenção do fenômeno da resistência em nosso meio figura como um dos grandes desafios do século XXI, e vários são os apelos dos Órgãos de Saúde internacionais, que preconizam estudos sobre a crescente resistência bacteriana, o desenvolvimento de agentes antimicrobianos e os efeitos destes, nas doenças infecciosas.

Desta forma, considerando a potencialidade de *S. aureus* na etiologia das infecções relacionadas a assistência a saúde, carreando fatores de virulência e marcadores de resistência a drogas antimicrobianas, percebe-se a necessidade da geração de conhecimento científico sobre a colonização, ecologia, patologia, fisiologia e epidemiologia da resistência nessa espécie. Assim, dando sequência à linha de pesquisa “Estudo da ocorrência e susceptibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas da microbiota de seres humanos de ambiente hospitalar e da comunidade”, é proposto o presente projeto, com o qual se pretende contribuir para a geração de dados sobre a possível disseminação e evolução de *S. aureus* como agente etiológico de infecções associadas a cuidados de saúde.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 GENERALIDADES SOBRE INFECÇÕES HOSPITALARES (IHs)

No âmbito hospitalar, segundo a Portaria nº 2.616, de 12 de maio de 1998, do Ministério da Saúde, infecção hospitalar é aquela adquirida após a admissão do paciente e que se manifesta durante a internação ou após a alta, quando puder ser relacionada com a internação ou procedimentos hospitalares (BRASIL, 1998).

Representam uma importante causa de morbi-mortalidade, podendo resultar em um tempo prolongado de permanência no hospital, utilização de antimicrobianos alternativos de custo elevado na terapêutica, gerando um aumento nos custos de internação, tornando-se assim, uma importante questão mundial de saúde pública (DING et al., 2009; KLEVENS et al., 2007; MACHADO, 2001).

As taxas de incidência de IH diferem de um país para outro, assim como de uma instituição para outra, e dependem de fatores como a clientela, porte dos hospitais, especialidade médica envolvida, condições de higiene e eficácia de programas de controle de infecção nas instituições de saúde (FOGLIA, FRASER e ELWARD, 2007; JERASSY et al., 2006; ROSENTHAL et al., 2010). Estima-se que em países desenvolvidos, ocorram IHs em cerca de 2 a 18% dos pacientes internados, podendo chegar até cerca de 21 a 54%, quando consideram-se os pacientes internados na UTI (MACHADO, 2001). Outros estudos relataram taxas de 5 a 10% em pacientes adultos, enquanto em alas pediátricas, as taxas são de aproximadamente 15% (MIREYA et al., 2007; PITTET et al., 2008). Segundo Klevens e colaboradores (2007), nos Estados Unidos, 1,7 milhões de pacientes adquirem anualmente algum tipo de IHs, sendo que aproximadamente 99 mil morrem em decorrência destas.

No Brasil existe uma grande dificuldade na obtenção das taxas reais de infecção, por que, de modo geral, as IHs são ainda subnotificadas. No entanto, em setembro de 2004 é lançado o Sistema Nacional de Informação para o Controle de Infecções em Serviços de Saúde (SINAIS), que visa possibilitar a consolidação do sistema de monitoramento da qualidade da assistência dos serviços de saúde, através de dados e relatórios emitidos pelas Comissões de Controle de Infecção Hospitalar (CCIHs) (MACHADO, 2001).

Além disso, um estudo de vigilância epidemiológica, o *International Nosocomial Infection Control Consortium* (INICC), envolvendo oito países em desenvolvimento, incluindo o Brasil, foi realizado entre 2002 e 2005 através de dados das unidades de terapia intensiva dos hospitais participantes. Este estudo apontou a existência de uma incidência elevada de infecções relacionadas a dispositivos médicos nos países da América Latina, que chegou a ser até quatro vezes maiores do que a encontrada nos Estados Unidos (ROSENTHAL et al., 2006). Ainda sim, dados brasileiros revelaram que mais da metade dos neonatos com baixo peso desenvolvem algum tipo de infecção durante a permanência no hospital e cerca de 20% dos adultos submetidos a cirurgias adquirem infecção de sítio cirúrgico até 15 dias após a alta (OLIVEIRA, LIMA e LIMA., 2007; PESSOA-SILVA et al., 2004).

Destaca-se que em todo o mundo, milhões de pacientes são acometidos anualmente pelas IHS resultando em maior período de hospitalização e principalmente nos altos custos para as instituições de saúde (GRAVES et al., 2007; ROSENTHAL et al., 2010). Em termos de custos, o tratamento de sepses ocorridas após procedimentos cirúrgicos pode chegar a US\$ 33 mil/paciente, enquanto que, casos de pneumonia, até US\$ 47 mil/paciente (EBER et al., 2010).

Em relação aos principais fatores de risco que contribuem para a aquisição dessas infecções destaca-se, idade prematura ou avançada, tempo de internação prolongado, principalmente em UTIs, presença de doenças crônico-degenerativas, imunossupressão, antibioticoterapia prévia e utilização de dispositivos invasivos (CEZÁRIO et al., 2009; FOGLIA, FRASER e ELWARD, 2007; PARKINS et al., 2010; WIBBENMEYER et al., 2010). Segundo Marcel e colaboradores (2008), os procedimentos invasivos são os principais fatores de risco para IHS, no entanto, ele destaca que, apesar de serem procedimentos utilizados com frequência cada vez maior (cirurgias, uso de cateteres intravasculares), o risco de infecção é controlado progressivamente com a utilização e reforço de medidas preventivas. Para Machado (2001), a importância desses procedimentos tem influência direta no planejamento da busca ativa e vigilância epidemiológica das IHS, gerando inclusive a necessidade que se utilizem indicadores específicos para pacientes submetidos a estes procedimentos.

Além disso, os constantes avanços da medicina, que vem prolongando o tempo de sobrevivência de pacientes imunocomprometidos e o aumento na expectativa de vida da

população são aspectos diretamente responsáveis pelo aumento nas taxas de IHS (WHO, 2002).

A distribuição de infecções por sítios anatômicos varia conforme a população estudada e o método de vigilância epidemiológica usado. De forma geral, sabe-se que as mais frequentes são as infecções de vias urinárias, sítios cirúrgicos e vias respiratórias. Em alguns hospitais gerais, observa-se aumento crescente das infecções de sítio cirúrgico e, nas unidades de tratamento intensivo, das pneumonias nosocomiais (MACHADO, 2001). Dados do *National Nosocomial Infections Surveillance System* (NNIS) (2004) apontavam as infecções das vias urinárias como as mais frequentes (27,2%), seguidas das infecções de sítio cirúrgico (18,7%), pneumonias nosocomiais (17,3) e infecção primária de corrente sanguínea (15,8%). Estudos mais recentes destacam as IHS mais prevalentes, na seguinte ordem: infecções de trato urinário, pneumonias associadas à ventilação mecânica, infecções de sítio cirúrgico, infecções de pele ou tecido subjacente e bacteremias relacionadas ao uso de dispositivos intravasculares (GOSBELL, 2005; MARCEL et al., 2008). Ainda segundo Marcel e colaboradores, as bacteremias ocorrem com baixa frequência, mas possuem altas taxas de mortalidade e surgem, na maioria das vezes, como complicações de outras infecções desenvolvidas pelos pacientes durante o período de hospitalização.

Em relação à distribuição das infecções pelas áreas do hospital, as unidades com maiores índices de IHS são unidades de tratamento para grandes queimados (92%), UTIs, nas quais quase a metade dos adultos ou neonatos internados adquirem algum tipo de infecção e enfermarias de clínica cirúrgica, com cerca de 20% dos pacientes acometidos (CAMÍ, GARCIA e AYALA, 2008; HARBARTH et al., 1999; MIREYA et al., 2007; OLIVEIRA, LIMA e LIMA., 2007; ONCUL et al., 2009).

Apesar dos avanços significativos na prevenção e controle das IHS, como a melhoria dos métodos de vigilância epidemiológica, das técnicas de desinfecção, esterilização, assepsia e modernização da arquitetura hospitalar, observa-se ainda um aumento de seus índices. Vários fatores tendem a explicar este fenômeno mundial, entre os quais, o desenvolvimento econômico e tecnológico, levando ao aumento da expectativa de vida e, conseqüentemente, elevando a proporção de pacientes internados com maior risco de infecção. Tais pacientes, complexos na sua maioria, demandam procedimentos diagnósticos e terapêuticos invasivos que contribuem para aumentar ainda mais o risco de infecção. Além disso, o uso indiscriminado de antimicrobianos provoca alterações na epidemiologia da

microbiota hospitalar, favorecendo a emergência de linhagens bacterianas multirresistentes (MARTINS, 2001).

Assim, as Comissões e os Serviços de Controle de Infecção Hospitalar têm intensificado a vigilância epidemiológica com o objetivo de monitorar tais microrganismos, incentivando a adoção de medidas de prevenção e controle (MARTINS, 2001). Entre as principais medidas, destaca-se a higienização das mãos, cujo aumento da adesão a essa prática, seja o maior desafio das CCIHs nos hospitais e nos estabelecimentos de saúde (OLIVEIRA, 2003). Desde a demonstração da importância da transmissão das infecções através das mãos dos profissionais, por Ignaz P. Semmelweis em 1860, a lavagem das mãos tornou-se a prática mais importante e eficaz para prevenção e controle das IHS. Além de proteger o paciente, os processos de higienização representam uma importante barreira de biossegurança contra a disseminação de microrganismos entre pacientes, artigos e superfícies hospitalares (BOYCE e PITTET, 2002; PITTET e MCGUCKIN, 2001; WENDT, 2001).

Ressalta-se que a transmissão de microrganismos envolve contato físico direto entre os profissionais de saúde e os pacientes, ou mesmo entre os pacientes. As mãos representam o mecanismo mais frequente de transmissão de patógenos em nível hospitalar, e geralmente estão envolvidas na transmissão da microbiota transitória adquirida no contato com pacientes infectados e, na maioria das vezes, apenas colonizados. Representam uma transmissão silenciosa, e a prevenção depende da correta anti-sepsia das mãos antes e após a assistência ao paciente (MACHADO, 2001).

É importante destacar que aproximadamente 70% das IHS são de origem endógena, e o restante de origem exógena. Considera-se fonte de infecção endógena quando os pacientes apresentam doenças infecciosas oriundas de microrganismos presentes na sua microbiota, principalmente em situações clínicas de comprometimento imunológico, tais como doenças que exigem tratamento intensivo prolongado de antimicrobiano, idade avançada e prematuridade. Os adventos de procedimentos terapêuticos e propedêuticos cada vez mais invasivos também contribuem para o aumento dessas infecções (MACHADO 2001; PITTET, 1999).

As bactérias constituem os principais microrganismos responsáveis pelas IHS, seguidos pelos fungos e os vírus. Destacam-se, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulase-negativos*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Clostridium difficile*, *Enterococcus spp.*, *Escherichia coli* e outras enterobactérias e *Candida spp.*, estão

entre os principais microrganismos envolvidos em IHS, cujas taxas variam bastante de acordo com o tipo de infecção (MACHADO, 2001; MUTO et al, 2003; SARVIKIVI et al., 2008; ROSENTHAL et al., 2010).

Um dos grandes problemas, principalmente dentro do ambiente hospitalar é a emergência de bactérias multirresistentes dos gêneros *Staphylococcus*, *Pseudomonas* e *Enterococcus* (MACHADO, 2001). Segundo o NNIS (2004), esse perfil de multiresistência, encontrado principalmente em espécies de *Staphylococcus* resistentes à meticilina/oxacilina, *Enterococcus* resistentes à vancomicina e *Pseudomonas aeruginosa* resistentes as quinolonas e carbapenêmicos, constitui um agravante, principalmente por essas bactérias estarem frequentemente associadas às IHS. Infecções por patógenos com esse perfil de multiresistência, resultam em gastos financeiros, taxas de mortalidade e tempo de hospitalização ainda mais elevados quando comparado a infecções causadas por bactérias da mesma espécie que não apresentam essa característica (FOGLIA, FRASER e ELWARD, 2007).

Rosenthal e colaboradores (2010) demonstraram em um estudo envolvendo 28 países, que mais da metade das bactérias agentes de IHS são resistentes ao antimicrobiano de escolha para o tratamento das infecções causadas pelo patógeno.

2.2 ASPECTOS GERAIS SOBRE O GÊNERO *Staphylococcus*

O gênero *Staphylococcus* pertence à família *Staphylococcaceae*, sendo composto por 48 espécies e 26 subespécies (EUZÈBY, 2014). Estes microrganismos apresentam-se como cocos Gram positivos, com 0,5 –1,5µm de diâmetro (MADIGAN, MARTINKO e PARKER, 2004). Suas células ocorrem sozinhas, em pares, tétrades, pequenas cadeias (3 ou 4 células) ou irregulares na forma de cachos. Estas bactérias são imóveis, resistentes à bacitracina, não formadora de esporos, normalmente catalase positivos (com exceção das espécies *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius* e *S. saccharolyticus*, que são catalase negativos) e anaeróbios facultativos. Geralmente, toleram concentrações de até 10% de NaCl com temperatura ótima de crescimento entre 30°C e 37°C (BANNERMAN, 2003; BANNERMAN e PEACOCK, 2007; HOLT et al., 1994; KONEMAN, 2008).

Estes microrganismos estão presentes no ambiente (solo, ar e água) e também na pele e mucosas de mamíferos, podendo ser encontrados na cavidade bucal, glândulas

mamárias e nos tratos geniturinário, respiratório e gastrintestinal dos hospedeiros (HUBER et al., 2011; JARLOV, 1999; LOWDER e FITZGERALD, 2010; RHODEN e MILLER, 1995; WILKINSON, 1997).

Entre as espécies de *Staphylococcus* encontradas em seres humanos e outros primatas, destacam-se *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. haemolyticus*, *S. capitis*, *S. caprae*, *S. saccharolyticus*, *S. warneri*, *S. pasteurii*, *S. hominis*, *S. lugdunensis*, *S. auricularis*, *S. cohnii*, *S. xylosum*, *S. simulans* entre outras. Muitas destas espécies residem no homem, porém *S. xylosum* e *S. simulans* são geralmente microrganismos transitórios, sendo, primariamente, adquiridos de animais domésticos, enquanto algumas espécies de *Staphylococcus* de seres humanos são transitórios ou temporariamente residentes no animal doméstico (BANNERMAN, 2003).

As espécies do gênero *Staphylococcus* podem ser classificadas em coagulase-negativos (SCN) e coagulase-positivos, de acordo com a produção de uma enzima denominada coagulase e sua capacidade de converter o fibrinogênio do plasma em fibrina, resultando na formação de um coágulo (ARCHER, 1998; KLOOS e BANNERMAN, 1999; SMITH e JARVIS, 1999).

No grupo dos coagulase-positivos, destaca-se a espécie *Staphylococcus aureus*, pelo seu potencial patogênico e por sua prevalência tanto em infecções associadas a cuidados médicos como aquelas adquiridas na comunidade (CASEY, LAMBERT e ELLIOTT, 2007; SCANVIC et al., 2001; VINCENT et al., 2009). Estes microrganismos podem causar desde infecções cutâneas superficiais (impetigo e abscessos) até infecções invasivas, como bacteremias, endocardites, pneumonias e meningites (SMITH e JARVIS, 1999). Além disso, causam síndromes clínicas relacionadas à produção de toxinas, incluindo intoxicação alimentar associada à ingestão de toxina pré-formada, síndrome da pele escaldada e síndrome do choque tóxico estafilocócico (BARG e HARRIS, 1997).

No grupo dos *Staphylococcus* coagulase-negativos, encontra-se a maioria das espécies do gênero *Staphylococcus*, cuja importância clínico-microbiológica tem sido reconhecida como agentes etiológicos de várias doenças de caráter oportunistas, além de IHS (JARLOV, 1999). Nos últimos anos, os SCN são reconhecidos como a principal causa de infecções em unidades neonatais e de bacteremias associadas ao uso prolongado de cateteres vasculares (KASSIS et al., 2009; MIREYA et al., 2007; SILVERSTEIN e MOYLAN, 2010).

2.2.1 *Staphylococcus aureus*

Entre as espécies do gênero *Staphylococcus*, a de maior interesse médico é o *S. aureus*, que está frequentemente relacionado com diversas infecções graves em seres humanos, tanto de origem hospitalar, quanto adquirida na comunidade (CASEY, LAMBERT e ELLIOTT, 2007; CASSETTARI, STRABELLI e MEDEIROS, 2005).

O principal reservatório de *S. aureus* são os seres humanos, sendo frequente sua transmissão através de fômites, mãos de profissionais de saúde, secreções nasais ou contato direto entre indivíduos apresentando lesões infectadas, (CARVALHO, MAMIZUKA e GONTIJO FILHO, 2010; HANSELMAN et al., 2009)

Entre os sítios do corpo que podem ser colonizados como pele, orofaringe e região perianal, destaca-se a cavidade nasal, mais precisamente a região anterior das narinas, como o ambiente mais frequente, o que evidencia seu importante papel na epidemiologia e na patogênese das infecções estafilocócicas, pois pacientes previamente colonizados, constituem fonte de transmissão e estão mais susceptíveis a apresentar alguma infecção (CHAMBERS e DELEO, 2009; DEUREMBERG e STOBBERINGH, 2008; LOWY, 1998).

A prevalência da colonização nasal é cerca de 30% na população adulta, podendo ser ainda maior nos profissionais de saúde. Assim, acredita-se que o desenvolvimento de infecções estafilocócicas esteja frequentemente relacionado a este tipo de colonização. As infecções causadas por esse microrganismo variam entre brandas, na pele, até infecções mais graves, agudas e piogênicas, que podem disseminar o microrganismo através da corrente sanguínea e comprometer diferentes sítios e a vida do paciente (BOKAREWA, JIN e TARKOWSKI, 2006; BURTON et al., 2009; CASEY, LAMBERT e ELLIOTT, 2007; COOKE e BROWN, 2010; CASSETTARI, STRABELLI e MEDEIROS, 2005; KLUYTMANS, VAN BELKUM e VERBRUGH, 1997).

O *S. aureus* encontrado na cavidade nasal ou na pele de neonatos, crianças e adultos pode, a partir desses sítios, disseminar e alcançar outras regiões da pele e das mucosas. A partir de uma lesão na pele, *S. aureus* pode causar infecções primárias, como furúnculos, foliculites, celulites, impetigo e infecções operatórias em diversos sítios. Uma evolução dessas doenças pode levar a quadros graves de osteomielite, endocardite, pneumonia, meningite, sepse, abscessos e infecções graves do trato urogenital, no sistema nervoso central e em vários órgãos intra-abdominais, colocando em risco a vida do paciente

(BURTON et al., 2009; FOURNIER e PHILPOTT, 2005; GUPTA et al., 2011; ROBERT e CHAMBERS, 2005). Um fato que indica ser a mucosa nasal o principal sítio de colonização do *S. aureus* está no fato de que se o mesmo deixar de colonizar o local através de algum tratamento, o microrganismo também será eliminado de outros sítios (KLUYTMANS, VAN BELKUM e VERBRUGH, 1997).

É importante relatar que, invariavelmente, a colonização nasal pelo *S. aureus* é assintomática, ou seja, o indivíduo não desenvolve nenhum quadro de infecção. Dessa forma, essa colonização tem grande importância clínica, uma vez que, com as narinas colonizadas, o indivíduo contamina as próprias mãos e passa a ser um veículo transmissor da bactéria no mecanismo de infecções por contato. Assim, principalmente em hospitais, o portador assintomático pode ser um paciente, um visitante, ou até mesmo um profissional de saúde. Alguns estudos demonstraram também que o carregamento nasal contribui para a transmissão da bactéria por disseminação aérea (CARVALHO et al., 2005; CAVALCANTI et al., 2005; COATES, BAX e COATES, 2009).

2.2.1.1 Fatores de Virulência

A capacidade de colonização e a patogenicidade do *S. aureus* está relacionada aos seus fatores de virulência, os quais têm papel relevante na adesão celular, na captação de nutrientes e na sua evasão da resposta imunológica do hospedeiro (SANTOS et al., 2007). Uma variedade de fatores de virulência faz com que *S. aureus* seja considerado um dos patógenos humanos mais versáteis (ARCHER, 1998; LAMBRIS, RICKLIN e GEISBRECHT, 2008).

Entre os principais fatores de virulência já descritos para *S. aureus*, destacam-se os componentes da superfície microbiana, as chamadas MSCRAMs (*Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix*), que são importantes receptores na adesão do microrganismo e que se ligam a componentes da matriz extracelular do hospedeiro. As principais MSCRAMs de *S. aureus*, que estão ligadas ao peptidoglicano da parede celular, são as proteínas que se ligam ao fibrinogênio, como o fator *clumping* A e B (ClfA e ClfB), proteínas que se ligam ao colágeno (Cna), à elastina (Ebp), ao ácido siálico ósseo (Bbp) e proteínas que se ligam à fibronectina A e B (FnBPA FnBPB), que são reconhecidas como importantes invasinas capazes de promover a entrada do *S. aureus* em vários tecidos

(CLARKE et al., 2002; DOWNER et al., 2002; ENTENZA et al., 2000; PATTI et al., 1994; TUNG et al., 2000; FOSTER, 2005).

Ao aderir-se a qualquer tipo de tecido ou até mesmo a algum tipo de superfície inanimada, o *S. aureus* pode formar uma estrutura complexa denominada biofilme, que atua como barreira mecânica tanto para o sistema imunológico quanto para a ação das drogas antimicrobianas, constituindo-se em um grave problema no tratamento das infecções. Além disso, o biofilme está frequentemente associado a infecções decorrentes de próteses e outros dispositivos médicos (DONLAN, 2001). O biofilme tem se tornado um grave problema na área de saúde, pois, está diretamente relacionado ao aumento da resistência dos microrganismos aos antimicrobianos e a dificuldade de tratamento dessas infecções, uma vez que as células aderidas no biofilme encontram-se menos expostas aos antimicrobianos, e adicionalmente, neste ambiente há maior concentração de nutrientes, como carbono e nitrogênio (CONSTERTON et al, 1999; DONLAN, 2001).

Praticamente todas as linhagens de *S. aureus* produzem enzimas, como proteases, nucleases, lipases, hialuronidases e colagenases, cujas funções principais estão associadas à invasão do patógeno nos tecidos do hospedeiro, embora possam auxiliar também na obtenção de nutrientes através do metabolismo de substâncias dos tecidos (DINGES, ORWIN e SCHLIEVERT, 2000; HYNES e WALTON, 2000).

Como patógeno clássico, *S. aureus* é capaz de liberar um arsenal de proteínas tóxicas, dentre as quais algumas se destacam, como as enterotoxinas (CARMO, 2001). Bergdoll (1989) descreveu as enterotoxinas estafilocócicas como proteínas simples, de peso molecular entre 26 a 29 KDa, estruturadas em uma única cadeia polipeptídica rica em lisina, tirosina e ácidos aspártico e glutâmico. Apresentam propriedade de termorresistência, e esta característica faz com que a indústria alimentícia tenha um controle rigoroso, visto que as enterotoxinas podem persistir na preparação final do alimento, mesmo após o processamento térmico, sendo 0,05 µg/Kg considerada a dose tóxica mínima para provocar vômito e diarreia. Muitos tipos de enterotoxinas têm sido identificados com base em métodos sorológicos, e denominadas A, B, C1, C2, C3, D, E, G, H, I, J, K e L. Contudo, acredita-se que cerca de 5% das intoxicações alimentares por *S. aureus* sejam causadas por toxinas ainda não identificadas, e que um terço das amostras coagulase positivas sejam produtoras de enterotoxinas (GÓMEZ-LUCIA et al., 1989, SU e WONG, 1993; DINGES e ORWIN, 2000; ORWIN et al., 2001).

A proteína A, que está inserida no peptidoglicano e ácidos teicóicos da parede celular estafilocócica, constitui um importante fator de virulência, sendo encontrada em cerca de 95% das linhagens. Essa proteína está envolvida na patogenia das infecções por *S. aureus* à medida que reconhece a porção Fc das imunoglobulinas G, favorecendo o reconhecimento de antígenos, além de fixar o complemento (JOHN e BARG, 1996; NAVARRE e SCHNEEWIND, 1999; FOSTER, 2005).

S. aureus possui também a capacidade de secretar uma diversidade de exoproteínas, cuja função principal é a inibição das células do sistema imune do hospedeiro, e que estão relacionadas diretamente na patogenicidade do microrganismo, como as toxinas α , β , δ e γ , além da toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1), uma variedade de enterotoxinas, toxinas esfoliativas e leucocidinas. TSST-1 e a grande maioria das enterotoxinas são conhecidas também como superantígenos, pois possuem capacidade de ativar linfócitos T, desencadeando uma série de respostas inflamatórias exarcebadas (DINGES, ORWIN e SCHLIEVERT, 2000; FOSTER, 2005; LOIR, BARON e GAUTIER, 2003).

Entre as exoproteínas produzidas por *S. aureus*, destaca-se a α -hemolisina, que está presente na grande maioria dos isolados, cuja função principal está na capacidade de lise celular, resultando na lise de eritrócitos e na consequente morte de células eucarióticas. Ela ainda pode causar dermonecroses e estar envolvida em efeitos de neurotoxicidade (DINGES, ORWIN e SCHLIEVERT, 2000; MENESTRINA, SERRA e PRÉVOST, 2001). O gene que codifica a produção desta hemolisina é o *hla*, que está presente na maioria das linhagens de *S. aureus*. No entanto, nem todas as linhagens que contém o gene expressam a toxina, ou a expressam de forma reduzida, o que pode significar uma adaptação da linhagem bacteriana no meio (SABERSHEIKH e SAUDERS, 2004).

A leucocidina de Pantone Valentine (PVL), composta pelas unidades LukS-PV e LukF-PV, codificadas pelos genes *lukS-PV* e *lukF-PV*, que estão localizados no *locus pvl* do genoma de um bacteriófago, é uma toxina que possui atividade citolítica contra células polimorfonucleares, macrófagos e monócitos. Sua importância tem sido reconhecida e destacada principalmente por ser frequentemente isolada de linhagens de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) e também sensíveis (MSSA) causadoras de infecções principalmente de origem comunitária (BARTELS et al., 2007; DAVIS et al., 2005; KANEKO e KAMIO, 2004; ROBERTS et al., 2008; WANNET et al., 2005).

Alguns estudos demonstraram a ocorrência de pneumonias, envolvendo linhagens produtoras de PVL, que evoluíram rapidamente, levando à morte de indivíduos imunocompetentes, sem qualquer fator de risco aparente (KANEKO e KAMIO, 2004; FRAZEE et al., 2005). Outros estudos demonstraram a ocorrência de linhagens de MRSA produtoras de PVL em todos os isolados de infecções comunitárias (DUFOUR et al., 2002; VANDENESCH et al., 2003).

2.3 *Staphylococcus* E O FENÔNEMO DA RESISTÊNCIA BACTERIANA A DROGAS

Desde a sua instituição como suporte terapêutico, as drogas antimicrobianas têm reduzido a mortalidade, mas não a persistência de doenças infecciosas. Devido ao uso e abuso, estas drogas estimulam a evolução bacteriana em direção ao desenvolvimento de resistência, pela busca de novos mecanismos de adaptação, que são transmitidos às novas gerações. Desde então, este fenômeno tem adquirido uma importância considerável em saúde pública (LEVY, 1998; RAPINI et al., 2004).

A resistência aos antimicrobianos é um fenômeno genético, relacionado à existência de genes contidos no microrganismo que codificam proteínas que alteram diferentes mecanismos bioquímicos ou proporcionam modificações na estrutura celular que impedem a ação das drogas (TAVARES, 2000).

A resistência pode ser originada através de mutações ou da importação de marcadores, consistindo na resistência transferível, que se faz através dos mecanismos de transdução, transformação e conjugação (TAVARES, 2000; ZAVADINACK et al., 2001). Nos microrganismos resistentes, os genes de resistência podem estar inseridos no cromossomo ou em elementos extracromossômicos como os plasmídios, transposons e integrons. Além disso, destaca-se que a ligação de genes de resistência para múltiplos antimicrobianos em cassetes permite a transferência volumosa da resistência que caracteriza microrganismos multirresistentes (HENRIQUES et al., 2006).

Embora a multirresistência aos antimicrobianos tenha aparecido em praticamente todos os principais agentes patogênicos humanos, uma atenção particular tem sido dada a espécies de bactérias Gram-positivas, que se tornaram predominantes nos anos 90 como causadoras de IHS e também comunitárias (LENCASTRE, 2001).

O fenômeno da multirresistência aos antimicrobianos é uma das principais características observadas entre linhagens bacterianas hospitalares, e têm incluído, além da resistência à oxacilina e a outros β -lactâmicos, também a resistência à eritromicina, clindamicina, tetraciclina, clorafenicol, rifampicina, aminoglicosídeos e quinolonas (PEACOCK, 2005).

A introdução da penicilina no início dos anos 40, indicada para terapêutica de infecções estafilocócicas, devido às altas taxas de resistência às sulfonamidas, marca o início de uma nova era (TAVARES, 2000). No entanto, linhagens do gênero *Staphylococcus* resistentes à penicilina foram rapidamente detectadas e, em dez anos, cerca de 50 a 60% dos isolados tornaram-se resistentes (CDC, 2002; LIVERMORE, 2003). Com o advento das penicilinas penicilinase-resistentes (metecilina e oxacilina), cefalosporinas e outras drogas usadas na terapia contra estafilococos, essa resistência recuou, embora, ainda no ano de 1961, surgisse o primeiro relato de resistência à metecilina. Nos anos 80, a situação se agravou com o ressurgimento dos estafilococos resistentes à oxacilina. Por fim, nos anos 2000, houve o surgimento de *Staphylococcus* spp. oxacilina-resistentes na comunidade, com virulência aumentada (MACHADO, 2006; WERTHEIM et al., 2005). As taxas de *S. aureus* resistentes à penicilina alcançam a marca de 95%, demonstrando ser uma droga pouco eficaz. Tal resistência é mediada pela produção da enzima penicilinase, uma β -lactamase, codificada pelo gene *blaZ* (KAASE et al., 2008; STREIT et al., 2004).

Os aminoglicosídeos, tais como gentamicina e tobramicina, são frequentemente usados em combinação com β -lactâmicos ou glicopeptídeos. Os *Staphylococcus* apresentam resistência aos aminoglicosídeos por meio de modificação enzimática (EMANEINI et al., 2009). Algumas bactérias do gênero *Staphylococcus* produzem a enzima bifuncional AAC(6')/APH(2''), que é codificada pelo gene *aac(6')-aph(2'')*, que é capaz de inativar uma ampla faixa de aminoglicosídeos, tais como gentamicina, tobramicina e amicacina (MARTINEAU et al., 2000, EMANEINI et al., 2009).

A resistência à eritromicina em bactérias do gênero *Staphylococcus* está normalmente associada com a resistência a outros macrolídeos. Estudos demonstram que tais bactérias podem ser portadoras dos genes *ermA*, *ermB* e *ermC*, que codificam metilases. Outro mecanismo de resistência à eritromicina é conferido pelo gene *mrsA*, que codifica uma bomba de efluxo dependente de ATP. Tal gene confere resistência também às estreptograminas tipo B nos estafilococos (CHAIEB et al., 2007).

As estreptograminas constituem um grupo de antibióticos formados por uma mistura de duas classes de componentes quimicamente distintos, designados estreptograminas A e B. Quinupristina-dalfopristina é uma estreptogramina semi-sintética injetável, resultante da mistura de quinupristina e dalfopristina (na proporção 30:70), que, por sua vez, são derivados semi-sintéticos de pristinamicina IA (PIA: estreptogramina B) e pristinamicina IIA (PIIA: estreptogramina A) (TAVARES, 2002).

Os estafilococos apresentam resistência à tetraciclina tanto por modificação ribossomal codificada pelo gene *tetM* quanto mediada pelo gene *tetK* (STROMMINGER et al., 2003).

2.3.1 *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina/oxacilina

MRSA (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) é uma sigla frequentemente utilizada para se referir às amostras de *S. aureus* com resistência à meticilina, oxacilina, nafcilina e demais antimicrobianos β -lactâmicos. Porém, no Brasil, a sigla ORSA (oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*) é mais apropriada para uso, devido ao fato da oxacilina ser utilizada em nosso país, além do fato de ser a droga recomendada para testes fenotípicos segundo o CLSI (CLSI 2007).

No início da resistência às penicilinas penicilinase-resistentes, amostras de MRSA mantinham-se restritas a centros médicos de referência e hospitais de nível terciário, mas não tardaram a se alastrar para serviços e centros de saúde de menor complexidade (FARR, 2004; OLIVEIRA, TOMASZ e DE LENCASTRE, 2002). Soma-se a isso o fato de MRSA, não ser mais um patógeno relacionado apenas a infecções adquiridas no ambiente hospitalar (*Hospital-Acquired* MRSA, HA-MRSA). Em meados dos anos 90, surgiram os primeiros relatos de infecções por MRSA associadas à comunidade (*Community-Acquired* MRSA, CA-MRSA), em pessoas sem fatores de risco identificáveis, como o contato direto e indireto com serviços de saúde (CHAMBERS, 2001; GORAK, YAMADA e BROWN, 1999; HEROLD et al., 1998).

A resistência à meticilina/oxacilina em *S. aureus* é determinada, na grande maioria das vezes, pela aquisição do gene *mecA*, que codifica a síntese de proteínas ligadoras de penicilina (*penicillin-binding proteins* - PBPs) 2a ou 2' (PBP2a ou PBP2'), que atuam como transpeptidases durante a síntese da parede celular bacteriana, mas que possuem uma

baixa afinidade não só para a oxacilina como para os outros antimicrobianos β -lactâmicos (CHAMBERS, 1993; ITO et al., 2003). O gene *mecA* encontra-se inserido em um elemento genético móvel, o chamado *staphylococcal cassette chromosome mec* (SCC*mec*), que tem importância fundamental na transmissão de resistência e na epidemiologia da bactéria. Inicialmente foi denominado de ilha genômica de resistência, por conter genes de resistência a outros antimicrobianos e genes codificadores de diversas enzimas necessárias à adaptação das bactérias em diversos ambientes (ITO et al., 2001; KATAYAMA, ITO e HIRAMATSU, 2000; LOWY, 2003). O SCC*mec* está integrado na região 3' de uma região de fase aberta de leitura (*orf*, *open reading frame*) denominada *orfX*, que tem função desconhecida e que se encontra próxima à origem de replicação do cromossomo bacteriano (DEUREMENTERBERG e STOBBERINGH, 2008; KATAYAMA, ITO e HIRAMATSU, 2000).

Uma análise mais detalhada desta região ao longo dos anos permitiu a definição de duas regiões essenciais e comuns a todos os estafilococos resistentes à oxacilina, o complexo do gene *mec*, no qual está inserido o gene *mecA*, juntamente com genes reguladores de sua transcrição, *mecI* e *mecRI* e o complexo do gene *ccr* (*cassette chromosome recombinase*), que apresenta genes que codificam as recombinases reconhecidas por segmentos terminais. As sequências entre os complexos foram classificadas como regiões *junkyard* ou região J. O complexo SCC*mec* pode apresentar elementos adicionais associados, como segmentos de DNA (cópias de plasmídeos, sequências de inserção e transposons), que codificam genes de resistência para outros antimicrobianos (HIRAMATSU et al., 2001; ITO et al., 2003; KATAYAMA, ITO e HIRAMATSU, 2000).

Considerando-se então os complexos do gene *mec* com suas classes A, B, C (C1 e C2) e D e *ccr* com os tipos 1, 2, 3, 4 e 5, são descritos, até o momento, onze tipos de elementos SCC*mec*, classificados de I a XI (HIGUCHI et al. 2008; IWG-SCC, 2013; ITO et al, 2004; MARTINS e CUNHA, 2007; OLIVEIRA et al., 2006, ZHANG et al., 2009).

Enquanto os *S. aureus* resistente à metilina de origem hospitalar carregam SCC*mec* dos tipos I, II, III, VI e VIII, os CA-MRSA estão mais associados aos tipos IV, V e VII. Os SCC*mec* tipos IX, X e XI foram descritos em 2011 em algumas linhagens comunitárias isoladas no Japão (tipos IX e X) (LI et al., 2011) e na Irlanda (tipo XI) (SHORE et al., 2011) e ainda permanecem restritos aos seus países de origem. No que diz respeito à disseminação de genes de resistência, os dos tipos I, IV, V e VII, por apresentarem estruturas de SCC*mec* menores, conferem apenas resistência aos β -lactâmicos, enquanto os tipos II e III,

por apresentarem estruturas de *SCCmec* maiores, determinam resistência a outras classes de antimicrobianos, como os aminoglicosídeos, tetraciclinas e até mesmo alguns metais pesados, por possuírem elementos genéticos adicionais (plasmídeos e transposons) integrados aos seus cassetes (HIGUCHI et al. 2008; ITO et al., 2001; ITO et al., 2003; ITO et al., 2004; MONECKE et al., 2013; OLIVEIRA, MILHEIRIÇO e DE LENCASTRE, 2006).

O *SCCmec* tipo I, com poucos determinantes de resistência, era encontrado entre amostras MRSA na década de 1960, quando poucos antimicrobianos estavam disponíveis, no entanto este foi sendo substituído a partir da década de 1980 pelos *SCCmec* tipos II e III, carreando múltiplos genes de resistência a antimicrobianos, que se tornaram prevalentes (ENRIGHT et al., 2002; HIRAMATSU et al., 2001; ITO et al., 2001).

É importante afirmar que a resistência fenotípica à oxacilina é variável e dependente da expressão do gene *mecA*. Essa variabilidade é denominada heterorresistência fenotípica, e se caracteriza pelo fato de que toda população bacteriana heterogeneamente resistente, assim como todas as células, carrega o gene *mecA*, marcador genotípico da resistência, porém nem todas expressam fenotipicamente sua resistência da mesma forma, pelo fato de que cada linhagem de MRSA apresenta um perfil característico da proporção de células que crescem na presença de concentrações específicas de oxacilina e em diferentes condições ambientais (LOWY, 2003; MARANAN et al., 1997).

Outros mecanismos de resistência à oxacilina podem ocorrer, mas são mais raros. Estes incluem a superprodução de β -lactamases (denominada resistência *boderline*) e a produção de outras PBPs diferentes de PBP2a, porém com graus variados de afinidade pelos betalactâmicos (TOMAZ et al., 1989; MIMICA e MENDES, 2007). Esses isolados que produzem grandes quantidades de β -lactamases ou produzem PBPs modificadas, em geral, apresentam resistência fenotípica de baixo grau (MARANAN et al., 1997).

Atualmente, a detecção do gene *mecA* pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) é considerada o método padrão ouro para confirmação de isolados oxacilina-resistentes, e por isso é utilizada em vários estudos que analisam a sensibilidade e especificidade de diversos métodos fenotípicos. Além desta técnica, existem outros métodos que permitem esta observação, como disco difusão, detecção da concentração inibitória mínima, triagem em ágar com oxacilina, aglutinação em látex e testes em sistemas automatizados (ALCARÁZ et al., 2003; CAIERÃO et al., 2004; CORSO et al., 2004; FERREIRA et al., 2003; LOUIE et al., 2001; ZBINDEN et al., 2001).

As taxas de resistência à oxacilina em *S. aureus* têm variado bastante nos últimos anos no Brasil. Estudo envolvendo hospitais de São Paulo, Rio de Janeiro, Brasília, Florianópolis e Porto Alegre, desenvolvido entre os anos de 1997 a 2001, envolvendo 1.516 amostras de *S. aureus* revelaram taxas médias de 38,0% de resistência à oxacilina (SADER et al., 2004). O mesmo estudo, desenvolvido entre os anos de 2005 a 2008, envolvendo 2.218 amostras de *S. aureus*, revelou taxas médias de 31,0% de resistência à oxacilina, e a maioria destes, também apresentou altas taxas de resistência à eritromicina, clindamicina, ciprofloxacina e levofloxacina (GALES et al., 2009). Um estudo realizado no ano de 2006, analisando amostras de *S. aureus* de pacientes internados no HU/UFRJ, revelou uma taxa de 37,0% de resistência à meticilina (VIVONI et al., 2006).

Desta maneira, estes dados enfatizam a necessidade de se realizar testes de susceptibilidade aos antimicrobianos, afim de se identificar linhagens de *S. aureus* resistentes à meticilina o mais precocemente possível, para que se possa utilizar a terapia adequada, diminuindo, com isso, o uso desnecessário de glicopeptídeos (HUSSAIN et al., 2002).

A contenção do fenômeno da resistência a drogas figura como um dos grandes desafios da ciência no século XXI, e vários são os apelos dos Órgãos de Saúde Internacionais, que preconizam estudos regionais sobre a crescente resistência bacteriana, o desenvolvimento de agentes antimicrobianos, os efeitos da resistência aos antimicrobianos nas doenças infecciosas e a determinação das possíveis rotas de disseminação de marcadores de resistência bacterianos (ASM, 2000; LEVY, 1998).

2.3.2 Epidemiologia molecular das infecções por ORSA

Ao longo dos anos, o desenvolvimento de técnicas moleculares permitiu melhor análise da epidemiologia das infecções causadas por *S. aureus*, no entanto, a partir da década de 90 é que se começa a elucidar essa participação, utilizando técnicas de tipagem molecular.

Destacam-se duas teorias que sugerem a evolução clonal das amostras ORSA. A primeira foi chamada de teoria clonal simples e sugere que todos os ORSA teriam um ancestral em comum e que o SCC $_{mec}$ teria sido inserido somente uma vez nesse ancestral e se disseminado (KREISWIRTH et al., 1993). A outra, chamada de teoria multiclonal, sugere que o SCC $_{mec}$ foi introduzido várias vezes, em diferentes linhagens de *S. aureus* (ENRIGHT et al., 2002). Dois autores, ao analisar 254 amostras de ORSA, isoladas entre 1961 e 1992, em

nove países distribuídos por quatro continentes, observaram que o gene *mecA* estava inserido em amostras, originalmente, de diferentes linhagens de *S. aureus*, sugerindo que a aquisição desse gene seria um evento de transmissão horizontal entre membros da espécie e que teria ocorrido repetidas vezes em amostras sensíveis à oxacilina (OSSA), originando diversas linhagens ORSA (MUSSER e KAPUR, 1992). Esse estudo foi baseado na avaliação do perfil eletroforético de isoenzimas (*Multilocus Enzyme Electrophoresis*, MLEE) de acordo com Boerlin (1997).

Clones epidêmicos de ORSA são conhecidos por sua facilidade de transmissão, longa persistência, rápida disseminação intra e inter-hospitalar e facilidade de cruzar barreiras geográficas (PAPAKYRIACOU et al., 2000).

A partir desses avanços foram identificados diversos clones epidêmicos. O clone Ibérico foi primeiramente descrito na Espanha, no ano de 1989 (DOMINGUEZ et al., 1994) e, desde então, foi isolado em Portugal (SANCHES et al., 1995), na Itália e Reino Unido (MATO et al., 1998), Alemanha (WITTE et al., 1994), Bélgica, Suíça e França (DEPLANO et al., 2000) e Estados Unidos (ROBERTS et al., 1998). O clone Húngaro foi descrito em hospitais da Hungria (SANCHES et al., 1998) e da Tailândia (CRISOSTOMO et al., 2001). O clone Nova Iorque/Japão foi identificado como sendo predominante em hospitais dos EUA (ROBERTS et al. 1998; ROBERTS et al., 2000), além de ter sido descrito em um hospital em Tóquio, no Japão (AIRES DE SOUSA et al., 2000). O clone Pediátrico foi, inicialmente, descrito em um hospital pediátrico de Portugal em 1992 (SÁ-LEÃO et al., 1999). Posteriormente, sua ocorrência também foi relatada na Polônia (LESKI et al., 1998), EUA (ROBERTS et al., 1998), Argentina (CORSO et al., 1998) e Colômbia (GOMES et al., 2001), entre outros 24 países. O clone epidêmico brasileiro (CEB) foi inicialmente descrito por Teixeira e colaboradores (1995) e encontrado em vários hospitais do Brasil (TEIXEIRA, LOURENÇO e FIGUEIREDO, 1996; SANTOS et al., 1999), Argentina, Uruguai e Chile (AIRES DE SOUSA et al., 2001) e Portugal (DE SOUZA et al., 1998).

Na década de 2000, foi proposta uma uniformização da nomenclatura dos clones mais prevalentes nos EUA por McDougal e colaboradores (2003). De acordo com as diferenças entre o gene *spa* e a sequência tipo (ST), observada pela técnica de MLST (*Multilocus Sequence Typing*), oito clones foram descritos (USA100, USA200, USA300, USA400, USA500, USA600, USA700 e USA800). O clone USA100 (SCC*mec* II) está associado a perfis característicos do clone Nova Iorque/Japão, USA200 (SCC*mec* II) ao clone

EMRSA-16, USA500 (SCC*mec* I) ao clone Ibérico, USA600 (SCC*mec* IV) ao clone Berlim, USA800 (SCC*mec* IV) ao clone Pediátrico. Os perfis genotípicos relacionados aos clones USA300, USA400 e USA700 (carreadores do SCC*mec* IV) foram encontrados em estirpes comunitárias e, sendo assim, não foram associados a outros clones já descritos. Recentemente foram incluídos classificação USA mais três clones de estirpes SCC*mec* IV disseminados nos EUA: USA900, USA1000 e USA1100, associado ao clone Oceania ou *Southwest Pacific Clone* (MONECKE et al., 2011; TENOVER et al., 2008).

No Brasil, a maioria das linhagens circulantes em hospitais está associada ao CEB (DE MIRANDA et al., 2007; SOUSA JÚNIOR et al., 2009), clonalidade que não foi incluída na classificação “USA” por não ser isolada nos EUA. No entanto, nos últimos anos, esse clone tem sido substituído nos hospitais brasileiros, por *S. aureus* carregando o SCC*mec* tipo IV, tradicionalmente associadas à comunidade (SCHUENCK et al., 2009; SILVA-CARVALHO et al., 2009). As estirpes tipo IV isoladas de pacientes brasileiros geralmente apresentam o genótipo USA400, USA800 ou USA1100. Embora o genótipo USA300 seja predominante em infecções nos EUA, é raramente encontrado no Brasil.

É importante ressaltar que o estudo da epidemiologia de infecções por *S. aureus* teve grande avanço com a aplicação da técnica de análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico, após o tratamento com enzimas de restrição e de separação por PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*). É uma técnica bastante utilizada em função de seu alto poder discriminatório entre as linhagens de *S. aureus*, além de permitir a diferenciação entre amostras de origem comunitária e hospitalar (MCDUGAL et al., 2003; NAIMI et al., 2001). Em 1995, a publicação de uma proposta de padronização da interpretação dos resultados, obtidos através do emprego da técnica de PFGE, veio facilitar a utilização da mesma em estudos epidemiológicos, desde que esses estudos envolvam amostras isoladas de uma mesma localidade, em períodos curtos de tempo (TENOVER et al., 1995). A técnica de PFGE passou a ser muito utilizada em grupos de amostras de *S. aureus* responsáveis por surtos hospitalares (CLANCY et al., 2005; LARSEN et al., 2005). No ano de 1999, Van Belkum e colaboradores propuseram um novo critério para análise dos resultados obtidos na técnica de PFGE. Segundo os autores, as amostras podem ser agrupadas em um mesmo clone caso apresentem até quatro bandas de diferença e até 80% de similaridade entre si. Esse novo critério é mais amplo do que aquele proposto por Tenover e colaboradores (1995), pois permite a tipagem de amostras coletadas em intervalos de tempo mais longos.

No ano seguinte, Enright e colaboradores (2000) descreveram a aplicação da técnica de tipagem por sequenciamento de multilocus enzimáticos (MLST) na caracterização de amostras OSSA e ORSA. Através dessa técnica, sete genes (*arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *tpi*, *yqiL* e *pta*) que codificam enzimas de manutenção celular são sequenciados, após amplificação através da técnica de PCR. Cada nova sequência caracteriza-se por um novo alelo e a combinação desses alelos forma o perfil alélico (ST) de cada amostra. A determinação do perfil alélico e, conseqüentemente, da ST, permite incluir as amostras em um dos vários complexos clonais descritos.

É importante ressaltar que tanto a técnica de PFGE quanto a do MLST são consideradas muito trabalhosas e de custo elevado para aplicação rotineira. Nesse contexto, novas metodologias tem sido propostas para aperfeiçoar a tipagem molecular de amostras de *S. aureus*. Em 2007, Cockfield e colaboradores propuseram a utilização de PCR para determinação do complexo clonal em ORSA isoladas em hospitais. Esta técnica consiste na amplificação de genes pertencentes ao sistema de restrição-modificação bacteriano. Tais genes estão envolvidos no reconhecimento e clivagem de DNA exógeno. Segundo Waldron e Lindsay (2006), esses genes são bastante conservados dentro de um mesmo complexo clonal, porém diferem entre complexos diferentes. A PCR proposta por Cockfield e colaboradores (2007) utiliza oligonucleotídeos capazes de detectar diferenças na porção 3' terminal dos genes *sauIhdsS1* e *sauIhdsS2*, que fazem parte dos sistema de restrição-modificação de *S. aureus*. Embora seja mais simples, a técnica é capaz de identificar somente cinco complexos clonais (1, 5, 8, 22 e 30).

2.4 RESISTÊNCIA BACTERIANA AOS ANTIMICROBIANOS E NOVAS ALTERNATIVAS TERAPÊUTICAS

Nos últimos 60 anos, as melhorias no diagnóstico precoce e no tratamento de doenças infecciosas resultaram em uma redução extraordinária na morbidade e mortalidade associada a essas enfermidades. Isto foi devido, em partes, à nossa melhor compreensão dos mecanismos biológicos moleculares destas doenças, e à nossa melhor compreensão de sua fisiopatologia e sua epidemiologia, mas, mais notadamente, ao rápido desenvolvimento de novos tratamentos antimicrobianos seguros e efetivos que foram capazes de atacar especificamente o agente causador da infecção, ajudando, assim, o hospedeiro infectado a

eliminar a infecção a ser tratada (ALANIS, 2005). Entretanto, ao longo das últimas décadas a crescente resistência bacteriana a antimicrobianos tem sido causa de preocupação mundial. Esta situação é agravada pelo uso indiscriminado e inapropriado de agentes antimicrobianos (MOON e KAMBLE, 2012).

As principais classes de antibióticos mais comumente usadas hoje em dia foram descobertas em grande parte por triagem empírica há mais de 50 anos, e exploram uma limitada variedade de aspectos fisiológicos da bactéria: biossíntese da parede celular (β -lactâmicos, glicopeptídeos), membranas celulares (daptomicina, colistina), topoisomerases tipo II (fluoroquinolonas), ribossomos (macrolídeos, aminoglicosídeos, tetraciclina, oxazolidinonas, estreptograminas), transcrição (rifampicina) e biossíntese de folato (sulfonamidas e trimetoprim). Porém, a eficácia de todos os agentes antimicrobianos na atual utilização é comprometida pelo fenômeno da resistência (GWYNN et al, 2010).

Em alguns casos, as bactérias são capazes de desenvolver resistência simultânea a duas ou mais classes de antibióticos, fazendo com que o tratamento de infecções causadas por esses microrganismos seja extremamente difícil, de alto custo e, em muitos casos, associado a altas taxas de morbidade e mortalidade (ALANIS, 2005).

O problema do crescimento explosivo no desenvolvimento da resistência aos antimicrobianos nas duas últimas décadas foi ainda mais agravado devido à diminuição significativa e constante no número de novos antibacterianos nos últimos 10 a 15 anos. (ALANIS, 2005).

Como resultado da diminuição da atenção à pesquisa antimicrobiana pelas companhias farmacêuticas, estamos nos aproximando de uma necessidade crítica de novos agentes para o tratamento de infecções bacterianas cada vez mais resistentes (BUSH e PUCCI, 2011).

Muitos microbiologistas, médicos e organizações de saúde repreendem empresas farmacêuticas por terem abandonado os programas de pesquisa e desenvolvimento de agentes anti-infecciosos. No entanto, esta ação é o resultado da falha massiva da indústria para identificar novas classes de drogas nos últimos 20 anos. O termo “déficit de inovação” tem sido usado para descrever a falta de novas classes estruturais introduzidas no arsenal antibacteriano desde 1962 (BUSH, 2012).

Este fenômeno está diretamente ligado à redução do número de companhias farmacêuticas envolvidas na pesquisa e desenvolvimento de novos antibacterianos desde

meados dos anos de 1980. Este desencorajamento é em grande parte devido aos custos elevados dos estudos pré-clínicos e do risco da falta de retorno sobre o investimento (SONG, 2008).

Outro fator que influencia na diminuição de pesquisas de novos antimicrobianos pelas indústrias farmacêuticas é que a duração do tratamento com antimicrobianos é limitada. Assim, estes medicamentos seriam menos rentáveis do que medicamentos para doenças crônicas, como as neurológicas ou cardiovasculares, ou medicamentos que atingem preços mais elevados, como os oncológicos (MOELLERING, 2011).

Todavia, a oferta de antimicrobianos não ficou vazia durante todo esse tempo, mas tem sido preenchida com versões melhoradas de classes previamente registradas, que demonstram potência mais elevada, espectro de atividade mais amplo, diminuição da resistência bacteriana, propriedades farmacodinâmicas mais favoráveis ou uma maior segurança (SILVER, 2011).

Como tem sido observado, a inovação em geral acontece em ondas. Este tem sido um caso histórico no desenvolvimento de agentes anti-infecciosos. A descoberta de uma nova classe de antimicrobianos com novos mecanismos de ação é geralmente seguida por moléculas modificadas e melhoradas da mesma classe (THEURETZBACHER, 2009). Historicamente, há uma maior probabilidade de sucesso associada a compostos de antigas classes de antimicrobianos que foram aprimorados (SILVER, 2011). A diminuição nos riscos de desenvolvimento estão associadas a antigas classes, pois a experiência clínica se acumula com o uso terapêutico (BUSH, 2012).

Apesar de novos agentes antimicrobianos não estarem mais sendo desenvolvidos tão rapidamente quanto antes, novas abordagens para o tratamento de doenças infecciosas ainda estão surgindo (BUSH e PUCCI, 2011). Uma abordagem para novos agentes tem sido a de continuar a modificar as classes de antibióticos existentes previamente bem sucedidos. Novas fluoroquinolonas, aminoglicosídeos, tetraciclina e β -lactâmicos estão atualmente em desenvolvimento para o tratamento de patógenos multi-resistentes. Além disso, as combinações de inibidores da β -lactamase com novos, e velhos, β -lactâmicos, estão sendo desenvolvidas para combater a atividade hidrolítica das novas β -lactamases (BUSH e PUCCI, 2011). Outra alternativa é encontrar novas abordagens de utilização de drogas antigas, ou sua associação com com novas substâncias. Nesse sentido, a síntese de novas moléculas que apresentem potencial biológico é de extrema importância para o tratamento de infecções. Isto

se deve ao crescente fenômeno de resistência bacteriana que, em muitos casos, gera limitações aos tratamentos usados (ZHAO e JIANG, 2013).

Aminas são compostos com um, dois ou três grupos alquila ou arila ligados ao átomo de nitrogênio. Incluem compostos biológicos da maior importância, respondendo por várias funções em organismos vivos, como regulação biológica, neurotransmissores e defesa contra predadores, como é o caso da adrenalina e norepinefrina. Por seu alto grau de atividade biológica, muitas aminas comuns são utilizadas como drogas ou medicamentos. Destaca-se as aminas secundárias, importantes grupos farmacofóricos em diversos compostos biologicamente ativos que apresentam destaque na área de descoberta de fármacos (SALVATORE, 2001).

Os aminoálcoois são uma classe de compostos orgânicos de considerável interesse na química medicinal. Estas substâncias apresentam poderoso potencial para a síntese de novos compostos bioativos, uma vez que desempenham papel importante em estruturas de fármacos conhecidos, como etambutol, usado no tratamento de tuberculose (DE SOUZA, 2006) e o cloranfenicol, que é utilizado no tratamento de doenças causadas por bactérias gram positivas e negativas (WIEST, COCHRAN e TECKLENBURG 2012). Este composto exibe atividade contra uma grande variedade de microrganismos e apresenta baixo custo. Entretanto, por provocar anemia aplásica, seu uso é feito apenas em casos mais graves como meningite e febre maculosa (WIEST, COCHRAN e TECKLENBURG 2012).

Assim, atendendo aos apelos dos órgãos internacionais de vigilância epidemiológica, dado o crescente fenômeno de resistência a drogas, a possível disseminação de marcadores resistência a drogas antimicrobianas e genes de virulência, percebe-se a importância da geração de conhecimento científico sobre a evolução, colonização, ecologia, patologia, fisiologia e epidemiologia de linhagens de *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina além de se buscar alternativas à sua terapêutica. Os dados obtidos neste projeto podem servir de base para ações educativas voltadas para educação sanitária dos usuários e profissionais do serviço de saúde, além de servir como referência para estratégias que visem minimizar os riscos de ocorrência de infecção relacionada à assistência a saúde por estes microrganismos e estimular a reflexão sobre a crescente resistência a drogas e o uso racional de antimicrobianos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar características epidemiológicas, fisiológicas e moleculares relacionadas à resistência a drogas e virulência bem como a susceptibilidade a novas moléculas sintéticas de linhagens de *Staphylococcus aureus* resistentes a oxacilina, isoladas em um hospital terciário (HU/UFJF) na cidade de Juiz de Fora, no período de 2005 a 2010.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Confirmar a identidade e avaliar a ocorrência do gene *mecA* pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) em linhagens de *S. aureus* da coleção de culturas do HU/UFJF, identificadas presuntivamente e resistentes à oxacilina;
- Descrever dados clínico-epidemiológicos associados as infecções causadas por *Staphylococcus aureus* resistentes a oxacilina;
- Determinar a concentração inibitória mínima a drogas antimicrobianas de interesse clínico-microbiológico das linhagens bacterianas;
- Determinar a concentração inibitória mínima a aminas aromáticas alquiladas em amostras representativas da população de ORSA circulantes no período;
- Avaliar, por métodos fisiológicos, características associadas à agressão bacteriana, como habilidade de formação de biofilmes e atividade hemolítica e associar o fenótipo de resistência com a expressão do fenótipo de virulência;
- Pesquisar a ocorrência dos diferentes tipos de *SCCmec*;

- Avaliar a diversidade genotípica das amostras através da técnica de eletroforese em campo pulsado (PFGE) e determinar o complexo clonal pelo método RM em amostras isoladas na Unidade de Tratamento Intensivo;
- Associar a resistência antimicrobiana e os tipos de *SCC_{mec}*;
- Associar os perfis genotípicos detectados e a resistência aos antimicrobianos para as linhagens ORSA isoladas na unidade de terapia intensiva.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ORIGEM DAS AMOSTRAS

O Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora (HU/UFJF) é centro de referência ao atendimento de pacientes da rede SUS, numa área de abrangência que engloba mais de 90 municípios da Zona da Mata Mineira e do estado do Rio, além de desenvolver atividades em níveis primário, secundário e terciário, conjugando ensino, pesquisa e extensão. A equipe multiprofissional reúne mais de 800 pessoas, entre docentes (232), pessoal técnico-administrativo (468), residentes (103). Além disso, disponibiliza uma capacidade instalada e ocupacional de 140 leitos, 16 leitos de Hospital Dia, salas de Ambulatório nas diversas especialidades, boxes para acolhimento integrado, consultório de Odontologia hospitalar, 08 centros cirúrgicos (sendo 04 de grandes cirurgias e 04 de pequenas e médias), perfazendo uma média de 7.500 consultas/mês e 294 internações/mês (indicadores: março de 2007).

4.2 DESENHO DO ESTUDO

Foi realizado um estudo epidemiológico retrospectivo descritivo e transversal a partir de amostras de *S. aureus* resistentes a oxacilina, oriundas de pacientes internados em diferentes setores do HU/UFJF entre os anos de 2005 a 2010 e pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Análises Clínicas Prof. Maurílio Baldi do referido hospital. As amostras foram coletadas no período de outubro a dezembro de 2010. Foi utilizada somente uma amostra por paciente.

4.3 CONSIDERAÇÕES CLÍNICAS E ÉTICAS

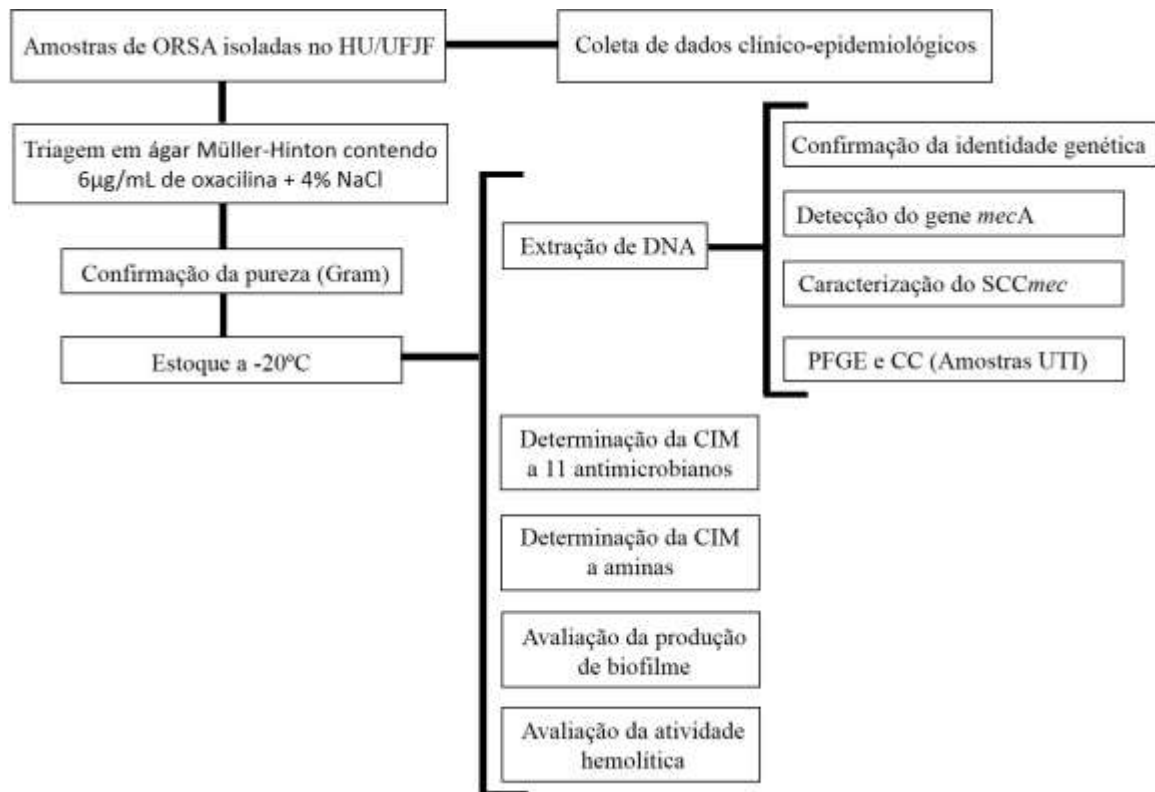
O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora (CEP-HU CAS/UFJF) sob o número 267/2011 (ANEXO A).

Com relação aos aspectos clínicos, foram utilizados dados referentes aos locais de internação e sítios de isolamento, além de dados coletados em prontuários e o livro de registros do Setor de Microbiologia do Laboratório Prof. Maurílio Baldi, do Hospital

Universitário. O estudo envolveu apenas a utilização de mostras ORSA analisadas na rotina bacteriológica do hospital, não havendo nenhum contato com o paciente.

4.4 AMOSTRAS BACTERIANAS

Foram recuperadas 103 amostras de *S. aureus* resistentes a oxacilina isoladas e identificadas a partir de infecções ocorridas em pacientes internados no HU/UFJF, no período de 2005 a 2010, de acordo com metodologia clássica de identificação (BANNERMAN e PEACOCK, 2007) e teste de disco-difusão para cefoxitina (CLSI, 2012), realizada pelo Laboratório Prof. Maurílio Baldi, do HU/UFJF. As amostras foram inoculadas em placas de Petri contendo ágar Müller-Hinton contendo 6µg/mL de oxacilina + 4% NaCl para reisolamento das linhagens resistentes ao antimicrobiano (teste de triagem com ágar oxacilina-NaCl). As placas foram processadas no Laboratório de Fisiologia e Genética Molecular Bacteriana do Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia do ICB/UFJF. Após a confirmação da pureza das culturas (Gram), as amostras foram armazenadas em caldo TSB (*Trypticase Soy Broth*, Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) com 20% (v/v) de glicerol, a -20° C (SAMBROCK, FRITSCH e MANIATIS, 1989). O fluxograma 1 apresenta a metodologia proposta para o estudo.



Fluxograma 1. Metodologia proposta para o estudo.

4.5 ESTUDOS MOLECULARES

4.5.1 Extração do DNA genômico

O DNA genômico das amostras de *S. aureus* oxacilina-resistentes foi extraído pelo método de digestão química em fenol-clorofórmio, de acordo com metodologia já estabelecida para obtenção de DNA de alto grau de pureza, com modificações (GIRAFFA, ROSSETTI e NEVIANI, 2000).

A partir de um crescimento bacteriano de 24h em 3,0mL de caldo TSB, uma alíquota de 2,0mL da cultura foi centrifugada (10 min, 32.900 x g) e a massa celular bacteriana solubilizada em 500µL de tampão de lise bacteriana (sacarose, 25%; tris-HCl pH 8,0, 50mM; EDTA, 10mM; lisozima, 2,5mg/mL). O sistema foi incubado a 37°C durante 60 minutos. Em seguida, foram adicionados 50µL de solução de SDS 20% e as amostras homogeneizadas em agitador do tipo vórtex e incubadas à temperatura ambiente durante 30 minutos. Foram adicionados 500µL de fenol saturado com Tris pH 8,0, e 500µL de solução de clorofórmio/álcool isoamílico 29:1, seguido de agitação em vórtex. Em seguida, os tubos

foram centrifugados a 32.900 x g, durante 5 minutos. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo, onde foram adicionados 50µL de acetato de potássio 5M e 1,2mL de álcool etílico absoluto gelado, seguido de delicada homogeneização manualmente. O DNA foi precipitado a -20°C *overnight*, seguido de centrifugação em centrífuga refrigerada a 4°C (30 min, 32.900 x g). O DNA obtido foi solubilizado em 200µL de tampão TE (Tris 10mM, EDTA 1mM, pH 8,0) e estocado em freezer a -20°C.

4.5.2 Confirmação da identidade bacteriana por biologia molecular

A identificação específica de *S. aureus* foi realizada por biologia molecular em reação de PCR, usando-se os iniciadores sau1 (5'AATCTTTGTCGGTACACGATATTCTTCAACG3') e sau2 (5'CGTAATGAGATTTTCAGTAGATAATACAACA3'), segundo metodologia descrita por Strommenger e colaboradores (2003). As reações foram feitas em um volume final de reação de 25µL, contendo 2,5 µM dos iniciadores, 2,0 µL do DNA molde e 12,5µL de PCR Master Mix®, contendo Taq DNA polimerase, dNTPs, MgCl₂ e tampões em uma concentração ótima para eficiente amplificação do DNA. As condições de amplificação da PCR foram as seguintes: desnaturação inicial a 94°C, por 3min, seguida de 30 ciclos de 94°C, por 30s, 55°C, por 30s, 72°C, por 30s, seguida de extensão final de 72°C, por 4min.

As reações de PCR foram realizadas em duplicata, em termociclador automatizado. Os amplicons obtidos em cada reação foram visualizados em gel de agarose 1,5% em TBE 1X, após eletroforese em voltagem constante de 120V, por aproximadamente 1h e 30 min. Os géis foram analisados em transluminador de luz ultravioleta, após tratamento com brometo de etídio. Como padrão de peso molecular, foi utilizado o marcador de 100bp DNA ladder (Life Technologies Inc., Gathersburg, MD, EUA).

4.5.3 Detecção do gene *mecA*

Para a pesquisa do gene *mecA* das amostras bacterianas foi utilizada a técnica da reação em cadeia da polimerase, de acordo com metodologias já estabelecidas (ZHANG et al., 2004). Foram utilizados os seguintes iniciadores de sequência específica MecA1 (5'GTAGAAATGACTGAACGTCCGATAA3') e MecA2 (5'CCAATTCCACATTGTTTCG

GTCTAA3'), em um volume final de reação de 25µL, contendo 0,24µM dos iniciadores MecA1 e MecA2, 2µL do DNA molde e 12,5µL de PCR Master Mix® (Promega Corporation, Madison, WI, USA), contendo Taq DNA polimerase, dNTPs, MgCl₂ e tampões em uma concentração ótima para eficiente amplificação do DNA. As condições de amplificação da PCR foram as seguintes: desnaturação inicial a 94°C, por 10min, seguida de 10 ciclos de 94°C, por 45s, 55°C, por 45s, 72°C, por 75s, seguida de 25 ciclos de 94°C, por 45s, 50°C, por 45s, 72°C, por 75s, e extensão final de 72°C, por 1min.

As reações de PCR foram realizadas em duplicata, em termociclador automatizado (Techne® TC-412 Thermal Cycler, Southam Warwickshire, UK). Como controle positivo para o gene *mecA*, foi utilizada a amostra padrão *Staphylococcus aureus* ATCC 33591 e, como controle negativo para o gene *mecA*, a amostra padrão *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

Os amplicons obtidos em cada reação foram visualizados em gel de agarose 1,5% em TBE 1X, após eletroforese em voltagem constante de 120V, por aproximadamente 1h e 30 min. Os géis foram analisados em transluminador de luz ultravioleta (GE Healthcare, United Kingdom), após tratamento com brometo de etídio (Promega Corporation). Após documentação, os perfis de amplificação gênica foram comparados entre as amostras, de acordo com o fenótipo de susceptibilidade ou resistência à oxacilina, determinado pelo método da concentração inibitória mínima. Como padrão de peso molecular, foi utilizado o marcador de 100bp DNA ladder (Life Technologies Inc. Gathersburg, MD, EUA).

4.5.4 PCR multiplex para caracterização do SCC*mec*

A determinação do tipo de SCC*mec* segundo o protocolo de Milheiriço, Oliveira e De Lencastre (2007) foi realizada em todas as amostras. Esta reação consiste na amplificação de fragmentos de regiões específicas de cada tipo de SCC*mec*.

Na Tabela 1 estão descritas as sequências dos oligonucleotídeos e suas características, utilizados na reação.

A amplificação dos fragmentos foi realizada em um termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradient), utilizando 3µL de DNA (30 a 60 ng de DNA), 5µL de tampão da enzima (10 mM Tris HCl, 25 mM KCl), 1,5 mM de MgCl₂, 40µM de cada dNTP [deoxinucleotídeo trifosfatado (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)] (Life Technologies), 1,5U de

TaqDNA polimerase (Biotools), dez pares de oligonucleotídeos (tabela 1) e água livre de nucleases suficiente para completar 50µL. As condições de amplificação da reação foram desnaturação inicial a 92°C/4min, seguida de 30 ciclos de 92°C/30s, 53°C/30s e 72°C/1min, finalizada com um período de extensão final a 72°C/4min.

Tabela 1: Oligonucleotídeos utilizados e amplicons obtidos na PCR multiplex para tipagem do *SCCmec*, de acordo com Milheiro, Oliveira e De Lencastre (2007).

Oligonucleotídeos	Sequência (5' - 3')	Especificidade (tipo de <i>SCCmec</i>)	Amplicon (pb)
CIF2 F2	TTCGAGTTGCTGATGAAGAAGG	I	495
CIF2 R2	ATTTACCACAAGGACTACCAGC		
ccrC F2	GTACTCGTTACAATGTTTGG	V	449
ccrC R2	ATAATGGCTTCATGCTTACC		
RIF5 F10	TTCTTAAGTACACGCTGAATCG	III	414
RIF5 R13	GTCACAGTAATTCCATCAATGC		
SCCmec V J1F	TTCTCCATTCTTGTTTCATCC	V	377
SCCmec V J1R	AGAGACTACTGACTTAAGTGG		
dcs F2	CATCCTATGATAGCTTGGTC	I, II, IV e VI	342
dcs R1	CTAAATCATAGCCATGACCG		
ccrB2 F2	AGTTTCTCAGAATTCGAACG	II e IV	311
ccrB2 R2	CCGATATAGAAWGGGTTAGC		
kdp F1	AATCATCTGCCATTGGTGATG	II	284
kdp R1	CGAATGAAGTGAAAGAAAGTGG		

SCCmec III J1 F	CATTTGTGAAACACAGTACG	III	243
SCCmec III J1 R	GTTATTGAGACTCCTAAAGC		
mecI P2	ATCAAGACTTGCATTCAGGC	II e III	209
mecI P3	GCGGTTTCAATTCACCTTGTC		
MRS1	TAGAAATGACTGAACGTCCG	Gene <i>mecA</i>	
MRS2	TTGCGATCAATGTTACCTAG	(controle interno)	154

O produto da reação foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 2%, em TBE (0,89 M Tris, 0,89M ácido bórico, 2,5 mM EDTA, pH 8,2) 1X. Após corrida de 90min a 80v, o gel foi submerso em solução de brometo de etídio (0,5µg/ml) por 40min. A imagem foi capturada sob luz ultravioleta em um fotodocumentador (Vilber Lourmat). Como padrão de tamanho de DNA, utilizamos o marcador 100 pb DNA ladder (Life Technologies). Como controles, utilizamos as linhagens 119 (SCCmec I), (TEIXEIRA et al., 2012); MU50 (SCCmec II), (HIRAMATSU et al., 1997); 63a (SCCmec III), (VIVONI et al., 2006); 526a (SCHUENCK et al., 2009) (SCCmec IV) e 468s (SCCmec V) (PEREIRA et al., 2011).

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

A análise do perfil de fragmentação do DNA cromossômico das amostras foi realizada após separação, por PFGE, dos fragmentos gerados após tratamento com a enzima de restrição *SmaI*, conforme estabelecido por Vivoni e colaboradores (2006). As amostras, inicialmente, foram cultivadas em ágar sangue a 35°C, por 24h. Posteriormente, cinco colônias isoladas foram inoculadas em 5mL de caldo TSB (Oxoid) e incubadas durante 4h, a 35°C, até atingir turvação correspondente a escala 2 de McFarland (~6,0 x 10⁸UFC/ml). A seguir, 1mL desta suspensão foi transferido para um tubo Eppendorf®, o conteúdo centrifugado (7000 X g / 5min) e o sedimento suspenso em 250µl de tampão PIV (NaCl 1M, Tris-HCl 10mM, pH 7,6). A esta suspensão foi adicionado o mesmo volume de agarose de

baixo ponto de fusão (“Low Melting Point Agarose”, IBI Technical, New Heaven, EUA) a 2%, dissolvida em tampão PIV e mantida a 58°C. Após homogeneização, a agarose foi distribuída em moldes que foram mantidos a 4°C por cerca de 10 min, para serem cortados em pequenos blocos. Posteriormente, os blocos de agarose foram colocados em 2mL de solução de lise ES (Tris-HCl 6mM, NaCl 1M, EDTA 100mM, 0,5% de BRIJ e 0,5% lauril sarcosinato de sódio; pH final 7,5) contendo lisozima (0,5mg/mL) (Sigma-Aldrich Chemical Company) e lisostafina (0,05mg/mL) (Sigma-Aldrich Chemical Company) e incubados a 35°C, sob agitação lenta, durante 18h. Após este período, os tubos foram resfriados a 4°C e a solução foi substituída por 2mL de solução ES (EDTA 0,4M pH 9,5, 1% [p/v] de lauril sarcosinato de sódio) contendo proteinase K (0,1mg/ml) (Sigma- Aldrich Company), sendo essa solução incubada a 50°C, em banho-maria, durante 18h. Ao final desta fase, os blocos de agarose foram resfriados a 4°C e a solução substituída por 2 mL de nova solução ES (EDTA 0,4M pH 9,5, 1% [p/v] de lauril sarcosinato de sódio). A digestão do DNA cromossômico foi realizada a partir de um bloco de agarose, lavado quatro vezes em tampão TE a 37°C, em banho de imersão, sendo as três primeiras lavagens de 1h cada e a última de 18h. Após este processo, o bloco de agarose foi transferido para uma solução contendo 250µl do tampão específico da enzima de restrição *SmaI* (New England Biolabs, Ipswich, Inglaterra) e incubado a 25°C, por 4h. Em seguida, a solução tampão foi removida e adicionado, novamente, 250µl do tampão da enzima, desta vez contendo 20U da enzima *SmaI*. O bloco de agarose foi incubado a 25°C, durante 18h. Posteriormente, a solução contendo a enzima foi removida, o bloco de agarose fundido a 70°C e aplicado no gel de agarose (Invitrogen) a 1% feito em tampão TBE 0,5x. O gel foi submetido à eletroforese em campo pulsado (CHEF DR III, Bio-Rad, Hercules, EUA), utilizando um tempo de pulso crescente de 1 a 35s, durante 21h, a 6 v/cm, 13°C, com ângulo de 120°. Após a corrida, o gel foi corado com brometo de etídio (0,5µg/mL), por 40min e descorado por 1h em água destilada. A imagem foi capturada sob luz ultravioleta em um fotodocumetador (Vilber Loumat). Como padrão de DNA, foi utilizado o marcador 50-1.000Kb Lambda Ladder PFGE Marker (New England BioLabs).

Os fragmentos obtidos por cada amostra foram analisados através do programa Bionumerics, versão 6.0 (Applied Maths, Bélgica), usando o coeficiente Dice de similaridade e o método de “Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages” (UPGMA) para análise dos agrupamentos. Foi utilizado o método de Van Belkum e colaboradores (2009),

que considera até quatro bandas de diferença e mínimo de 80% de similaridade entre as amostras para inclusão em um mesmo genótipo.

Como controles, utilizamos as linhagens Mu50 (USA100), (HIRAMATSU et al., 1997); 526a (CEB), (SCHUENCK et al., 2009); 608a (USA 400), (SCHUENCK et al., 2009); 664a (USA 800).

4.5.6 Caracterização do complexo clonal através de PCR (RM)

A determinação do complexo clonal (CC) foi feita através de PCR (RM), segundo a metodologia proposta por Cockfield e colaboradores (2007). Foram selecionadas, para esse teste, amostras representativas de cada genótipo. A RM consiste na realização de três PCR para amplificação de fragmentos específicos dos genes *sauIhds1* (CC 22, 30 e 45), *sauIhds2* (CC 5 e 8) ou de ambos (CC 1). Esses genes fazem parte ou codificam enzimas do sistema de restrição-modificação bacteriano, os quais diferem entre as linhagens de ORSA, mas são bastante conservados dentro de uma mesma linhagem. Desse modo, os complexos clonais podem ser caracterizados por diferenças nas seqüências desses genes. Os oligonucleotídeos utilizados e as seqüências amplificadas na RM estão disponibilizados na Tabela 2.

Tabela 2: Oligonucleotídeos utilizados, especificidade e amplicons obtidos nas 3 reações de PCR para determinação do complexo clonal, de acordo com Cockfield e colaboradores (2007).

Oligonucleotídeo	Seqüência (5'-3')	Especificidade (Tipo de CC)	Amplicon (pb)
PCR 1			
AF	AGGGTTTGAAGGCGAATGGG	-	
AR30	CAACAGAATAATTTTTTAGTTC	CC30	203
AR22	TCAGAGCTCAACAATGATGC	CC22	990
PCR 2			
AF	AGGGTTTGAAGGCGAATGGG	-	
AR45	GGAGCATTATCTGGTGTTTTCC	CC45	722

AR1	GGGTTGCTCCTTGCATCATA	CC1	1037
PCR 3			
BF	CCCAAAGGTGGAAGTGAAAA	-	
BR8	CCAGTTGCACCATAGTAAGGGTA	CC1 e CC8	680
BR5	TCGTCCGACTTTTGAAGATTG	CC5	1071

Cada reação foi composta por um volume final de 50µL, contendo tampão de enzima (10mM Tris HCl, 25mM KCl), 3,2mg de MgCl₂, 200µM de cada dNTP, 0,5 mM dos oligonucleotídeos, 1,5U de *Taq* DNA polimerase e 1µL de DNA bacteriano e água livre de nucleases. Todas as três reações foram iniciadas com desnaturação de 94°C por 5min e 30 ciclos de 94°C/30s, 55°C/30s e 72°C/2min, mais extensão final a 72°C por 5 min.

Os produtos obtidos em cada reação foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, em TBE (0,89 M Tris, 0,89M ácido bórico, 2,5 mM EDTA, pH 8,2). Após corrida de 90min a 80v, o gel foi submerso em solução de brometo de etídio (0,5µg/ml) e a imagem obtida através de fotodocumentador (Vilber Lourmat). Como padrão de DNA em géis contendo produtos das três reações, utilizamos o marcador 1kb DNA ladder (Invitrogen). Para géis contendo produtos da primeira reação, foi utilizado, também, o marcador 100 pb DNA ladder (Life Technologies). Na primeira reação, as amostras controle foram 1007a (CC22) e 840a (CC30), (CABOCLO, 2013); na segunda reação, 608a (CC1), (SCHUENCK et al., 2009) e 843a (CC45), (CABOCLO, 2013); e na terceira, as amostras controle foram 608a (CC1), 664a (CC5) e 526a (CC8), (SCHUENCK et al., 2009).

4.6 ESTUDOS FISIOLÓGICOS

4.6.1 Determinação da concentração inibitória mínima de antimicrobianos

A determinação do perfil de susceptibilidade a drogas antimicrobianas foi realizada pelo método diluição em ágar, segundo recomendações do CLSI (2012). Foram utilizadas as seguintes drogas antimicrobianas, selecionadas de acordo com a sua relevância clínico-microbiológica: vancomicina, eritromicina, azitromicina, clindamicina, gentamicina,

cloranfenicol, tetraciclina, linezolida, rifampicina, levofloxacina e trimetoprim/sulfametoxazol (Sigma-Aldrich Chemical Company).

Soluções estoque das drogas foram obtidas a partir da pesagem do sal em balança analítica e posterior diluição em diluente apropriado, conforme instrução do fabricante. As drogas foram esterilizadas em filtro com membrana milipore (0,22 μ m) e conservadas em freezer a -20°C . Concentrações crescentes (de 0,0625 $\mu\text{g/mL}$ a 1.024,0 $\mu\text{g/mL}$) das drogas, a partir de soluções estoque, foram adicionadas a frascos contendo 20,0mL do meio de cultura fundido (45°C), ágar Müeller-Hinton, acrescido de 2% de NaCl, para oxacilina, e vertido em placas de petri estéreis.

As linhagens bacterianas foram semeadas em ágar TSA por 24h a 37°C e, em seguida, uma suspensão bacteriana de cada amostra, em solução salina estéril (NaCl 0,9%), foi obtida e ajustada a uma turbidez equivalente a 0,5 da escala McFarland ($\sim 10^8$ UFC/mL). Com uso do Replicador de Steers (STEERS et al., 1959), inóculos padronizados (10^5 células/ponto) das amostras foram adicionados a placas contendo as drogas (em duplicata), sequencialmente, em ordem crescente de concentração, as quais foram incubadas a $35,5^{\circ}\text{C}$, na atmosfera ideal de crescimento das linhagens bacterianas teste. Placas controle, sem adição da droga, também foram inoculadas. A leitura dos resultados foi realizada após 18 horas de incubação, exceto para oxacilina e vancomicina, cujo período de incubação é de 24 horas, determinando-se a concentração inibitória mínima (CIM) da droga para cada isolado, comparando à tabela de referência (ANEXO B). O controle de qualidade foi realizado inoculando-se, também, amostra de referência *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, cujos perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos são conhecidos.

4.6.2 Determinação da concentração inibitória mínima de amins aromáticas alquiladas

A determinação da Concentração inibitória mínima (CIM), utilizando a técnica de macrodiluição em caldo segundo Alviano (2008) foi realizada para 21 amostras representativas de ORSA escolhidas ao acaso e de forma aleatória frente a 5 amins aromáticas alquiladas, 24c, 24d, 24e, 24f e 24g, previamente sintetizadas (ALMEIDA, et al., 2013). Os inóculos para cada teste foram previamente cultivados em *Tryptic Soy Agar* (TSA), incubadas por 24h a 37°C sob condições aeróbicas. Utilizou-se salinas estéreis 0,85% NaCl ajustadas através da turbidez da escala 0,5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). As soluções dos

compostos em estudo foram preparadas solubilizando-se 10,0 mg de composto em 1,0 mL de etanol. Fez-se diluições com caldo Müeller-Hinton para obter as concentrações de 0,0625 a 1024,0 µg/mL, em um volume final de 3,0 mL. Em cada tubo foi inoculado 100 µL da cultura bacteriana e o experimento foi incubado a 37°C por 24h.

A CIM foi definido como a menor concentração do composto testado que resulta em total inibição do crescimento bacteriano. O controle do experimento foi realizado usando-se somente solução salina estéril inoculada em meio Müeller-Hinton e o cloranfenicol foi usado como agente antimicrobiano para controle positivo de inibição do crescimento.

4.6.3 Avaliação da habilidade de formação de biofilmes

A verificação da habilidade na formação de biofilme pelas amostras de *S. aureus* foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Andrade (2010).

A partir de um pré-inóculo de cultura de 24 horas em caldo TSB de todas as linhagens bacterianas, 400 µL de cultura foram utilizados para uma diluição em 4 mL de meio que, depois de homogeneizado, foi aplicado em poços de placas de poliestireno de 96 poços de fundo chato (200 µL).

As placas foram tampadas e incubadas em estufa bacteriológica por 24 horas, a 37°C. Após o período de crescimento, foi retirado o caldo de cultivo com o auxílio de uma pipeta esterilizada e os poços foram lavados com solução salina (NaCl 0,85%) esterilizada. Foram adicionados 300 µL de metanol e as placas foram incubadas em temperatura ambiente por 15 minutos. Logo após, o metanol foi removido e as placas deixadas destampadas em temperatura ambiente por 5 minutos, para evaporação de metanol residual. Em seguida, foram acrescentados 250 µL de cristal violeta (0,1%) e as placas foram novamente incubadas em temperatura ambiente por 15 minutos. Após esse período, as placas foram lavadas com água destilada para retirar o excesso do corante não incorporado nas células bacterianas.

O corante incorporado foi extraído pela adição de 300 µL de uma solução de etanol/acetona (8:2). O sistema foi deixado em repouso por 15 minutos tampado. Após este período, foi realizada a leitura do corante solubilizado em leitor de Elisa a 590nm. Estes experimentos foram realizados em duplicata, em quatro réplicas, para obtenção de valores médios, que foram plotados como corante solubilizado a partir das células bacterianas

aderidas aos poços das placas utilizadas. A amostra *S. epidermidis* ATCC 12228 (não produtora de biofilme) foi utilizada como controle do teste.

A classificação da produção de biofilme foi fundamentada no valor da densidade ótica (DO), obtida a partir do biofilme bacteriano formado. Para cada amostra analisada foi determinado um valor (N), que correspondeu a média aritmética dos valores encontrados nos quatro poços. O valor da densidade ótica considerado para determinar se as amostras produziam ou não biofilme foi obtido a partir da comparação com a média aritmética dos quatro poços da amostra controle-negativo.

4.6.4 Avaliação da atividade hemolítica

A atividade hemolítica dos microrganismos foi avaliada segundo metodologia proposta por Smith-Palmer, Stewart e Fyfe (2004). Tubos de centrífuga esterilizados do tipo falcon contendo meio líquido BHI foram inoculados, na proporção de 1:1 (v/v) com suspensões bacterianas (DO_{620nm} 0,1) obtidas de culturas na fase exponencial, obtendo 5mL de nova cultura. Após 24hs de incubação a 35,5°C, as massas celulares das culturas foram precipitadas por centrifugação (800 x g) por 15 minutos e o sobrenadante, esterilizado por filtração utilizando-se filtros com membrana de 0,2 µm.

Duas suspensões foram obtidas utilizando-se 2 mL do sobrenadante adicionado de 1 mL de suspensão de hemácias de carneiro a 1% em tampão fosfato (PBS), pH 7,2. As suspensões foram incubadas a 35,5°C por 45 minutos e posteriormente centrifugadas a 800 x g por 10 minutos. Os sobrenadantes foram utilizados para leitura de densidade ótica em microplacas de poliestireno de 96 poços a 540nm.

Os testes foram realizados em duplicata com leitura em trélicas para determinação da hemólise em relação a controles. Como controle negativo (ausência de hemólise) e controle positivo da reação (hemólise total) o sobrenadante das culturas foi substituído por mesmo volume de PBS e água destilada, respectivamente.

A classificação da atividade hemolítica foi fundamentada no valor da densidade ótica (DO), obtida a partir hemólise formada. Para cada amostra analisada foi determinado um valor (N), que correspondeu a média aritmética dos valores encontrados nos dois poços. O valor da densidade ótica considerado para determinar se as amostras produziam ou não

hemólise foi obtido a partir da comparação com a média aritmética dos dois poços da amostra controle-negativo.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizado, Teste t de Student, para comparação entre médias da capacidade de formação de biofilme e da atividade hemolítica, considerando-se valores de $p \leq 0,05$ para as análises. Para o cálculo da correlação entre a resistência bacteriana e os determinantes de virulência foi realizado o cálculo de *odds ratio*, com intervalo de confiança de 95%.

5 RESULTADOS

Durante o período de janeiro de 2005 a dezembro 2010 o Laboratório de Análises Clínicas Prof. Maurílio Baldi, do HU/UFJF isolou e identificou, a partir de espécimes clínicos recebidos, 1203 linhagens pertencentes ao gênero *Staphylococcus* sp. Destes, 590 (49%) foram identificados como *Staphylococcus aureus*, enquanto que 613 (51%) foram reportados como pertencentes ao grupo do *Staphylococcus coagulase* negativo. Entre as linhagens de *S.aureus*, 251 (42,5%) demonstraram-se resistentes aos discos de cefoxitina e oxacilina sendo identificadas como MRSA, relacionadas a 156 pacientes. O Gráfico 1 mostra a distribuição de isolamento, em valores absolutos, do gênero *Staphylococcus* no Laboratório Prof. Maurílio Baldi do HU/UFJF entre os anos de 2005 a 2010.

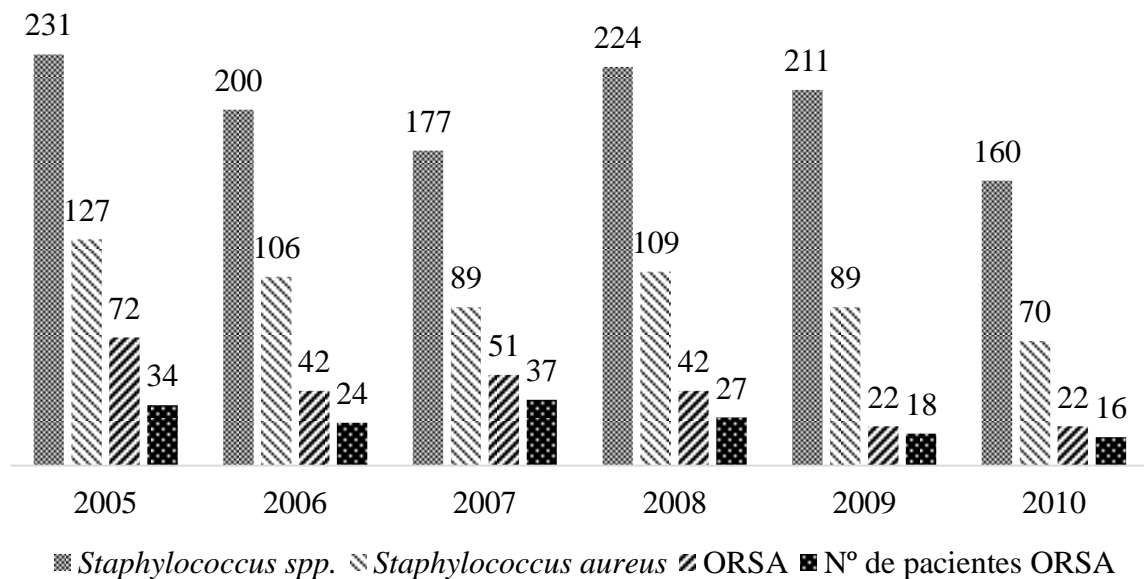


Gráfico 1: Distribuição de isolamento, em valores absolutos, do gênero *Staphylococcus* no Laboratório Prof. Maurílio Baldi do HU/UFJF entre os anos de 2005 a 2010.

Em nosso estudo foram avaliadas 103 amostras não replicadas de ORSA recuperadas da coleção de culturas do laboratório do HU/UFJF oriundas de pacientes internados em diferentes setores do hospital entre os anos de 2005 a 2010.

5.1 ASPECTOS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICOS

De maneira geral, 71% das linhagens ORSA foram recuperadas a partir de pacientes do sexo masculino, enquanto 29% dos do sexo feminino (Gráfico 2). A média de idade foi de 54,4 anos de idade (variando de 16 dias a 98 anos).

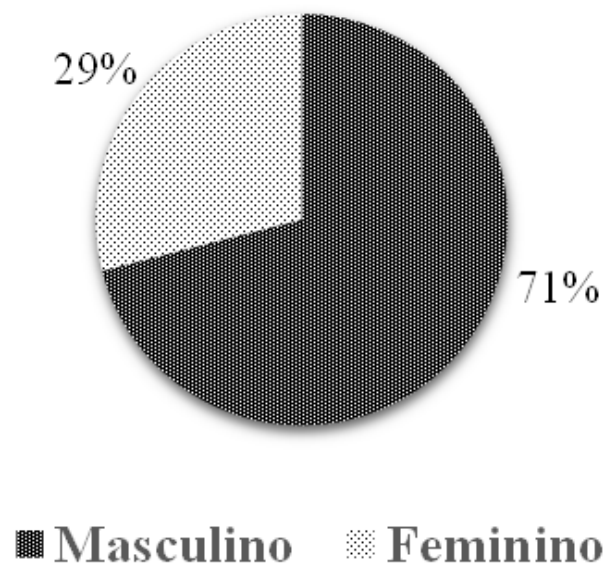


Gráfico 2: Distribuição por sexo, das 103 amostras ORSA isoladas de pacientes no HU/UFJF, entre 2005 a 2010.

Embora associada principalmente a pacientes internados em unidade de terapia intensiva (43,7%), ORSA também foram isoladas pacientes internados em enfermaria de clínica médica (28,1%), unidade de clínica cirúrgica (23,3%), pediatria (3,9%) e de unidade de transplante de medula óssea (1%) (Gráfico 3).

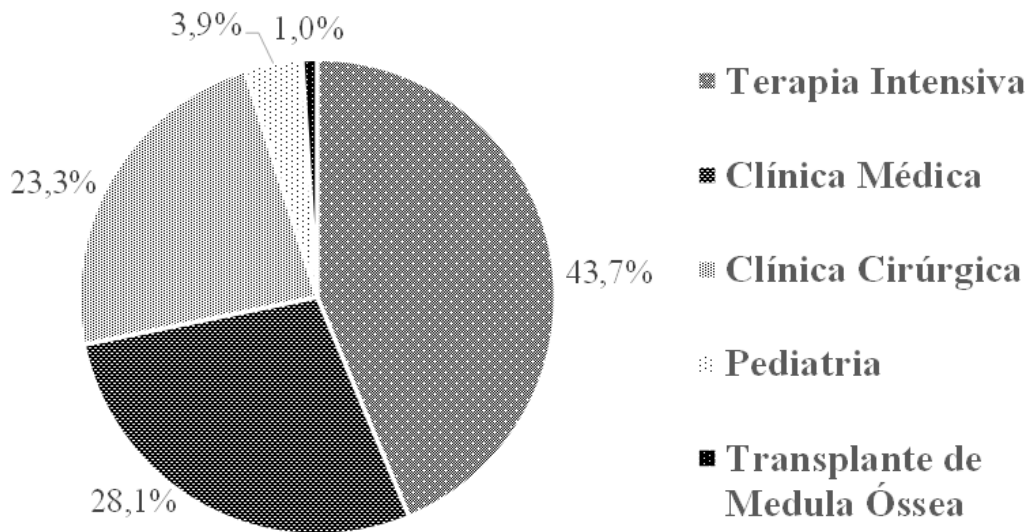


Gráfico 3: Distribuição por setor, das 103 amostras ORSA isoladas de pacientes no HU/UFJF, entre 2005 a 2010.

Considerando as infecções associadas, 34% e 20,4% das linhagens foram isoladas a partir de infecções relacionadas ao sistema respiratório e bacteremia, respectivamente. Linhagens ORSA também foram isoladas a partir de sítio cirúrgico (14,5%), bacteremia relacionada a cateter (13,6%), infecções de feridas (5,8%), do trato urinário (4,9%), do trato gastrointestinal (3,9%) e de infecções do sistema osteomuscular (2,9%) (Gráfico 4).

Considerando-se os espécimes clínicos enviados ao laboratório, a maioria das linhagens foi isolada a partir de secreções da traqueia e do sangue (26,2% e 23,3%, respectivamente) seguido por swabs de sítio cirúrgico e ponta do cateter (15,5%), exsudados (14,6%) e urina 4,9%) (Gráfico 5).

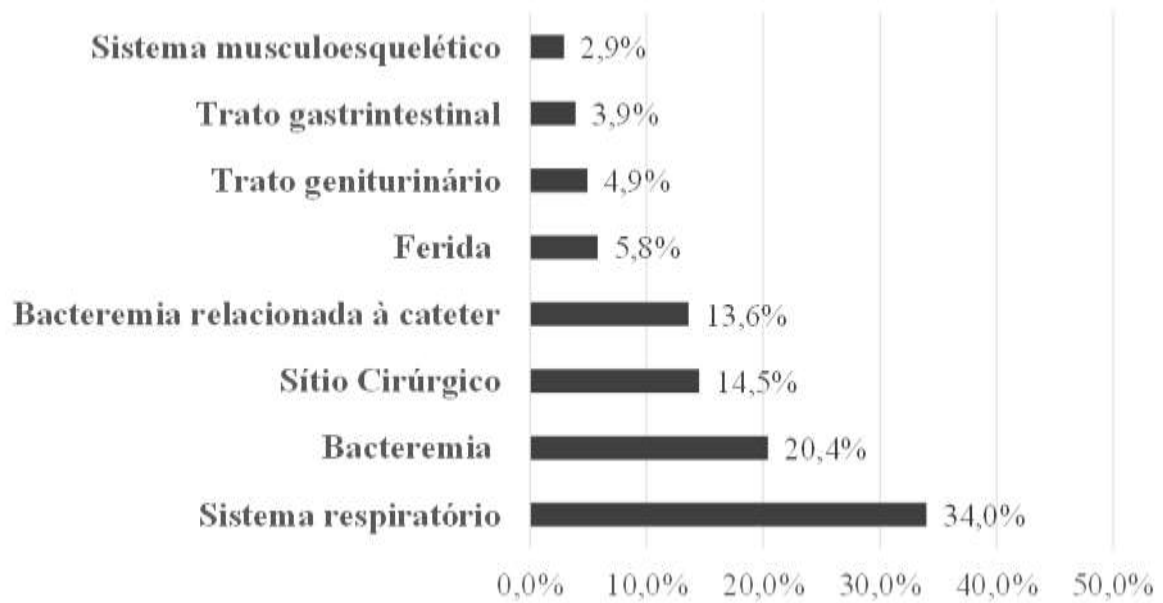


Gráfico 4: Distribuição por tipo de infecção relacionada às 103 amostras ORSA isoladas de pacientes no HU/UFJF, entre 2005 a 2010.

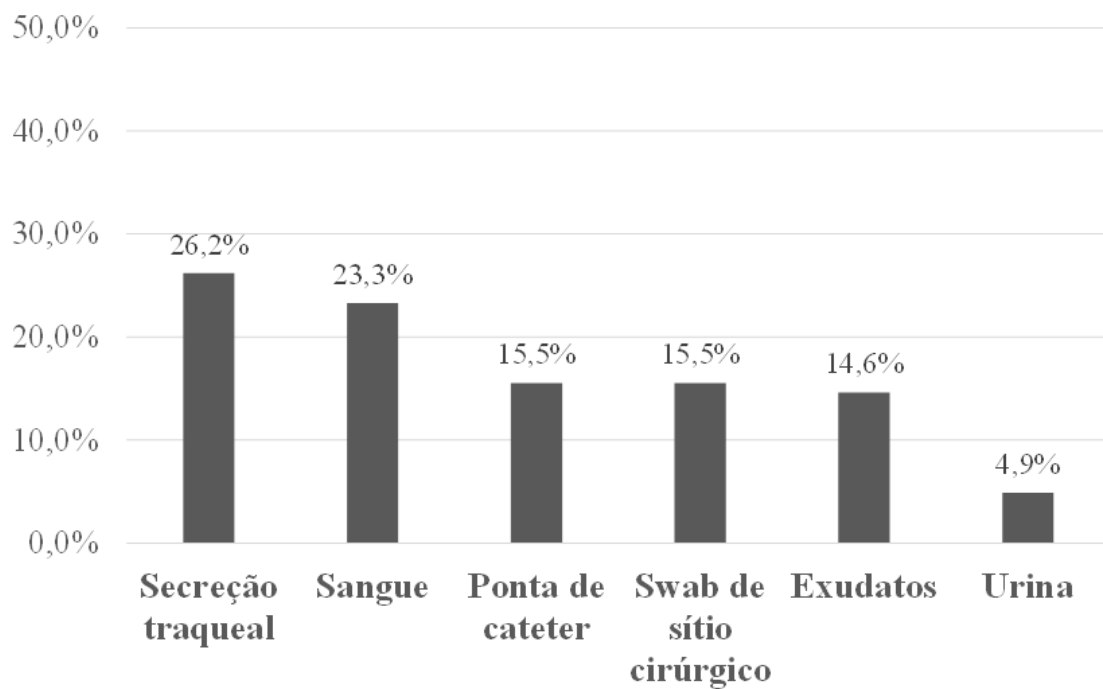


Gráfico 5: Distribuição por espécime clínico relacionado às 103 amostras ORSA isoladas de pacientes no HU/UFJF, entre 2005 a 2010.

Em relação à evolução dos pacientes, 53,4% receberam alta, 43,6% foram a óbito e 3%, transferidos para outros hospitais (Gráfico 6).

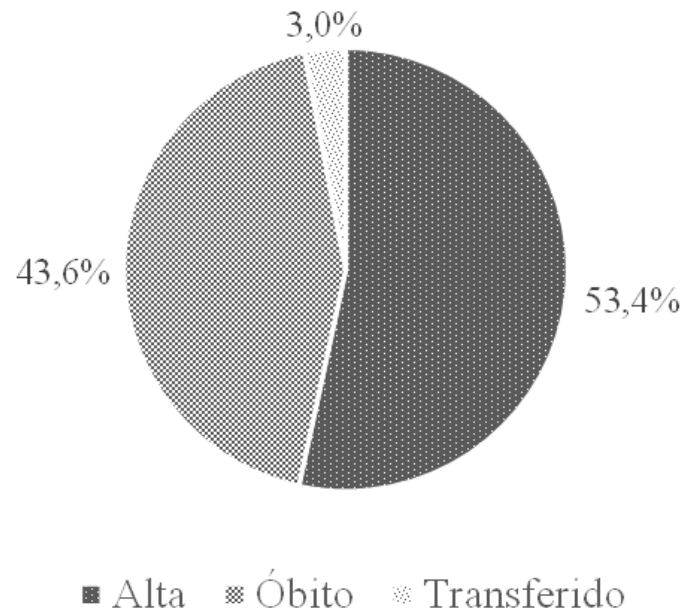


Gráfico 6: Evolução dos pacientes a partir de infecções relacionadas as 103 amostras ORSA isoladas no HU/UFJF, entre 2005 a 2010.

As características clínico-epidemiológicas detalhadas das linhagens de ORSA associadas a pacientes entre os anos de 2005 a 2010 são apresentadas no APÊNDICE A.

Em relação ao perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos, pelo método de disco-difusão, detectado pelo laboratório à época do isolamento e identificação, em geral, observou-se uma alta frequência de resistência contra ciprofloxacina (92,5%), clindamicina (89,7%), eritromicina (86,9%), amicacina (73,8%), gentamicina (70%), sulfametoxazol-trimetoprim (63,5%), tetraciclina (60,7%) e cloranfenicol (52,3%). Não foi observada resistência contra a vancomicina (Gráfico 7)

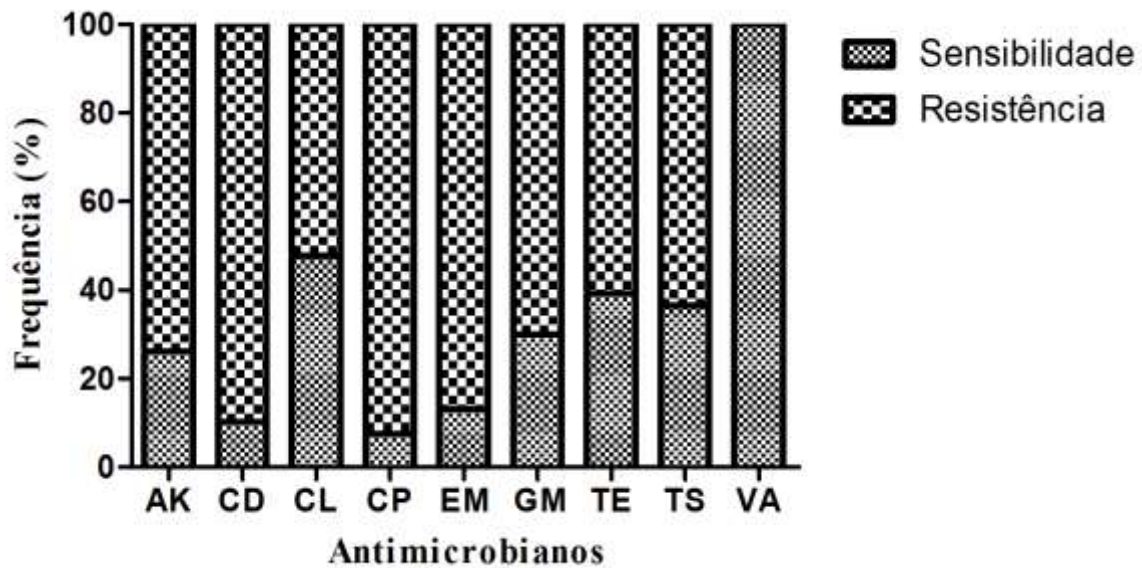


Gráfico 7: Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de linhagens ORSA isoladas a partir de pacientes internados no HU/UFJF, entre 2005 a 2010. AK, amicacina; CP, ciprofloxacina; CD, clindamicina; CL, cloranfenicol; EM, eritromicina; GM, gentamicina, TS, sulfametoxazol-trimetoprim; TE, tetraciclina; VA, vancomicina.

Ao considerar a ocorrência de ORSA ao longo do tempo e sua susceptibilidade a antimicrobianos, foram observadas alterações nos padrões de resistência. Em 2005, a partir das drogas testadas, o antimicrobiano mais eficaz foi cloranfenicol, e níveis elevados de resistência foram observados contra amicacina, ciprofloxacina, clindamicina, eritromicina, gentamicina, sulfametoxazol-trimetoprim e tetraciclina. Em 2006, o aumento da resistência foi observada contra todas as drogas testadas com taxas de resistência de 100% contra a ciprofloxacina, clindamicina, gentamicina e sulfametoxazol-trimetoprim. Nos dois anos seguintes, foi observada diminuição da resistência, especialmente em 2008, com exceção para o cloranfenicol em 2007. Em 2009, observou-se altos níveis de sensibilidade à amicacina, gentamicina, sulfametoxazol-trimetoprim e tetraciclina (90%). Em 2010, houve uma re-emergência de altos níveis de resistência (100%), especialmente contra a ciprofloxacina, clindamicina e eritromicina. Considerando amicacina, gentamicina, sulfametoxazol-trimetoprim e tetraciclina, embora tenha sido observado um aumento da resistência em relação ao ano anterior, as taxas de resistência permaneceram relativamente baixas (28,6%) (Gráfico 8).

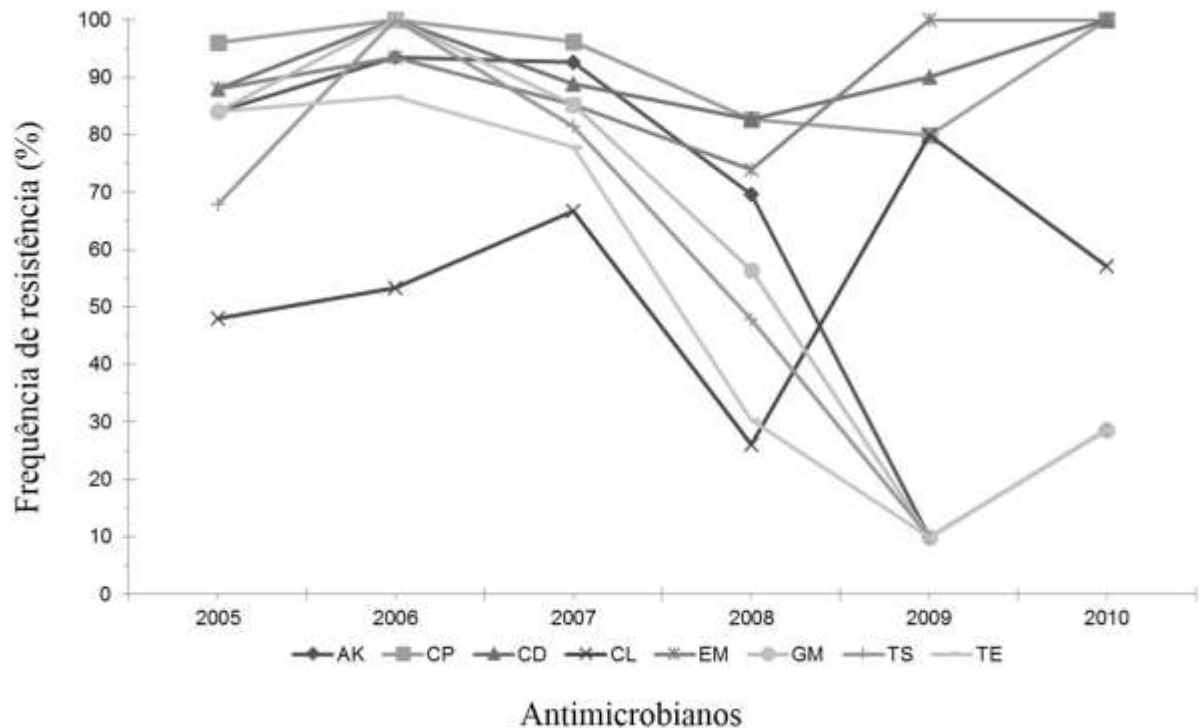
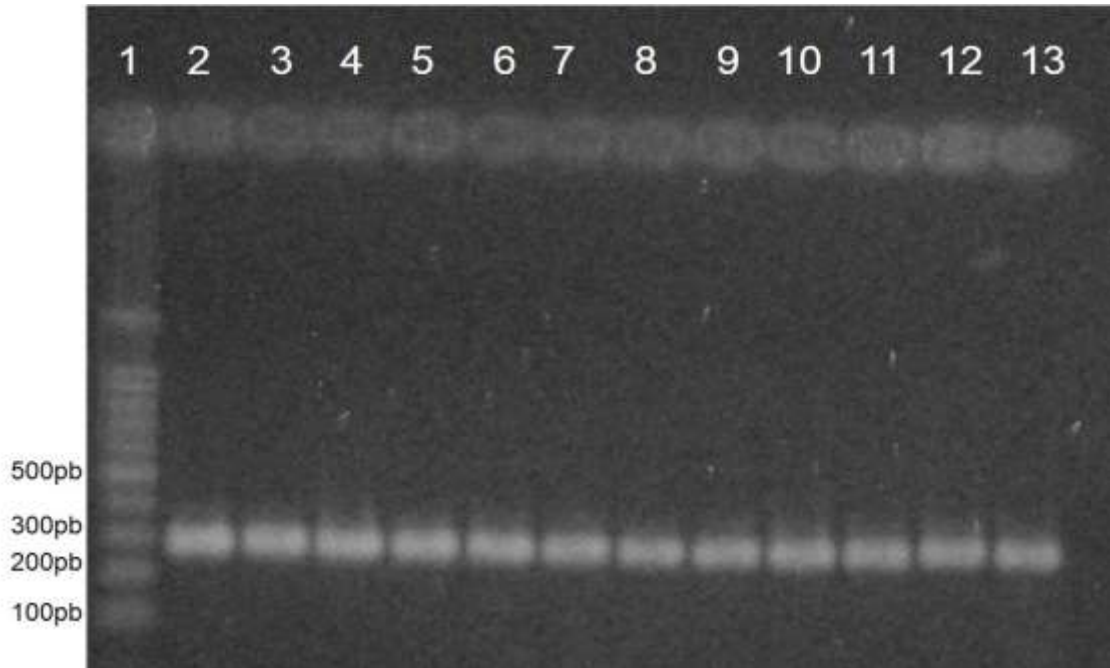


Gráfico 8: Frequência de resistência aos antimicrobianos, entre 2005 a 2010, de linhagens ORSA isoladas a partir de pacientes internados no HU/UFJF, no período. AK, amicacina; CP, ciprofloxacina; CD, clindamicina; CL, cloranfenicol; EM, eritromicina; GM, gentamicina, TS, sulfametoxazol-trimetoprim; TE, tetraciclina.

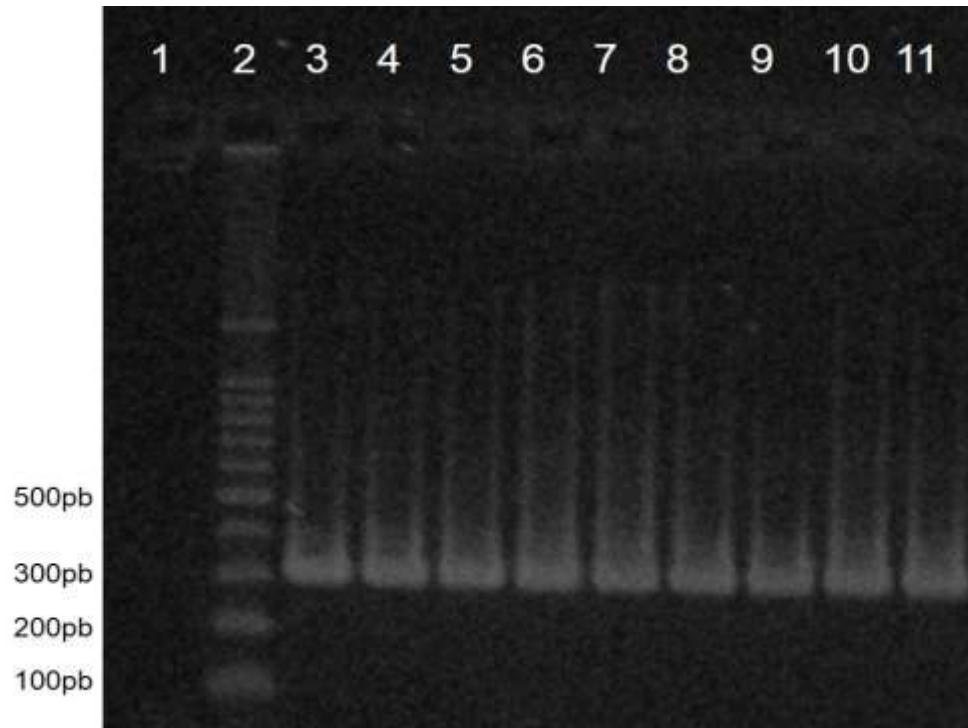
5.2 ESTUDOS MOLECULARES

5.2.1 Confirmação da identidade bacteriana por biologia molecular e detecção do gene *mecA*

As amostras isoladas no Laboratório Prof. Maurílio Baldi do HU/UFJF e recuperadas para o estudo, tiveram sua identidade genética confirmada por biologia molecular, bem com a detecção do gene *mecA* como marcador de resistência a oxacilina. Todas as 103 amostras foram identificadas como *Staphylococcus aureus* (Fotografia 1) e portadoras do gene *mecA* (Fotografia 2).



Fotografia 1: Eletroforegrama representativo da confirmação da identidade genética de *Staphylococcus aureus* segundo Strommenger e colaboradores (2003). Canaleta 1: Padrão molecular de tamanho de DNA (100pb ladder); Canaleta 2: Amostra controle de *S. aureus* ATCC 29213; Canaletas 3 a 13: Amostras do estudo.

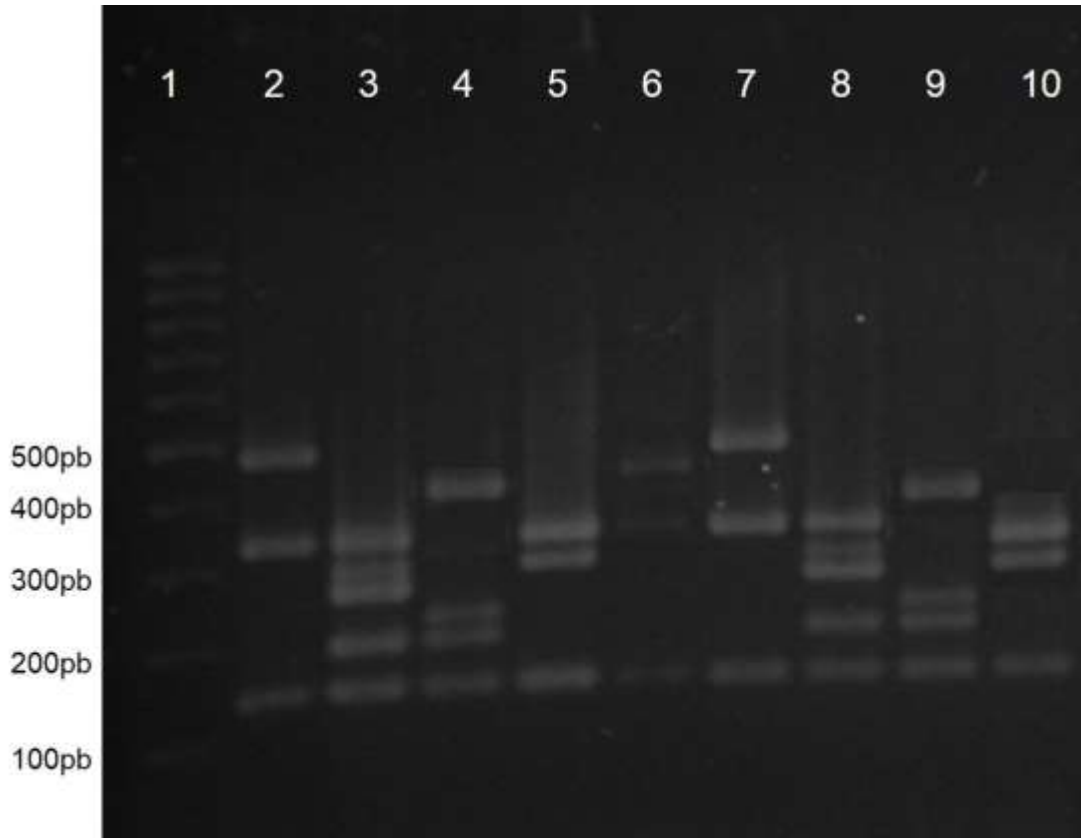


Fotografia 2: Eletroforegrama representativo da detecção do gene *mecA* nas linhagens *Staphylococcus aureus* segundo Zhang e colaboradores, (2004). Canaleta 1: Amostra controle *mecA* negativo *S. aureus* ATCC 29213; Canaleta 2: Padrão molecular de tamanho de DNA (100pb ladder); Canaleta 3: Amostra controle *mecA* positivo *S. aureus* ATCC 33591; Canaletas 4 a 11: Amostras do estudo.

5.2.2 Tipagem do cassete estafilocócico *mec* (SCC*mec*)

A tipagem do cassete cromossômico *mec* nas 103 amostras de ORSA foi realizada através de PCR multiplex, seguindo a metodologia proposta por Milheiriço, Oliveira e De Lencastre (2007). Essa tipagem identificou segmentos gênicos compatíveis com os SCC*mec* dos tipos I (2 amostras/1,9%), II (12 amostras/11,6%), III (73/70,9%) e IV (8/7,8%). Oito amostras (7,8%) não foram tipadas segundo a metodologia estabelecida (Fotografia 3).

Entre as 45 linhagens provenientes do UTI, 30 (66,7%), carregavam o SCC*mec* III, 8 (17,8%) o SCC*mec* II, 2 (4,4%) do SCC*mec* IV e 1 (2,2%) do SCC*mec* I. Em quatro (8,9%) linhagens de ORSA, não foi possível tipar pela técnica descrita.



Fotografia 3: Eletroforegrama representativo dos tipos de SCC*mec* detectados por PCR multiplex em amostras de ORSA, segundo Milheiriço, Oliveira e De Lencastre (2007). Canaleta 1: Padrão molecular de tamanho de DNA (100pb ladder); Canaletas 2 a 6: Amostras de *S. aureus* 119, Mu50, 63a, 522 e 577, controles dos tipos I, II, III, IV e V de SCC*mec*, respectivamente; Canaletas 7 a 10: Amostras do estudo.

5.2.3 Caracterização molecular das amostras de ORSA isoladas na UTI por PFGE e RM

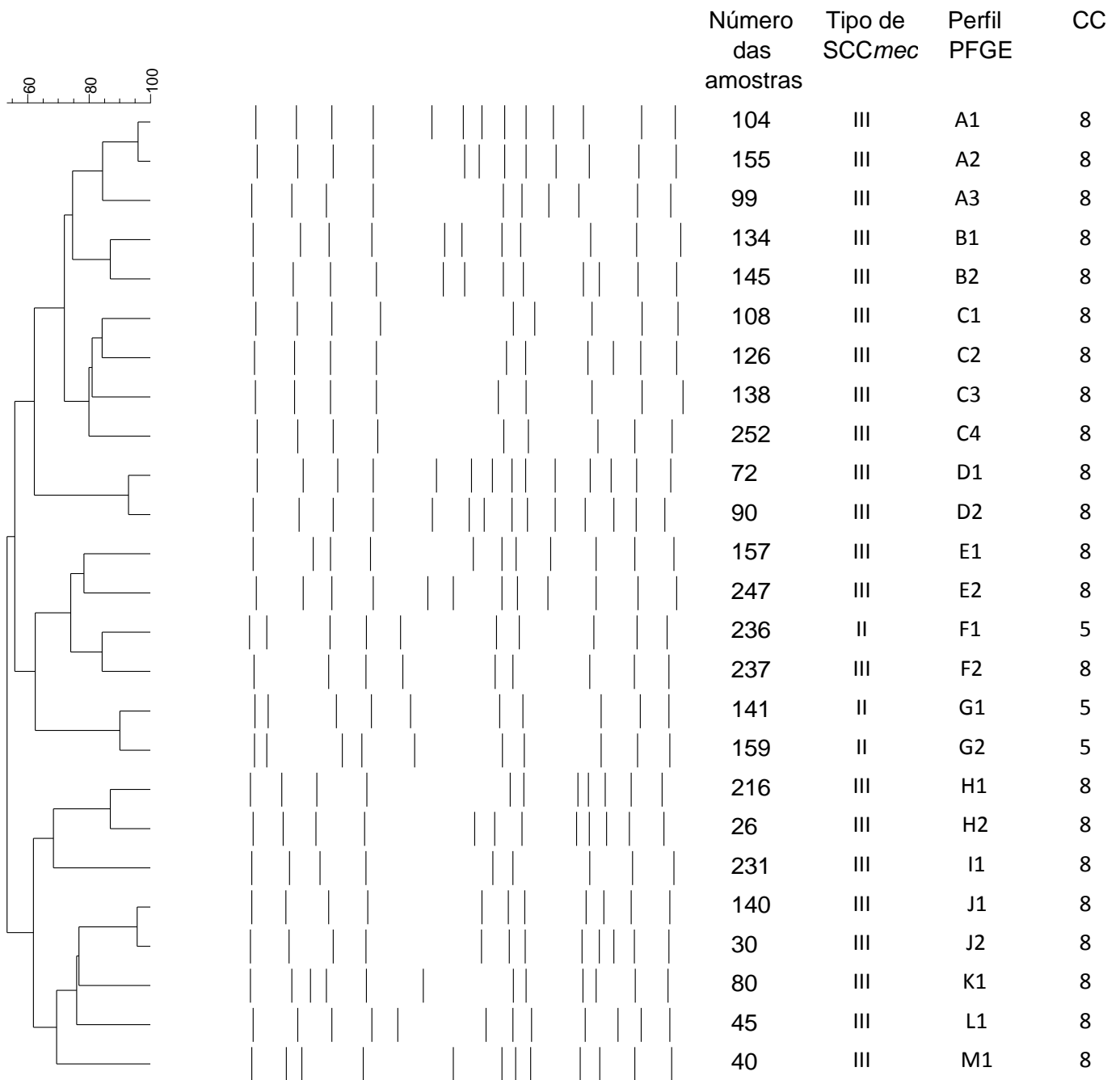
A diversidade genômica foi avaliada para as 45 amostras ORSA isoladas na UTI, através da técnica de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) após tratamento com a enzima de restrição *SmaI*. Os genótipos descritos foram designados por meio de uma letra maiúscula e as variações ou subtipos dentro do mesmo genótipo foram adicionados números subsequentes. Uma amostra de cada genótipo também foi submetida a PCR (teste RM) para determinação do complexo clonal.

A partir da caracterização por SCC*mec*, foram construídos dois dendogramas obtidos por análise computadorizada dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico apresentados pelas amostras. O Dendograma 1 relaciona as amostras com os tipos de SCC*mec* mais prevalentes III e II e o Dendograma 2, aqueles menos prevalentes.

Um total de 32 perfis de fragmentação do DNA cromossômico incluído em 20 genótipos foram obtidos entre as 45 amostras de ORSA analisadas. Entre os genótipos determinados, 16 genótipos foram alocados em três complexos clonais diferentes (1, 5 e 8), enquanto que, em quatro genótipos não foi possível essa determinação.

As 30 amostras com *SCCmec* tipo III foram incluídas em 12 genótipos, designados como A, B, C, D, E, F, H, I, J, K, L e M, que foram distribuídos em 22 perfis de fragmentação diferentes. O genótipo H englobou 7 (23,3%) amostras, enquanto no genótipo C foram alocadas seis (20%) amostras. O complexo clonal (CC) 8 foi relacionado a todas as amostras ORSA do tipo III, relacionadas ao clone epidêmico brasileiro (CEB).

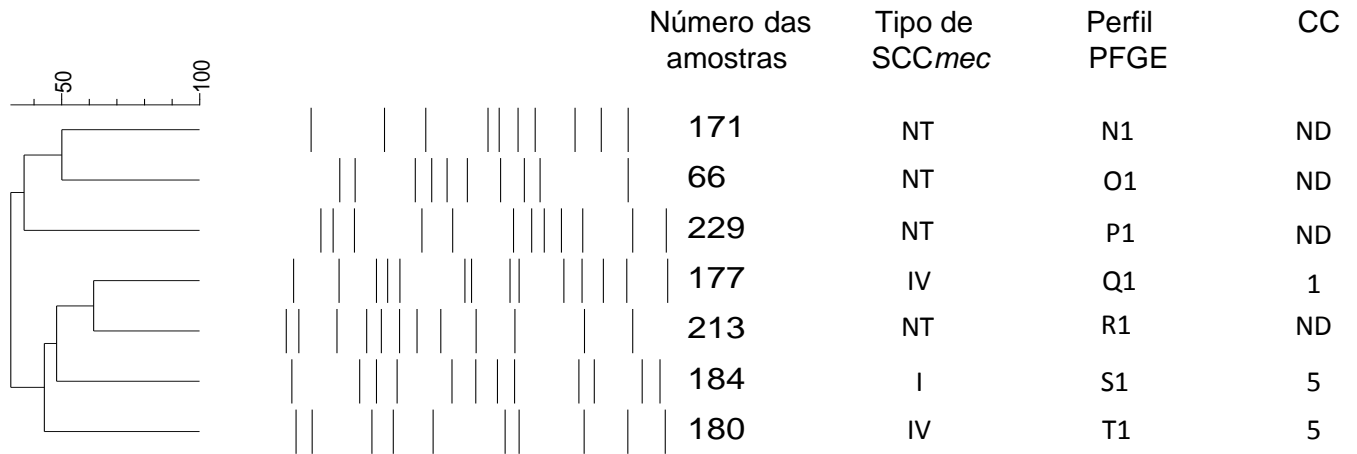
Em relação as 8 amostras com *SCCmec* tipo II (todas relacionadas ao clone USA100), estas foram incluídas em 2 genótipos, designados como F e G, que foram distribuídos em 3 perfis de fragmentação diferentes. O genótipo F, pulsotipo F1, englobou 5 (62,5%) amostras, enquanto que o genótipo G, englobou 3 (37,5%) amostras. Ressalta-se que o genótipo F, englobou tanto amostras *SCCmec* tipo III (pulsotipo F2), quanto *SCCmec* tipo II (pulsotipo F1) (Dendograma 1).



Dendrograma 1: Genótipos representativos obtidos pela fragmentação do DNA cromossômico com enzima *SmaI* em linhagens de ORSA SCCmec tipo III e tipo II isoladas na UTI do HU/UFJF.

As 2 amostras SCCmec tipo IV foram incluídas a dois genótipos (Q e T) e relacionadas aos complexos clonais (CC) 1 (USA400) e 5 (USA800). A única amostra SCCmec tipo I foi incluída no genótipo S, relacionada ao complexo clonal (CC) 5

(USA500). Não foi possível determinar o complexo clonal de quatro genótipos, designados O, N, R e P (Dendograma 2).



Dendograma 2: Genótipos representativos obtidos pela fragmentação do DNA cromossômico com a enzima *SmaI* em linhagens de ORSA SCCmec tipo I, tipo IV e não tipáveis (NT) isoladas na UTI do HU/UFJF.

Ao longo do tempo, houve uma variação na ocorrência de isolados ORSA relacionadas às duas linhagens mais frequentes, CEB/CC8 e USA100/CC5. O Gráfico 9 mostra que esta variação temporal ocorreu entre 2005 e 2010, com destaque para a disseminação do clone CEB até 2008, com a prevalência de 77% entre os isolados, seguido do surgimento e propagação de clones USA100 que surgiu em 2007 e foram predominantes (60%) em 2009 e 2010. Os clones USA400, USA500 e USA800 apresentaram-se como linhagens esporádicas no ano de 2008.

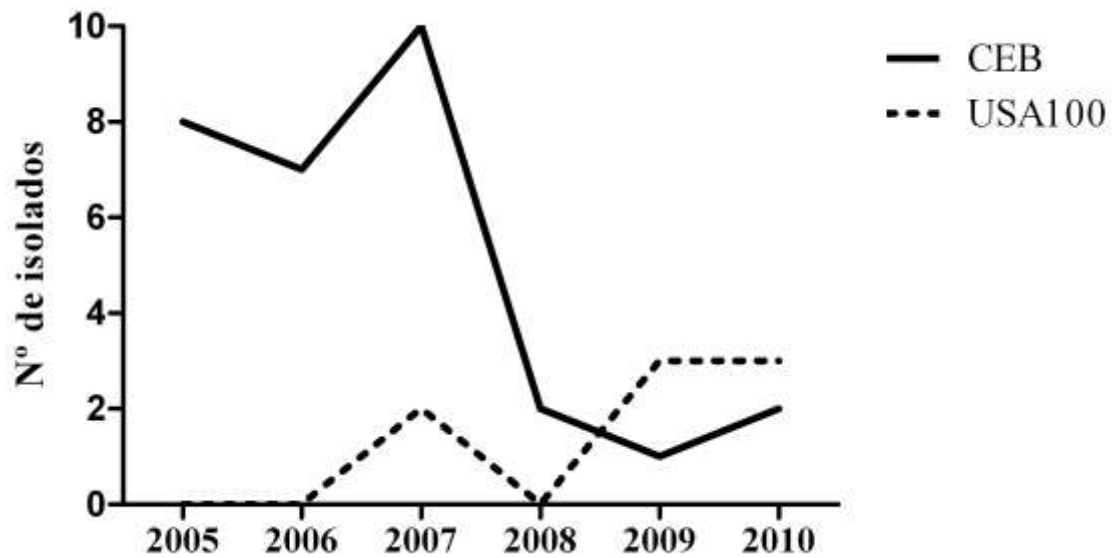


Gráfico 9: Variação temporal dos clones de ORSA, CEB/CC8 e USA100/CC5 prevalentes na UTI do HU/UFJF.

5.3 ESTUDOS FISIOLÓGICOS

5.3.1 Determinação da concentração inibitória mínima de antimicrobianos

As 103 amostras incluídas no estudo foram avaliadas quanto à susceptibilidade a 11 antimicrobianos pelo método de diluição em ágar segundo os critérios do CLSI (2012).

Os resultados dos testes de susceptibilidade aos antimicrobianos pela determinação da concentração inibitória mínima (CIM) estão apresentados em termos de CIM₅₀ (concentração inibitória mínima, na qual 50% dos isolados testados foram inibidos) e CIM₉₀ (concentração inibitória mínima, na qual 90% dos isolados testados foram inibidos), variação das CIMs e taxas de sensibilidade, resistência intermediária e resistência. As maiores taxas de resistência foram observadas para os antimicrobianos clindamicina e eritromicina (100%), seguido de azitromicina (99%), levofloxacina (97,1%), gentamicina (89,3%), rifampicina (81,5%), tetraciclina (78,6%) e sulfametoxazol/trimetoprim (75,7%). Taxas intermediárias de resistência foram encontradas para cloranfenicol (64,1%). Todos os microrganismos avaliados foram sensíveis a linezolida e vancomicina (Tabela 3).

Tabela 3: Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos das 103 linhagens bacterianas de ORSA, isoladas no HU/UFJF entre 2005 a 2010.

Antimicrobianos	Concentração Inibitória Mínima ($\mu\text{g/mL}$)			S (%)	RI (%)	R (%)
	CIM ₅₀	CIM ₉₀	Variação			
Azitromicina	>1024,0	>1024,0	0,5 - >1024,0	1,0	-	99,0
Clindamicina	>1024,0	>1024,0	512,0 - >1024,0	-	-	100,0
Cloranfenicol	64,0	64,0	4,0 - 128,0	35,9	4,8	59,3
Eritromicina	512,0	512,0	256,0 - 512,0	-	-	100,0
Gentamicina	128,0	1024,0	0,125 - >1024,0	10,7	4,8	84,5
Levofloxacina	4,0	32,0	0,25 - 256,0	2,9	3,9	93,2
Linezolida	2,0	2,0	1,0 - 2,0	100,0	-	-
Rifampicina	2,0	256,0	0,0625 - >1024,0	18,5	31,0	50,5
Sulfametoxazol/ Trimetoprim	32,0/608,0	128,0/2432,0	0,0625/2,3 - 1024,0/19456,0	24,3	-	75,7
Tetraciclina	32,0	64,0	0,0625 - 128,0	21,4	1,0	77,6
Vancomicina	1,0	2,0	0,5 - 2,0	100,0	-	-

CIM, concentração inibitória mínima; R, resistência; RI, resistência intermediária; S, sensibilidade

A análise do perfil de resistência de cada amostra ORSA frente a todos os antimicrobianos utilizados mostrou 22 fenótipos diferentes a partir das 103 amostras avaliadas. Segundo a avaliação, 46 (44,6%) amostras foram resistentes a 9 de 11 antimicrobianos testados. Resistência simultânea foi observada também a oito (29,1%), sete (7,8%), seis (5,9%) cinco (10,7%) e quatro (1,9) drogas antimicrobianas (Tabela 4).

Tabela 4: Distribuição de fenótipos de resistência apresentados pelas 103 linhagens de ORSA, isoladas no HU/UFJF entre 2005 a 2010.

Perfil de resistência aos antimicrobianos (N)	Número de amostras (%)
AZI, CLI, CLO, ERY, GEN, LEV, RIF, SXT, TET (9)	46 (44,6%)
AZI, CLI, CLO, ERY, GEN, LEV, RIF, SXT (8)	2 (1,9%)
AZI, CLI, CLO, ERY, GEN, LEV, RIF, TET (8)	3 (2,9%)
AZI, CLI, CLO, ERY, GEN, LEV, SXT, TET (8)	4 (3,9%)
AZI, CLI, ERY, GEN, LEV, RIF, SXT, TET (8)	21 (20,4%)
AZI, CLI, CLO, ERY, GEN SXT, TET (7)	1 (1,0%)
AZI, CLI, ERY, GEN, LEV, RIF, TET (7)	2 (1,9%)
AZI, CLI, CLO, ERY, GEN, LEV, RIF (7)	3 (2,9%)
AZI, CLI, CLO, ERY, LEV, RIF, TET (7)	1 (1,0%)
AZI, CLI, ERY, GEN, LEV, SXT, TET (7)	1 (1,0%)
AZI, CLI, ERY, GEN, LEV, RIF (6)	2 (1,9%)
AZI, CLI, ERY, GEN, LEV, SXT (6)	1 (1,0%)
CLI, ERY, GEN, LEV, RIF, SXT (6)	1 (1,0%)
AZI, CLI, CLO, ERY, GEN, LEV (6)	1 (1,0%)
AZI, CLI, CLO, ERY, LEV, RIF (6)	1 (1,0%)
AZI, CLI, CLO, ERY, LEV (5)	4 (3,9%)
AZI, CLI, ERY, LEV, RIF (5)	2 (1,9%)
AZI, CLI, ERY, GEN, LEV, (5)	2 (1,9%)
AZI, CLI, ERY, GEN, RIF (5)	1 (1,0%)
AZI, CLI, ERY, LEV, SXT(5)	1 (1,0%)
AZI, CLI, ERY, GEN, TET (5)	1 (1,0%)
AZI, CLI, ERY, LEV (4)	2 (1,9%)

AZI, azitromicina; CLI, clindamicina; CLO, cloranfenicol; ERY, eritromicina; GEN, gentamicina; LEV, levofloxacina; RIF, rifampicina; SXT, sulfametoxazol/trimetoprim; TET, tetraciclina

5.3.2 Determinação da concentração inibitória mínima a amins aromáticas alquiladas

A avaliação da susceptibilidade frente a 5 amins aromáticas alquiladas, 24c, 24d, 24e, 24f e 24g, previamente sintetizadas por Almeida e colaboradores (2013), pela técnica de

diluição em caldo, de acordo com a metodologia descrita por Alviano (2008) foi realizada para 21 linhagens representativas de ORSA escolhidas de forma aleatória e ao acaso.

Os resultados, mostrados na Tabela 5, revelaram que os compostos 24c, 24d, 24e e 24f foram ativos contra todas as amostras de ORSA isoladas (CIM= 2,0µg/mL - 128,0µg/mL). Os compostos 24e e 24f mostraram atividade antibacteriana *in vitro* mais potente, com CIM₉₀ = 8,0µg/mL para ambos, superior ao resultado obtido frente ao cloranfenicol, que foi o antimicrobiano utilizado como controle devido à sua estrutura química semelhante aos compostos.

Tabela 5: Perfil de susceptibilidade a compostos químicos aminoálcoois lipofólicos de linhagens ORSA, isoladas no HU/UFJF entre 2005 a 2010.

Compostos testados	Concentração Inibitória Mínima (µg/mL)		
	CIM ₅₀	CIM ₉₀	Varição
24c	16,0	64,0	8,0 – 128,0
24d	8,0	16,0	8,0 – 32,0
24e	8,0	8,0	2,0 – 16,0
24f	4,0	8,0	4,0 – 16,0
24g	8,0	>1024,0	2,0 – >1024,0
Cloranfenicol	16,0	32,0	8,0 – 128,0

5.3.3 Avaliação da produção de biofilme

Em relação à produção de biofilme, utilizando a metodologia descrita por Andrade (2010), os seguintes valores aproximados de DO foram considerados para classificação das amostras, de acordo com a média de DO para amostra *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 cujo valor foi 1,45: valor de DO menor ou igual a 1,45, para amostras não produtoras de biofilme; DO acima de 1,45 para amostras produtoras de biofilme.

Entre as 103 amostras avaliadas, 59 (57,3%) produziram biofilme, enquanto que 44 (42,7%) não produziram. O Gráfico 10 apresenta avaliação de biofilme em função da densidade ótica.

Entre as amostras avaliadas houve diferença estatística entre as médias daquelas que produziram biofilme, em relação as que não produziram ($p=8,8 \times 10^{-26}$), com intervalo de confiança de 95%.

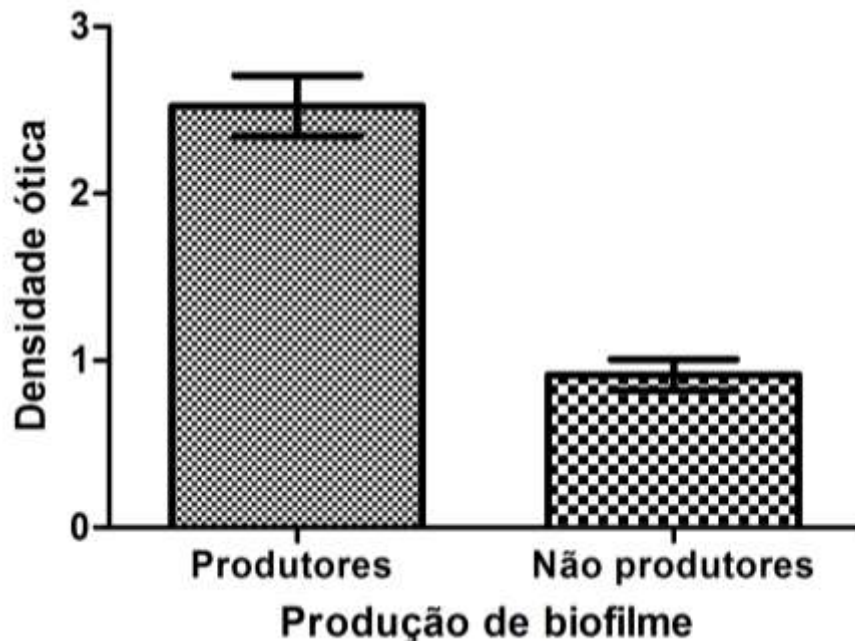


Gráfico 10: Avaliação da produção de biofilme em função da densidade ótica de 103 linhagens de ORSA isoladas no HU/UFJF entre 2005 e 2010.

5.3.4 Avaliação da atividade hemolítica

Em relação à avaliação da atividade hemolítica, utilizando a metodologia descrita Smith-Palmer, Stewart e Fyfe (2004), foi estabelecido o valor da média de DO 0,033 referente ao controle negativo do experimento determinado pelo tampão PBS. Assim, para a classificação das amostras foi determinado valor de DO menor ou igual a 0,033, para amostras não hemolíticas; DO acima de 0,033 para amostras hemolíticas.

Entre as 103 amostras avaliadas, 49 (47,6%) foram classificadas como hemolíticas, enquanto que 54 (52,4%) foram, não hemolíticas.

O Gráfico 11 apresenta avaliação da capacidade de hemólise em função da densidade ótica. Entre as amostras avaliadas houve diferença estatística entre as médias das linhagens hemolíticas, em relação as não-hemolíticas ($p=1,3 \times 10^{-11}$), com intervalo de confiança de 95%.

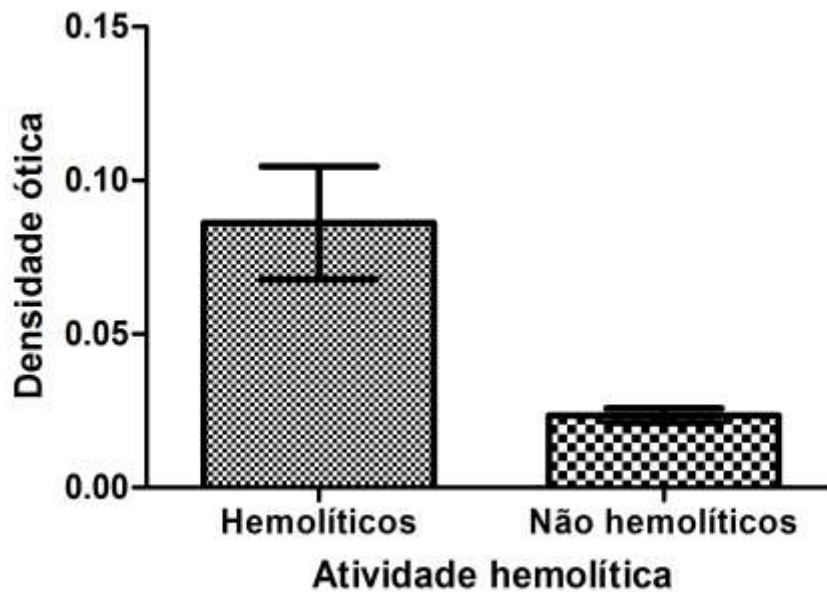


Gráfico 11: Avaliação da atividade hemolítica em função da densidade ótica de 103 linhagens de ORSA isoladas no HU/UFJF entre 2005 e 2010.

5.3.5 Correlação entre fenótipo de resistência com a expressão do fenótipo de virulência

A correlação entre o fenótipo de resistência com a expressão do fenótipo de virulência pode ser observado na Tabela 6 e foi realizada pelo cálculo de *odds ratio*, com intervalo de confiança de 95%.

Observa-se que existe uma correlação positiva entre a produção de biofilme e resistência a múltiplos antimicrobianos, ou seja as linhagens mais produtoras de biofilme foram aquelas que foram resistentes simultaneamente a 7 (OR=2,25 – 95%IC: 0,37-13,7), 8 (OR=4,28 – 95%IC: 1,39-13,2) e 9 drogas (OR=3,62 – 95%IC: 1.56-8,4).

Em relação a atividade hemolítica, esta também apresenta uma correlação positiva associada diretamente a resistência múltipla a 6 (OR=5,5 – 95%IC: 0,61-49,5), 7 (OR=1,68 – 95%IC: 0,28-9,7), 8 (OR=2,71 – 95%IC: 0,90-8,1) e 9 (OR=1,1 – 95%IC: 0,52-2,5) drogas, embora essa tendência seja variável devido ao valor de *odds ratio*.

Tabela 6: Relação entre habilidades bacterianas relacionadas à agressão e frequência de resistência aos antimicrobianos em linhagens de ORSA isoladas de pacientes no HU/UFJF.

Habilidades	Frequência de resistência aos antimicrobianos (%)					
	4 (n=2)	5 (n=11)	6 (n=6)	7 (n=8)	8 (n=30)	9 (n=46)
Produtores de biofilme	1 (50)	2 (18,2)	1 (16,7)	3 (37,5)	18 (60)	34 (73,9)
Não produtores de biofilme	1 (50)	9 (81,8)	5 (83,3)	5 (62,5)	12 (30)	12 (26,1)
Hemolíticos	0	2 (18,2)	3 (50)	3 (37,5)	16 (53,3)	21 (45,6)
Não hemolíticos	2 (100)	9 (81,8)	3 (50)	5 (62,5)	14 (46,7)	25 (54,4)

5.3.6 Associação entre resistência antimicrobiana e os tipos de SCCmec

A associação entre as taxas de resistência aos antimicrobianos e os tipos de SCCmec detectados pode ser observada na Tabela 8.

As 2 amostras que carregavam o SCCmec tipo I foram resistentes a azitromicina, clindamicina eritromicina, gentamicina e levofloxacina. Uma delas também apresentou resistência intermediária ao cloranfenicol. Em relação as 12 amostras que carregavam o SCCmec tipo II, todas foram resistentes a azitromicina, clindamicina, eritromicina e levofloxacina. No entanto apenas 1 amostra apresentou resistência ao sulfametoxazol/trimetoprim. Todas as 73 amostras com SCCmec tipo III apresentaram resistência a cinco ou mais antimicrobianos, dentre os 11 testados. Assim como aquelas que carregavam SCCmec II, todas foram resistentes a azitromicina, clindamicina, eritromicina e levofloxacina. Observamos níveis elevados de resistência também a gentamicina, tetraciclina, rifampicina e sulfametoxazol/trimetoprim.

Todas as oito amostras com SCCmec tipo IV foram resistentes a clindamicina e eritromicina assim como todas as outras com diferentes cassetes. Apenas 1 amostra foi sensível a azitromicina e 7 delas foram sensíveis a rifampicina. No entanto, 5 amostras demonstraram-se resistentes ao sulfametoxazol/trimetoprim e 6 a tetraciclina.

Das amostras com esse cassete, apenas 1 foi resistente a, no máximo, quatro antimicrobianos, enquanto que 4 foram resistentes a sete ou mais antimicrobianos dos 11 testados.

Tabela 7: Associação da resistência aos antimicrobianos de acordo com o teste de diluição em ágar em 95 linhagens de ORSA isoladas de pacientes no HU/UFJF em relação aos diferentes tipos de SCCmec detectados.

Antimicrobianos [‡]	Número (%) de amostras resistentes				Total (n=95)
	SCCmec I (n=2)	SCCmec II (n=12)	SCCmec III (n=73)	SCCmec IV (n=8)	
Azitromicina	2 (100)	12 (100)	73 (100)	7 (87,5)	94 (99)
Clindamicina	2 (100)	12 (100)	73 (100)	8 (100)	95 (100)
Cloranfenicol	1 (50)	9 (75)	50 (68,5)	3 (37,5)	63 (66,3)
Eritromicina	2 (100)	12 (100)	73 (100)	8 (100)	95 (100)
Gentamicina	2 (100)	7 (58,3)	71 (97,2)	7 (87,5)	87 (91,6)
Levofloxacina	2 (100)	12 (100)	73 (100)	6 (75)	93 (97,9)
Rifampicina	0	8 (66,7)	69 (94,5)	1 (12,5)	78 (82,1)
Sulfametoxazol/ trimetoprim	0	1 (8,3)	68 (93,1)	5 (62,5)	74 (77,9)
Tetraciclina	0	3 (25)	70 (95,9)	6 (75)	79 (83,1)

[‡]Todas as amostras foram sensíveis a linezolida e vancomicina

5.3.7 Associação entre os perfis genotípicos detectados e susceptibilidade aos antimicrobianos para as linhagens de ORSA isoladas na UTI

Considerando as 45 linhagens isoladas na UTI, com exceção para os antimicrobianos vancomicina e linezolida (CIM₉₀ = 2,0µg/mL), foi observado altas taxas de resistência para as 9 drogas antimicrobianas testadas, onde os valores de CIM₉₀ = >1024,0µg/mL foram encontrados para azitromicina, clindamicina e gentamicina, 512,0µg/mL para eritromicina, 256,0µg/mL para rifampicina, 128,0/2432,0µg/mL para Sulfametoxazol/Trimetoprim, 64,0µg/mL para tetraciclina e cloranfenicol e 16,0µg/mL para

levofloxacin (Tabela 8). Na Tabela 10, apresenta-se a associação entre os perfis genotípicos detectados e o perfil de susceptibilidade das 45 linhagens ORSA isoladas na UTI.

Tabela 8. Perfil de resistência das 45 linhagens de ORSA isoladas na UTI do HU/UFJF.

Antimicrobianos	Concentração Inibitória Mínima ($\mu\text{g/mL}$)			Nº (%) de linhagens resistentes
	CIM ₅₀	CIM ₉₀	Varição	
Azitromicina	>1024,0	>1024,0	0,5 – >1024,0	44 (97,7)
Cloranfenicol	32,0	64,0	4,0 – 128,0	30 (66,6)
Clindamicina	>1024,0	>1024,0	512,0 – >1024,0	45 (100)
Eritromicina	512,0	512,0	256,0 – 512,0	45 (100)
Gentamicina	128,0	1024,0	0,125 – >1024,0	40 (88,8)
Levofloxacin	4,0	16,0	2,0 – 32,0	45 (100)
Linezolida	2,0	2,0	1,0 – 2,0	0 (0)
Rifampicina	2,0	256,0	0,0625 – >1024,0	40 (88,8)
Tetraciclina	32,0	64,0	0,0625 – 128,0	35 (77,7)
Sulfametoxazol/ trimetoprim	32,0/60,0	128,0/2432,0	0,0625/2,3 - 1024,0/19456,0	32 (71,1)
Vancomicina	1,0	2,0	0,5 – 2,0	0 (0)

Tabela 9: Associação entre os perfis genotípicos e perfil de resistência para as linhagens de ORSA isoladas na UTI do HU/UFHF entre 2005 e 2010

Ano de isolamento (Nº de linhagens)	Perfil de resistência antimicrobiana (Nº de linhagens) [‡]	Tipos de SCCmec (Nº de linhagens)	Genótipo (Nº de linhagens) [§]	Clonalidade/CC (Nº de linhagens) ^{±,*}
2005 (9)	Azi/Gen/Rif/Sxt/Tet (5), Azi/Chl/Gen/Rif/Sxt/Tet (4)	III (8), NT (1)	H1 (2), A2 (1), H2 (1), J2 (1), M1 (1), L1 (1), C2 (1), O1 (1)	BEC/8 (8), ND (1)
2006 (7)	Azi/Chl/Gen/Rif/Sxt/Tet (3), Azi/Gen/Rif/Sxt/Tet (3), Azi/Chl/Gen/Rif (1)	III (7)	C1 (2), D1 (1), K1 (1), D2 (1), A3 (1), A1 (1)	BEC/8 (7)
2007 (12)	Azi/Chl/Gen/Rif/Sxt/Tet (9), Azi/Chl/Gen/Rif/Sxt (1), Azi/Gen/Rif/Tet (1), Azi/Gen/Rif (1)	III (10), II (2)	C2 (1), B1 (1), C3 (1), H1 (1), J1 (1), G1 (1), B2 (1), A2 (1), E1 (1), G2 (1), E2 (1), C4 (1)	BEC/8 (10), USA100/5 (2)
2008 (7)	Azi/Chl/Gen/Rif/Sxt/Tet (1), Azi/Chl/Gen/Sxt/Tet (1), Azi/Chl/Rif/Tet (1), Gen/Sxt/Tet (1), Azi/Gen/ Rif (1),	III (2), IV (2), I (1), NT (2)	H1 (2), N1 (1), Q1 (1), T1 (1), S1 (1), R1 (1)	BEC/8 (2), USA500/1(1), USA800/5 (1), USA400/1(1), ND (2)

	Azi/Gen/(1), Azi/Sxt (1)			
	Azi/Chl/Gen/Rif/Tet (2),			
2009	Azi/Chl/Gen/Rif/Sxt/Tet (1),	II (3), III (1),	F1 (2), H1 (1), G1 (1),	USA100/5 (3),
(5)	Azi/Chl/Rif/Tet (1),	NT (1)	P1 (1)	BEC/8 (1),ND (1)
	Azi/Chl/Rif (1)			
	Azi/Chl/Gen/Rif/Sxt/Tet (2),			
2010	Azi/Chl/Gen/Rif/Tet (1),	II (3), III (2)	F1 (3), II (1), F2 (1)	USA100/5 (3),
(5)	Azi/Rif (1), Azi(1)			BEC/8 (2)

Azi, azitromicina; Chl, cloranfenicol; Gen, gentamicina; Rif, rifampicina; Sxt, sulfametoxazol/trimetoprim; Tet, tetraciclina; CC, complexo clonal; NT, não tipável; ND, não determinado

‡Todas as linhagens foram resistente a clindamicina, eritromicina e levofloxacina.

§Definido por PFGE de acordo com Van Belkum et al, 2007.

±De acordo com McDougal et al, 2003.

* De acordo com Cockfield et al, 2007.

No APÊNDICE A é apresentado uma tabela com as características das 45 linhagens de ORSA isoladas na unidade de tratamento intensivo do HU/UFJF.

6 DISCUSSÃO

Staphylococcus aureus estão entre os patógenos mais isolados de infecções relacionadas a assistência à saúde em todo o mundo (ARCHER, 1998; ROSENTHAL et al., 2010). Segundo a literatura, a colonização nasal constitui o maior fator de risco para o desenvolvimento das infecções causadas por este microrganismo (WERTHEIM et al., 2004). De acordo com Robicsek e colaboradores (2008), cerca de 30% dos pacientes colonizados por *S. aureus* desenvolvem infecção, enquanto que apenas 2% dos indivíduos não colonizados a desenvolvem.

Uma questão de agravo à saúde relacionada às infecções por *S. aureus* é o frequente aumento nas taxas de resistência aos antimicrobianos, em especial à oxacilina, fármaco de escolha para o tratamento de infecções causadas por este patógeno (LOWY, 1998; ROSENTHAL et al., 2010). Diversos estudos revelaram que as taxas de resistência a esse antimicrobiano tem aumentado de forma significativa tanto nos EUA, quanto em países europeus, assim como na América Latina (DIEKEMA et al., 2001; EARSS, 2005; NNIS, 2004). No Brasil, segundo estudo de Sader e colaboradores (2004), as taxas de resistência à oxacilina em *S. aureus* estão próximas de 50%.

No presente estudo, foram avaliadas 103 amostras de *S. aureus* resistentes à oxacilina, a partir de espécimes clínicos de pacientes internados em um hospital universitário da cidade de Juiz de Fora, Minas Gerais, entre os anos de 2005 a 2010.

O isolamento e identificação, bem como a susceptibilidade à oxacilina, pelo laboratório de análises clínicas do hospital, foi determinada segundo do metodologia convencional (BANNERMAN e PEACOCK, 2007) e pelo teste de disco-difusão a cefoxitina segundo o CLSI, respectivamente. A detecção da resistência à oxacilina, utilizando o disco de cefoxitina foi incorporada às recomendações do CLSI, a partir de 2003, baseada em estudos como o de Felten e colaboradores (2002), no qual a difusão a partir deste disco apresentou sensibilidade de 100% na detecção dessas amostras, enquanto o teste de triagem em ágar e o de difusão a partir do disco de oxacilina apresentaram sensibilidade de 94% e 96%, respectivamente. Além disso, 100% das amostras teve sua identidade confirmada por PCR e em todas foi identificado o gene *mecA*.

A grande maioria dos isolados foram provenientes de pacientes internados na UTI (43,7%) sendo que os homens foram os mais acometidos (71%). Em relação ao espécime

clínico associado, a maioria foi isolada a partir de secreção traqueal (26,2%) relacionada em infecções respiratórias (34%). Embora a maioria dos pacientes obtiveram alta, um número significativo evoluíram para o óbito (43,6%). Um estudo analisando amostras de ORSA relacionadas a infecções hospitalares, isoladas entre 2005 a 2011, em um hospital universitário do estado do Rio de Janeiro revelou a Terapia Intensiva, como o setor de maior ocorrência destas amostras (34,2%). Amostras de sangue foram espécime clínico mais associado (32,4%), embora aspirado de secreção traqueal e lavado bronco-alveolar representem um espécime clínico significativo (29,6%). Ainda no mesmo estudo, 43,5% dos pacientes evoluíram para o óbito (CORREAL et al., 2013).

Em relação à alta frequência de resistência a outros antimicrobianos, além da oxacilina, diversos estudos, analisando amostras de ORSA isoladas de diversas localidades, inclusive de países da América Latina, demonstram que a ocorrência de resistência a múltiplos antimicrobianos é comum entre elas (DIEKEMA et al., 2001).

Um estudo conduzido por Caboclo e colaboradores, em 2013, analisando amostras ORSA isoladas de um hospital público do Rio de Janeiro, entre setembro de 2004 a agosto de 2007, demonstrou altas taxas de resistência a eritromicina (97,4%), ciprofloxacina (94,8%) e clindamicina (92,2%) e taxas acima de 60% para cloranfenicol e gentamicina. Teixeira e colaboradores (2012), analisando 56 amostras de ORSA isoladas em um hospital universitário na região do Triângulo Mineiro, no ano de 2008 revelou altas taxas de resistência a ciprofloxacina (98,2%), clindamicina (96,4%), eritromicina (100%), gentamicina (92,9%), norfloxacina (96,4%), tetraciclina (89,3%) e sulfametoxazol/trimetoprim (85,7%). Todas as amostras foram sensíveis a linezolida e vancomicina.

Estudos conduzidos em países europeus demonstram que, de maneira geral, a resistência à oxacilina está associada a resistência cruzada às quinolonas, aminoglicosídeos e macrolídeos (FLUIT et al., 2000). Um estudo americano, analisando amostras ORSA provenientes de bacteremias, isoladas entre os anos de 1999 a 2006 demonstrou que estas, apresentaram taxas mais elevadas de resistência à eritromicina, ciprofloxacina e clindamicina (HOLMES e JORGENSEN, 2008). Segundo dados do programa SENTRY, amostras ORSA isoladas no Brasil apresentam, em média, resistência a seis classes de antimicrobianos (DIEKEMA et al., 2001).

Nosso estudo, demonstrou que 87,4% das linhagens ORSA apresentaram resistência a pelo menos 6 classes dos 11 antimicrobianos testados. Apesar de apenas 1,9%

das linhagens apresentarem resistência a no máximo 4 classes de antimicrobianos, estudos tem demonstrado um aumento no perfil de sensibilidade aos antimicrobianos por amostras ORSA de origem hospitalar, o que revela uma tendência na mudança nos perfis de susceptibilidade por estas amostras (NINMO et al., 2006; RIBEIRO et al., 2007; TENOVER et al., 2006).

Acredita-se que pressão seletiva imposta pela exposição bacteriana frequente a diversos antimicrobianos, pode ter contribuído para as observações de que determinantes genéticos de resistência a diversas classes de drogas possam ter sido incorporadas a regiões cromossômicas próximas ao *SCCmec*. Desta forma, uma vez adquirido esse cassete, as amostras ORSA poderiam se tornar resistentes a vários antimicrobianos disponíveis, como um mecanismo de co-resistência (DIEKEMA et al., 2001).

Atualmente, questões relacionadas ao fenômeno da resistência bacteriana, como reflexo direto das alterações induzidas pelos antimicrobianos nas células bactérias, envolvem variações nos padrões morfológicos, bioquímicos e fisiológicos.

Neste estudo foram avaliadas habilidades fisiológicas bacterianas associadas à agressão como a produção de biofilme e atividade hemolítica. Entre as 103 amostras avaliadas, 59 (57,3%) produziram biofilme, enquanto que 44 (42,7%) não produziram.

Um biofilme pode ser definido uma comunidade bacteriana de uma ou mais espécies agregadas por uma matriz polimérica aderentes a superfícies vivas ou inanimadas (WEINACHT et al., 2004).

A aderência bacteriana às superfícies permite que estes organismos sejam resistentes aos mecanismos de dispersão mecânica associado a superfícies como aqueles relacionados ao trato gastrointestinal durante a colonização das superfícies mucosas (WILSON, 2002). Embora a adesão seja essencial para a manutenção da microbiota e seu hospedeiro, a formação de um biofilme é o primeiro estágio de uma doença infecciosa, relacionado à adesão bacteriana e que inclui infecções associadas a dispositivos protéticos, endocardites, doenças orofaciais, respiratórias e do trato gastrointestinal e geniturinário, dentre outras (WOLCOTT et al., 2010; DICKSCHAT, 2010). Os mecanismos exatos pelos quais células bacterianas podem aderir às camadas de células epiteliais ou às secreções como as camadas de mucina são, ainda, desconhecidos, embora diferentes tipos de interações pili/fímbria e adesão mediada por adesinas sejam frequentemente envolvidos (DONLAN, 2001; WOLCOTT et al., 2010; DICKSCHAT, 2010). Além disso, o biofilme atua como barreira física à ação dos

antimicrobianos e do sistema imunológico do paciente, constituindo um grave problema em instituições de saúde, pois, está intrinsecamente relacionado ao aumento da resistência dos microrganismos aos antimicrobianos (DONLAN, 2001).

Vários estudos mostram que diferentes substâncias químicas, entre elas antimicrobianos, desinfetantes e ainda substâncias antissépticas podem modular a expressão de biofilmes bacterianos. Assim, percebe-se que a literatura é diversa e, em muitos casos, observa-se esforço direcionado ao entendimento da dinâmica entre as condições ambientais adversas e os padrões de colonização microbiana, que pode ter reflexo não só na sua biologia, mas também nas suas relações com seus hospedeiros (DONLAN, 2001; DICKSCHAT, 2010; WEINACHT et al., 2004; WOLCOTT et al., 2010)

Em relação à atividade hemolítica, 47,6% foram classificadas como hemolíticas. A capacidade de lise de eritrócitos e conseqüentemente morte das células eucarióticas está relacionada principalmente a α -hemolisina, uma exoproteína produzida por *S. aureus* (MENESTRINA, SERRA e PRÉVOST, 2001). Uma variedade de exotoxinas direcionadas ao metabolismo da célula hospedeira, sintetizada por *S. aureus*, tem potencial imediato de agressão. Dentre essas toxinas, a α -hemolisina é uma toxina formadora de poro com atividade citolítica, hemolítica e tóxica (DINGES et al., 2000). *S. aureus* também produz outras toxinas, incluindo diferentes β , γ e δ -hemolisinas e várias toxinas danificadoras de membrana que atuam em células-alvo rompendo as barreiras de permeabilidade celular através da formação de poros (GEMMELL e FORD, 2002; MENESTRINA, SERRA e PRÉVOST, 2001; VAN BELKUM, KOOLS-SIJMONS e VERBRUGH, 2002). A expressão desses fatores é regulada por mecanismos específicos que variam com a fase e condições de crescimento bacteriano (BRONNER et al., 2004). A combinação de vários fatores de virulência torna o *S. aureus* um microrganismo capaz de evadir-se do sistema imune do hospedeiro (FOSTER, 2005).

Embora não existam trabalhos para comparação com nosso estudo, um número expressivo de linhagens ORSA apresentaram atividade hemolítica, principalmente aquelas resistentes a um maior número de antimicrobianos, o que suscita reflexões sobre a sua associação com a resistência bacteriana.

O uso de antibióticos mudou a evolução natural das bactérias patogênicas, reduzindo as populações susceptíveis e aumentando populações resistentes. No entanto, a resistência está frequentemente associada com um custo de *fitness*, pois a carga genética necessária para a manutenção da resistência pode ser prejudicial em ambientes livres de

antibióticos. Neste caso, restrição do uso de antibióticos tem sido proposto, na tentativa de se erradicar bactérias resistentes. Contudo, a genética relacionada na aquisição de resistência, nos processos de recombinação de marcadores (plasmídios, transposons, integrons), pode estar relacionada a alterações globais nos padrões de virulência bacteriana favorecendo a seleção de linhagens cada vez mais resistentes e virulentas (BECEIRO, TOMÁS e BOU, 2013).

Tal como esperado, de acordo com dados da literatura considerando-se estudos brasileiros, neste estudo foi observada a predominância de amostras ORSA *SCCmec* tipo III nos hospitais (AMARAL et al., 2005; DE MIRANDA et al., 2007; VIVONI et al., 2006). Uma outra realidade é encontrada nos hospitais do EUA, Japão e Coréia, nos quais amostras carregando o *SCCmec* tipo II são mais prevalentes (KILIC et al., 2006; KO et al., 2005; MCDUGAL et al., 2003). Tradicionalmente, os *SCCmec* tipos II e III são cassetes que carregam diversos determinantes de resistência à outras classes de antimicrobianos e estão associados a amostras multirresistentes de origem hospitalar (ITO et al., 2001; ITO et al., 2003).

Em nosso estudo, a elevada resistência aos antimicrobianos observada em linhagens *SCCmec* III, tradicionalmente, bactérias com característica principal de multirresistência, é observada em outros estudos conduzidos no Brasil (OLIVEIRA et al., 2001; REINERT et al., 2005; VIVONI et al., 2006).

A baixa ocorrência de amostras portadoras do *SCCmec* II, identificada nesse estudo (12 amostras; 11,6%), com elevados índices de resistência a pelo menos cinco antimicrobianos se aproxima da realidade, em termos de susceptibilidade e não de ocorrência, observada no Japão, Coréia do Sul (KO et al., 2005) e Estados Unidos (HIDRON et al., 2005), onde amostras *SCCmec* tipo II multirresistentes são as mais encontradas no ambiente hospitalar. No Brasil este cassete, é pouco detectado, com taxas que vão de zero a 4% (LAMARO-CARDOSO et al., 2009; REINERT et al., 2005; SILVA-CARVALHO et al., 2009; TRINDADE et al., 2005; VIVONI et al., 2006), embora estudo recente revele a ocorrência de 16,9% entre amostras ORSA isoladas de um hospital público do Rio de Janeiro (CABOCLO et al., 2013). De certa forma, além de pouco encontradas, as amostras ORSA *SCCmec* II identificadas no Brasil tem apresentado resistência a poucas classes de antimicrobianos (SCHUENCK et al., 2009), o que difere um pouco do nosso estudo.

O cassette *mec* tipo IV é encontrado, principalmente entre amostras ORSA isoladas de indivíduos da comunidade, os quais não apresentam fatores de risco tradicionais, como hospitalização prolongada, uso de drogas endovenosas ou imunossupressão (MOLLAGHAN et al., 2010; TAVARES et al., 2010). Essas amostras apresentam susceptibilidade a maior parte dos antimicrobianos, sendo resistentes, em geral, somente à eritromicina (MARTINEZ- SATTler, MASON e KAPLAN et al., 2007) e à clindamicina (LO et al., 2007; LU et al., 2005;). Padrão semelhante de susceptibilidade foi encontrado nas amostras do presente estudo, com o destaque também para altos níveis de resistência (>70%) para gentamicina, levofloxacina e tetraciclina.

Amostras carregando os SCC*mec* tipo IV foram inicialmente associadas a infecções de origem comunitária. No entanto, diversos estudos apontam a emergência de amostras SCC*mec* tipo IV em hospitais, inclusive no Brasil (GONZALEZ et al., 2006; SEYBOLD et al., 2006). Recentemente, um estudo conduzido por Caboclo e colaboradores (2013) analisando 99 amostras ORSA, oriundas de pacientes internados tanto em um hospital público, quanto privado do Rio de Janeiro, encontrou aproximadamente 23% de linhagens carregando SCC*mec* tipo IV. A emergência dessas linhagens nos hospitais, pode ser consequência da presença de genes de virulência, mais comuns em amostras oriundas da comunidade, e do tamanho reduzido do SCC*mec* tipo IV, o que permite que este, cresçam mais rápido do que amostras tipo III (GILLET et al., 2002; LAURENT et al., 2001).

Em nosso estudo duas amostras (1,9%) foram detectadas carregando o SCC*mec* tipo I. Amostras carregando o cassette *mec* tipo I foram prevalentes nas primeiras amostras ORSA isoladas na década de 60 e geralmente se apresentavam resistentes apenas aos β -lactâmicos (CRISOSTOMO et al., 2001), um pouco diferente do nosso estudo, no qual todas amostras apresentaram resistência a azitromicina, eritromicina, clindamicina, gentamicina e levofloxacina e uma linhagem ainda apresentou resistência ao cloranfenicol.

A técnica de PFGE agrupou as 45 amostras ORSA analisadas, provenientes de pacientes internados na UTI, em 20 genótipos (A ao T), distribuídos em 32 perfis de fragmentação.

As 30 amostras ORSA SCC*mec* III analisadas foram agrupadas em 12 genótipos e apresentaram 22 perfis de fragmentação diferentes. Todas as linhagens foram associadas ao Clone Epidêmico Brasileiro (CEB) do complexo clonal 8. Alguns estudos com amostras

SCC*mec* III isoladas no Brasil, revelaram taxas de 90% a 100% de amostras CEB/CC8 (LAMARO-CARDOSO et al., 2009; VIVONI et al., 2006).

Todos os 8 isolados que carregavam o SCC*mec* II foram relacionados à linhagem USA100/CC5. Os dois isolados que carregavam o SCC*mec* IV pertenciam a duas linhagens relacionadas ao USA400/CC1 e USA800/CC5. O isolado SCC*mec* I esteve associado à linhagem USA500/CC5 e outros quatro isolados de ORSA não relacionados a qualquer clonalidade já descrita.

Ao longo do tempo, houve uma variação na ocorrência de isolados de ORSA relacionadas às duas linhagens frequentes, CEB/CC8 e USA100/CC5. Houve um predomínio inicial do CEB até 2008, com a prevalência de 77% entre os isolados, seguido de propagação do USA100 que surgiu em 2007 e foram predominantes (60%) nos anos de 2009 e 2010. As linhagens USA400, USA500 e USA800 ocorreram de forma esporádica no ano de 2008.

Estudos brasileiros sobre a epidemiologia do ORSA, indicaram que um número de linhagens restritas a outros continentes estão surgindo em nossos hospitais (CABOCLO et al, 2013; SCHUENCK et al, 2012). No Brasil, Cavalcante e colaboradores. (2014) caracterizaram diferentes linhagens de ORSA da colonização nasal circulando dentro de um hospital de ensino. No entanto, para o nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que investigou as características moleculares de ORSA isolados de infecções em um UTI brasileiro.

Entre as amostras do UTI, com exceção de vancomicina e linezolida e sulfametoxazol/trimetoprim para o qual os isolados SCC*mec* tipo II foram principalmente sensíveis, altas taxas de resistência foram verificadas contra os antimicrobianos avaliados entre as linhagens predominantes. Este fato pode ser relacionado a presença de SCC*mec* tipos III e II que, em geral, carregam muitos genes de resistência e foram encontrados em 89% dos isolados do presente estudo. Estes perfis de resistência foram relacionados com as linhagens CEB/CC8 e USA100/CC5, respectivamente.

O CEB representa cerca de 90% dos isolados tipo III obtidos a partir de infecções (SCHUENCK et al, 2012; TEIXEIRA et al, 2012) e 77% entre os isolados obtidos de colonização nasal (CAVALCANTE et al, 2014.). No entanto, em relação aos isolados de UTI, os dados são raros. Alguns estudos revelaram percentuais de CEB variando de 83,9% (TEIXEIRA et al., 2012), 78% (OLIVEIRA et al., 2001), em infecções, mas estes isolados foram obtidos em avaliações globais de ORSA dentro de um hospital. De qualquer forma,

nossos resultados foram semelhantes aos encontrados por esses autores, uma vez que encontramos 66,7% de isolados CEB em UTI, linhagem esta, muito bem adaptada ao ambiente hospitalar, onde os antibióticos são frequentemente utilizados (DEUREMENTERBERG e STOBBERINGH, 2008).

Isolados de ORSA carreando SCC*mec* tipo II representaram 17,8% de isolados de UTI e embora a grande sensibilidade para sulfametoxazol/trimetoprim apresentaram perfis de multirresistência muito semelhante ao CEB. Todos os isolados do tipo II estavam associados ao USA100/CC5, uma linhagem muito encontrada em hospitais dos EUA (TENOVER et al., 2012), mas que está ocorrendo nos hospitais brasileiros (CABOCLO et al., 2013; SILVA-CARVALHO et al., 2009). Em 2007, isolados de ORSA carreando os SCC*mec* tipo II surgiram na UTI e foram predominantes (60%) em 2009 e 2010, substituindo o CEB, que foi mais frequente (77%) entre os anos de 2005 a 2008.

Embora a prevalência de isolados USA100/CC5/type II no Brasil ser muito baixa (CAVALCANTE et al., 2014; TEIXEIRA et al., 2012), um estudo realizado em um hospital público no Rio de Janeiro mostrou que entre isolados ORSA carreando o SCC*mec* II, 85% estava relacionados com esta linhagem (CABOCLO et al., 2013). É importante mencionar que a propagação desta linhagem pode ser facilitada pelas características da resistência à oxacilina uma vez que o seu cassete *mec* é menor do que o cassete do tipo III e, assim, pode favorecer um crescimento bacteriano mais rápido.

Ainda que houve a prevalência de linhagens CEB/ tipo III e USA100/tipo II, uma variedade de linhagens foram identificadas no presente estudo, incluindo dois isolados SCC*mec* tipo IV, cada uma relacionado com a linhagem USA400/CC1 e USA800/CC5, e um SCC*mec* tipo I, que foi associado a linhagem USA500/CC5. A grande diversidade genética encontrada entre os isolados de ORSA em pacientes internados na UTI pode ser explicada por uma alta rotatividade de pacientes que são transferidos para outras unidades hospitalares diferentes desta (CAVALCANTE et al., 2014).

A opção de tratamento depende da sensibilidade de cada amostra frente aos diversos antimicrobianos, além do local da infecção, da hipersensibilidade do paciente ao medicamento, entre outros fatores. Os antimicrobianos beta-lactâmicos possuem a maior eficácia para o tratamento, por exemplo, de infecções de corrente sanguíneas causadas por *S. aureus*. Assim, o aumento de amostras de ORSA representa um desafio para terapêutica (BOUCHER et al., 2010). Atualmente, a vancomicina e a teicoplanina são os únicos

glicopeptídeos disponíveis para uso humano no Brasil, sendo ambos de uso injetável e geralmente, primeira escolha para tratamento de infecções por ORSA (FINCH, 2006; STEVENS, 2006).

A oxazolidinona (linezolida) é utilizada clinicamente desde 2001 para, principalmente, tratamento de infecções pulmonares e de partes moles (BROWN-ELLIOTT et al., 2003). Amostras com resistência a esta droga já foram relatadas e há associação da utilização desta com quadros de trombocitopenia. Estudos comprovam que o uso de linezolida apresenta melhor prognóstico que o uso de vancomicina (VAN HAL e PATERSON, 2011).

A daptomicina é um lipopeptídeo cíclico empregado, entre outros, no tratamento de infecções de corrente sanguínea. Apresenta atividade contra a maioria dos patógenos Gram-positivos aeróbios, incluindo aqueles resistentes à vancomicina e linezolida, porém amostras resistentes já foram relatadas (CUBICIN, 2007).

Como resultado da diminuição da atenção à pesquisa antimicrobiana pelas companhias farmacêuticas, estamos nos aproximando de uma necessidade crítica de novos agentes para o tratamento de infecções bacterianas cada vez mais resistentes (BUSH e PUCCI, 2011).

Infelizmente, o desenvolvimento e a aprovação de comercialização de novos antibióticos não tem acompanhado o ritmo crescente da ameaça de bactérias resistentes à saúde pública, e os antibióticos já existentes estão perdendo sua eficácia mais rápido do que podem ser substituídos (GWYNN et al, 2010). Neste sentido, a necessidade de descoberta e desenvolvimento de novas drogas antibacterianas é conhecida, e esforços tem produzido candidatos promissores (ARMSTRONG e MILLER, 2010).

Neste estudo foi avaliada a susceptibilidade de 21 linhagens de ORSA, escolhidas ao acaso e de forma aleatória, frente a 5 amins aromáticas alquiladas (substâncias anfífilas inéditas derivadas do Tris) previamente sintetizadas por Almeida e colaboradores (2013). Assim nossos resultados revelaram a atividade de 4 amins contra todas as amostras ORSA, se comparado a droga controle que foi o cloranfenicol, com destaque, em particular, para os compostos 24e e 24f que mostraram atividade antibacteriana *in vitro* mais potente, com CIM₉₀ = 8,0µg/mL.

De acordo com a literatura, apesar de novos agentes antimicrobianos não estarem mais sendo desenvolvidos na velocidade com que eram produzidos anteriormente, novas abordagens para o tratamento de doenças infecciosas ainda estão surgindo (BUSH e PUCCI,

2011). Desta forma, uma abordagem para novos agentes tem sido a de continuar a modificar as classes de antibióticos existentes previamente bem sucedidos. Novas fluoroquinolonas, aminoglicosídeos, tetraciclinas e β -lactâmicos estão atualmente em desenvolvimento para o tratamento de patógenos multi-resistentes. Além disso, as combinações de inibidores da β -lactamase com novos, e velhos, β -lactâmicos, estão sendo desenvolvidas para combater a atividade hidrolítica das novas β -lactamases (BUSH e PUCCI, 2011).

Neste contexto, embora não representado uma classe química já instituída na terapêutica de bactérias Gram positivas, os aminoálcoois figuram como uma classe de compostos orgânicos de considerável interesse na química medicinal. Estas substâncias apresentam poderoso potencial para a síntese de novos compostos bioativos, uma vez que desempenham papel importante em estruturas de fármacos conhecidos como o cloranfenicol (DE SOUZA, 2006).

Estudos anteriores evidenciaram a atividade antibacteriana de surfactantes derivados de ácidos graxos, carboidratos ou diaminas, demonstrando a importância da cadeia lipofílica, aliada a uma porção amina ou aminoálcool, para a manutenção da atividade antibacteriana (ALMEIDA et al., 2011; REIS, 2008).

6.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Staphylococcus aureus é um dos principais agentes etiológicos de infecções relacionadas à assistência à saúde e a colonização nasal pelo patógeno é considerada o maior fator de risco para o desenvolvimento destas infecções. Devido ao aumento nas taxas de resistência aos antimicrobianos, em especial à oxacilina, fármaco de escolha para o tratamento de infecções causadas por *S. aureus*, esta situação tem se tornado cada vez mais preocupante. A resistência a oxacilina confere resistência não apenas a penicilinas semi-sintéticas como também pode conferir a todos os antibióticos da classe dos β -lactâmicos, incluindo cefalosporinas e carbapenemas, o que torna a terapêutica para o tratamento de infecções causadas por *Staphylococcus aureus* resistente a oxacilina (ORSA) bastante dificultada.

Uma forma de disseminação dessa resistência é através de clones epidêmicos que são conhecidos por sua facilidade de transmissão, longa persistência, rápida disseminação intra e inter-hospitalar e facilidade de cruzar barreiras geográficas.

Nossos resultados apontam reflexões acerca da participação de linhagens de *Staphylococcus aureus* como agente de infecções em um hospital de ensino, terciário, apresentando altos níveis de resistência aos antimicrobianos disponíveis para a terapêutica dessas infecções, associado a fatores de virulência, que tende a relacionar-se com o caráter de multirresistência. Ressalta-se ainda, essa participação principalmente em áreas críticas do hospital, como a unidade de terapia intensiva, na qual se encontram pacientes em estado grave e imunocomprometidos.

Assim, estudos futuros são necessários para melhor caracterização dessa espécie bacteriana e sua origem, que suscitem estratégias para tratamento e contenção da disseminação das infecções associadas.

7 CONCLUSÕES

- A maioria das amostras de ORSA foram isoladas de indivíduos do sexo masculino, a partir de sangue e secreção traqueal, associadas principalmente a infecções do sistema respiratório e de corrente sanguínea, em unidade de terapia intensiva, em que embora a grande maioria obtivesse alta hospitalar, um número expressivo de pacientes foi a óbito;
- No geral, uma alta frequência de resistência foi observada contra a ciprofloxacina, clindamicina, eritromicina, amicacina, gentamicina, sulfametoxazol-trimetoprim, tetraciclina e cloranfenicol;
- As aminas aromáticas alquiladas apresentaram atividade antibacteriana contra a maioria dos isolados de ORSA, principalmente as aminas 24e e 24f com resultados expressivos, principalmente em relação ao cloranfenicol que foi a droga usada como controle;
- A grande maioria das linhagens ORSA foram produtoras de biofilme e não hemolíticas;
- Observou que tanto a capacidade de produção de biofilme como a atividade hemolítica está relacionada com o caráter de multirresistência principalmente quando esta, é simultânea a 6, 7, 8 e 9 drogas;
- Foram encontrados *SCCmec* dos tipos I (2 amostras/1,9%), II (12 amostras/11,6%), III (73/70,9%) e IV (8/7,8%). Oito amostras (7,8%) não foram tipadas;
- A maioria (66,7%) dos isolados foram relacionados com o CEB/CC8/*SCCmec* III, que prevaleceu entre 2005 e 2008, enquanto que a linhagem USA100/CC5/*SCCmec* II surgiu em 2007 e foi mais frequente em 2009 e 2010, na UTI;
- Este estudo mostrou a linhagem BEC/CC8/*SCCmec* III como a principal causa de infecções por MRSA em UTI associado ao surgimento de isolados USA100/CC5 que podem estar substituindo o CEB nesta unidade hospitalar.

REFERÊNCIAS

- AIRES DE SOUZA, M.; DE LENCASTRE, H.; SANTOS, S.; KIKUCHI, I.; TOTSUKA, K.; TOMASZ, A. Similarity of antibiotic resistance patterns and molecular typing properties of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates widely spread in hospitals in New York City and in a hospital in Tokio, Japan. **Microbiol Drug Resist**, 6, 253-258, 2000.
- AIRES DE SOUZA, M.; MIRAGAIA, M.; SANCHES, I. S.; AVILA, S.; ADAMNSON, I.; CASAGRANDE, S. T.; BRANDILEONE, M. C.; PALACIO, R.; DELL'ACQUA, L.; HORTAL, M.; CAMOU, M.; ROSSI, A.; VELAZQUEZ-MEZA, M. E.; ECHANIZ-AVILES, G.; SOLORZANOSANTOS, F.; HEITMANN, I.; De LENCASTRE, H. Three-year assessment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America from 1996 to 1998. **J Clin Microbiol**, 39, 2197-2205, 2001.
- ALANIS, A.J. Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? **Arch. Med. Research**, 36, 697-705, 2005.
- ALCARÁZ, L. E.; SATORRES, S.E.; LUCERO R.M.; CENTORBI, O.N.P. Species identification, slime production and oxacillin susceptibility in coagulase-negative staphylococci isolated from nosocomial specimens. **Braz. J. Microbiol.**, v.34, n.1, p. 45-51, 2003.
- ALMEIDA A.M.; NASCIMENTO T.; FERREIRA, B.S.; CASTRO, P.P.; SILVA, V.L.; DINIZ, C.G.; LE HYARIC, M. Synthesis and antimicrobial activity of novel amphiphilic aromatic amino alcohols. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** 23, 2883-2887, 2013.
- ALMEIDA, C. G.; REIS, S. G.; ALMEIDA, A. M.; DINIZ, C. G.; DA SILVA, V. L.; LE HYARIC, M. Synthesis and antibacterial activity of aromatic and heteroaromatic amino alcohols. **Chem Biol Drug Des**, 78, 876-880, 2011.
- ALVIANO, W. S.; ALVIANO, D. S.; DINIZ, C. G.; ANTONIOLLI, A. R.; ALVIANO, C. S.; FARIAS, L. M.; CARVALHO, M. A. R.; SOUZA, M. M. G.; BOLOGNESE, A. M.. In vitro antioxidant potential of medicinal plant extracts and their activities against oral bacteria based on Brazilian folk medicine. **Arch. Oral Biol.**, 53, 6, 545-552, 2008.
- AMARAL, M.M., COELHO, L.R., FLORES, R.P., SOUZA, R.R., SILVA-CARVALHO, M.C., TEIXEIRA, L.A., FERREIRA-CARVALHO, B.T., FIGUEIREDO, A.M.S. The predominant variant of the Brazilian epidemic clonal complex of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* has an enhanced ability to produce biofilm and to adhere to and invade airway epithelial cells. **J. Infect. Dis.** 192: 801-810, 2005.
- AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY - Antimicrobial Resistance an Ecological Perspective. **Report From the American Academy of Microbiology**. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 2000.

BRASIL. Portaria nº 2.616/MS/GM, de 12 de maio de 1998. 12 mai. 1998. Disponível em: <<http://elegis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=482>> Acesso em: 18 ago. 2012.

BRONNER, S.; MONTEIL, H.; PRÉVOST, G. Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*: complexity and applications. **FEMS Microbiol. Rev.**28, p. 183-200, 2004.

BROWN-ELLIOTT, B.A.; CRIST, C.J.; MANN, L.B.; WILSON, R.W.; WALLACE, R.J.JR. In vitro aUTivity of linezolid against slowly growing nontuberculous *Mycobacteria*. **Antimicrob. Agents Chemother.** 47(5), 1736-1738, 2003.

BURTON, D.C.; EDWARDS, J.R.; HORAN, T.C.; JERNIGAN, J.A.; FRIDKIN, S.K. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* central line-associated bloodstream infections in US intensive care units, 1997-2007. **JAMA**, 301(7), 727-736, 2009.

BUSH, K. Improving known classes of antibiotics: an optimistic approach for the future. **Curr. Op. Pharm.** 12, 527 – 534, 2012.

BUSH, K.; PUCCI, M. J. New antimicrobial agents on the horizon. **Bioch.Pharm.** 82, 1528 – 1539, 2011.

CABOCLO, R.M.; CAVALCANTE, F.S.; IORIO, N.L.; SCHUENCK, R.P.; OLENDZKI, A.N.; FELIX, M.J.; CHAMON, R.C.; DOS SANTOS, K.R. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Rio de Janeiro hospitals: dissemination of the USA400/ST1 and USA800/ST5 SCCmec type IV and USA100/ST5 SCCmec type II lineages in a public institution and polyclonal presence in a private one. **Am J Infect Control.** 41(3):e21-6, 2013.

CAIERÃO, J.; MUSSKOPF, M.; SUPERTI, S.; ROESCH, E.; DIAS, C.G.; d'AZEVEDO, P.A. Evaluation of phenotypic methods for methicillin resistance characterization in coagulase-negative staphylococci (CNS). **J. Med. Microbiol.**, v.53, p.1195-1199, 2004.

CAMÍ, M.T.G.; GARCIA, I.J.; AYALA, M.U. Infección nosocomial en postoperados de cirugía cardíaca. **An Pediatr (Barc)**, 69(1), 34-8, 2008.

CARMO, L.S. **Produção e purificação em grande escala das enterotoxinas estafilocócicas SEA, SEB, SEC2, SED e TSST-1 para uso em ensaios imuno-enzimáticos.** 254f. Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001.

CARVALHO, C.E.; BEREZIN, E.N.; PISTELLI, I.P.; MÍMICA, L.; CARDOSO, M.R.A. Monitoramento microbiológico sequencial da secreção traqueal em pacientes intubados internados em unidade de terapia intensiva pediátrica. **J. Pediatr.**, v.81, n.1, p.384-404, 2005.

CARVALHO, M.C.S.; MAMIZUKA, E.M.; GONTIJO FILHO, P. Methicillin/Oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a hospital and public health threat in Brazil. **Braz. J. Infect. Dis.** 14(1), 71-76, 2010.

CASEY, A.L., LAMBERT, P.A., ELLIOT, T.S.J. Staphylococci. **Int. J. Antimicrob. Agents.**, v.29 (suppl.3), p.23-32, 2007.

CASSETTARI, V.C.; STRABELLI, T.; MEDEIROS, E.A.S. Staphylococcus aureus bacteremia: what is the impact of oxacillin resistance on mortality? **Braz. J. Infec. Dis.**, v.9, n.1, p.70-76, 2005.

CAVALCANTI, S.; FRANÇA, E.R.; CABRAL, C.; VILELA, M.A.; MONTENEGRO, F.; MENEZES, D.; MEDEIROS, A.C.R. Prevalence of *Staphylococcus aureus* introduced into intensive care units of a university hospital. **Braz. J. Infec. Dis.**, v.9, n.1, p.56-63, 2005.

CAVALCANTE, F.S; SCHUENCK, R.P.; FERREIRA, D.C.; COSTA, C.R.; NOUÉR, S.A.; SANTOS, K.R.N. Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*: spread of specific lineages among patients in different wards at a Brazilian teaching hospital. **J Hosp Infect** 86:151-154, 2014.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin - United States. **Morb. Mortal. Wkly. Rep.**, v.51, n.26, p.565-567, 2002.

CEZÁRIO, R.C.; MORAIS, L.D.; FERREIRA, J.C.; COSTA-PINTO, R.M.; DARINI, A.L.C.; GONTIJO-FILHO, P.P. Nosocomial outbreak by imipenem-resistant metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in an adult intensive care unit in a Brazilian teaching hospital. **Enferm Infec Microbiol Clin.** 27(5), 269–274, 2009.

CHAIEB, K.; ZMANTAR, T.; CHEHAB, O.; BOUCHAMI, O.; HASEN, A.B.; MAHDOUANI, K.; BAKHROUF, A. Antibiotic resistance genes detected by multiplex PCR assays in *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from dialysis fluid and needles in a dialysis service. **Jpn. J. Infec. Dis.**, v.60, n.4, p.183-187, 2007.

CHAMBERS, H.F. Detection of methicillin-resistant staphylococci. **Infect. Dis. Clin. North. Am.**, v.7, n.2, p.425-433, 1993.

CHAMBERS, H.F. The Changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? **Emerg.Infect. Dis.**, v.7, n.2, p.178-182, 2001.

CHAMBERS, H.F.; DELEO, F.R. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. **Nat Rev Microbiol.** 7(9),629-641, 2009.

CLANCY, M.J.; GRAEPLER, A.; BREESE, P.E.; PRICE, C.S.; BURMAN, W.J. Widespread emergence of methicillin resistance in community-acquired *Staphylococcus aureus* infections in Denver. **South Med J**, 98(11), 1069-1075, 2005.

CLARKE, S.R.; HARRIS, L.G.; RICHARDS, R.G.; FOSTER, S.J. Analysis of Ehb, a 1.1-megadalton cell wall-associated fibronectin-binding protein of *Staphylococcus aureus*. **Infect. Immun.**, v.70, n.12, p.6680-6687, 2002.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth Informational Supplement**. CLSI document M100-S17 [ISBN 1-56238-625-5]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2007.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth Informational Supplement**. CLSI document M100-S22 [1-56238-786-3 [Electronic]]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2012.

COATES, T.; BAX, R.; COATES, A. Nasal decolonization of *Staphylococcus aureus* with mupirocin: strengths, weaknesses and future prospects. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.64, n.1, p.9-15, 2009.

COCKFIELD, J.D.; PATHAK, S.; EDGEWORTH, J.D.; LINDSAY, J.A. Rapid determination of hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineages. **J Med Microbiol**, 56(Pt 5), 614-619, 2007.

COSTERTON, J. W., STWART, P. S.; GREENBERG, E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infection. **Science**. 284,1318-1322, 1999.

COOKE, F.J.; BROWN, N.M. Community-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* infections. **Br Med Bull**, 94, 215-227, 2010.

CORSO, A.; SANTOS SANCHES, I.; AIRES DE SOUSA, M.; ROSSI, A.; DE LENCASTRE, H. Spread of a methicillin-resistant and multiresistant epidemic clone of *Staphylococcus aureus* in Argentina. **Microb Drug Resist**, 4(4):277-288. 1998.

CORSO, A.; SOLOAGA, R.; FACCONI, D.; GAGETTI, P.; CORBELLA, S.; IGLESIAS, M.; GALAS, M. Improvement of a latex agglutination test for the evaluation of oxacillin resistance in coagulase-negative staphylococci. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v.50, n.3, p.223-225, 2004.

CRISOSTOMO, M. I.; WESTH, H.; TOMASZ A.; CHUNG, M.; OLIVEIRA, D. C.; DE LENCASTRE H. The evolution of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: similarity of genetics backgrounds in historically early methicillin-susceptible and – resistant isolates and contemporary epidemic clones. **Proc Natl Acad Sci**, 98, 9865- 9870, 2001.

CUBICIN. prescribing information. Lexington, MA: **Cubist Pharmaceuticals**, 2007.

DAVIS, J.S. Management of bone and joint infections due to *Staphylococcus aureus*. **Int. Med. J.**, v.35 (suppl.2), p.79-96, 2005.

DE MIRANDA, O.P.; SILVA-CARVALHO, M.C.; RIBEIRO, A.; PORTELA, F.; CORDEIRO, R.P.; CAETANO, N.; VIDAL, C.F.L.; FIGUEIREDO, A.M.S. Emergence in Brazil of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates carrying SCCmecIV that are related genetically to the USA800 clone. **Clin Microbiol Infect**, 13(12), 1165-1172, 2007.

- DEPLANO, A.; WITTE, W.; VAN LEEUWEN, W. J.; BRUN, Y.; STRUELENS, M. J. Clonal dissemination of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Belgium and neighboring countries. **Clin. Microbiol. Infect.** 6, 239-245, 2000.
- DE SOUZA, M.A.; SANCHES, I.S.; FERRO, M.L.; VAZ, M.J.; SARAIVA, Z.; TENDEIRO, T.; SERRA, J.; DE LENCASTRE, H. Intercontinental spread of a multidrug-resistant methicillin resistant *Staphylococcus aureus* clone. **J Clin Microbiol**, 36: 2590-2596, 1998.
- DE SOUZA M.V.N. Current Status and future prospects for new therapies for pulmonary tuberculosis. **Curr Opin Pulm Med**.12:167–171, 2006.
- DEURENBERG, R.H.; STOBBERINGH, E.E. The evolution of *Staphylococcus aureus*. **Infect Genet Evol**, 8(6), 747-763, 2008.
- DIEKEMA, D.J.; PFALLER, M.A.; SCHMITZ, F.J.; SMAYEVSKY, J.; BELL, J.; JONES, R.N.; BEACH, M. ; SENTRY GROUP. Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe and the Western Pacific Region for the SENTRY antimicrobial surveillance program, 1997-1999. **Clin. Infect. Dis.**, 31(Suppl. 2), 114-132, 2001.
- DING, J.G.; SUN, Q.F.; LI, K.C.; ZHENG, M.H.; MIAO, X.H.; NI, W.; HONG, L.; YANG, J.X.; RUAN, Z.W.; ZHOU, R.W.; ZHOU, H.J.; HE, W.F. Retrospective analysis of nosocomial infections in the intensive care unit of a tertiary hospital in China during 2003 and 2007. **BMC Infect. Dis.**, v.9, p.1-6, 2009.
- DINGES, M.M.; ORWIN, P. M.; SCHLIEVERT, P.M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.13, n.1, p.16-34, 2000.
- DICKSCHAT J. S. 2010. Quorum sensing and bacterial biofilms. **Nat. Prod. Rep.** 27: 343-69.
- DOMINGUEZ, M. A.; de LENCASTRE, H.; LINARES, J.; TOMAZS, A. Spread and maintenance of a dominant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clone during an outbreak of MRSA disease in a Spanish hospital. **J Clin Microbiol**, 32, 2081- 2087, 1994
- DONLAN, R.M. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. **Clin. Infect. Dis.**, v.33, n.8. p.1387-1392, 2001.
- DOWNER, R.; ROCHE, F.; PARK, P.W.; MECHAM, R.P.; FOSTER, T.J. The elastin binding-protein of *Staphylococcus aureus* (EbpS) is expressed at the cell surface as an integral membrane protein and not as a cell-wall associated protein. **J. Biol. Chem.**, v.277, n.1, p.243-250, 2002.
- DUFOUR, P.; GILLET, Y.; BES, M.; LINA, G.; VANDENESCH, F.; FLORET, D.; ETIENNE, J.; RICHEL, H. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in France: emergence of a single clone that produces Pantone-Valentine Leukocidin. **Clin. Infect. Dis.**, v.35, n.7, p.819-824, 2002.

EUROPEAN ANTIMICROBIAL RESISTANCE SURVEILLANCE SYSTEM (EARSS). 2005. Disponível em: < <http://www.rivm.nl/earss/database.html> > Acesso em: 08/03/2011.

EBER, M.R.; LAXMINARAYAN, R.; PERENCEVICH, E.N.; MALANI, A. Clinical and economic outcomes attributable to health care-associated sepsis and pneumonia. **Arch Intern Med**, 170(4):347-353, 2010.

EMANEINI, M.; ESLAMPOUR, M.A.; SEDAGHAT, H.; ALIGHOLI, M.; JABALAMENI, F.; SHAHSAVAN, S.; TAHERIKALANI, M. Characterization of phenotypic and genotypic inducible macrolide resistance in staphylococci in Tehran, Iran. **J. Chemother.**, v.21, n.5, p.595-597, 2009.

ENRIGHT, M.C., DAY, N.P.J., DAVIES, C.E., PEACOCK, S.J & SPRATT, B.G. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. **J Clin Microbiol**, 38(3), 1008-1015, 2000.

ENRIGHT, M.C.; ROBINSON, D.A.; RANDLE, G.; FEIL, E.J.; GRUNDMANN, H.; SPRATT, B.G. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Proc Natl Acad Sci USA**, 99(11), 7687-7692, 2002

ENTENZA, J.M.; FOSTER, T.J.; NI EIDHIN, D.; VAUDAUX, P.; FRANCIOLI, P.; MOREILLON, P. Contribution of clumping factor B to pathogenesis of experimental endocarditis due to *Staphylococcus aureus*. **Infect. Immun.**, v.68, n.9, p.5443-5446, 2000.

EUZÉBY, J. P. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature – Genus *Staphylococcus*. Disponível em: <http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html>. Acesso em: 28/02/2014.

FARR, B.M. Prevention and control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v.17, n.4, p.317-322, 2004.

FELTEN, A.; GRANDRY, B.; LAGRANGE, P.H.; CASIN, I. Evaluation of three techniques for detection of low-level methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a disk diffusion method with cefoxitin and moxalactam, the vitek 2 system, and the MRSA-screen latex agglutination test. **J. Clin. Microbiol.**, 40(8), 2766-2771, 2002.

FERREIRA, R.B.R.; IORIO, N.L.P.; MALVAR, K.L.; NUNES, A.P.F.; FONSECA, L.S.; BASTOS C.C.R.; SANTOS, K.R.N. 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.**, v.41, n.8, p. 3609-3614, 2003.

FLUIT, A.C., JONES, M.E., SCHMITZ, F.J., ACAR, J., GUPTA, R., VERHOEF, J. Antimicrobial susceptibility and frequency of occurrence of clinical blood isolates in Europe from the SENTRY antimicrobial surveillance program, 1997 and 1998. **Clin. Infect. Dis.** 30: 454-460, 2000.

FOGLIA, E.E.; FRASER, V.J.; ELWARD, A.M. Effect of nosocomial infections due to antibiotic-resistant organisms on length of stay and mortality in the pediatric intensive care unit. **Infect Control Hosp Epidemiol**, 28(3), 299-306, 2007.

FOSTER, T.J. Immune evasion by Staphylococci. **Nat. Rev.**, v.3, n.12, p.948-958, 2005.

FOUNIER, B.; PHILPOTT, D.J. Recognition of *Staphylococcus aureus* by the innate immune system. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.18, n.3, p.521-540, 2005.

FRAZEE, B.W.; SALZ, T.O.; LAMBERT, L.; PERDREAU-REMGTON, F. Fatal community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pneumonia in an immunocompetent young adult. **Ann. Emerg. Med.**, v.46, n.5, p.401-404, 2005.

GALES, A.C.; SADER, H.S.; RIBEIRO, J.; ZOCCOLI, C.; BARTH, A.; PIGNATARI, A.C. Antimicrobial susceptibility of gram-positive bacteria isolated in Brazilian hospitals participating in the SENTRY program (2005-2008). **Braz. J. Infect. Dis.**, v.13, n.2, p.90-98, 2009.

GEMMELL, C. G.; FORD, C. W. Virulence factor expression by gram-positive cocci exposed to subinhibitory concentrations of linezolid. **J. Antimicrob. Chemother.** 50, p. 665-672, 2002.

GILLET, Y.; ISSARTEL, B.; VANHEMS, P.; FOURNET, J.C.; LINA, G.; BES, M.; VANDENESCH, F.; PIÉMONT, Y., BROUSSE, N.; FLORET, D.; ETIENNE, J. Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Pantone-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. **Lancet**, 359(9308), 753-759, 2002.

GIRAFFA, G.; ROSSETTI, L.; NEVIANI, E. An evaluation of chelex-based DNA purification protocols for the typing of *laUTIc* acid bacteria. **J. Microbiol. Methods**, v.42, n.2, p.175-184, 2000.

GOMES, A. R.; SANCHES, I. S.; AIRES, D. S.; CASTANEDA, E.; DE LECANSTRE, H. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Colombian hospitals: dominance of a single unique multidrug resistant clone. **Microb Drug Resist**, 7, 23-32, 2001.

GÓMEZ-LUCÍA, E.; GOYACHE, J.; ORDEN, J. A.; BLANCO, J. L.; RUIZ-SANTA-QUITÉRIA, J. A.; DOMÍNGUEZ, L., SUÁREZ, G. Production of enterotoxin A by nonenterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains. **Appl. Environ. Microbiol.** v.55, n.6, p.1447-1451, 1989.

GORAK, E.J.; YAMADA, S.M.; BROWN, J.D. Community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in hospitalized adults and children without known risk factors. **Clin. Infect. Dis.**, v.29, n.4, p.797-800, 1999.

GRAVES, N.; WEINHOLD, D.; TONG, E.; BIRREL, F.; APP EPI, M.; DOIDGE, S.; DIP, G.; RAMRITU, P.; HALTON, K.; LAIRSON, D. & WHITBY, M. Effect of healthcare-acquired infection on length of hospital stay and cost. **Infect Control Hosp Epidemiol** 28 (3), 280-292, 2007.

GOSBELL, I.B. Diagnosis and management of catheter-related bloodstream infections due to *Staphylococcus aureus*. **Intern Med J**, 35 Suppl 2, S45-S62, 2005.

GUPTA, A.; AGRAWAL, A.; MEHROTRA, S.; SINGH, A.; MALIK, S.; KHANNA, A. Incidence, risk stratification, antibiogram of pathogens isolated and clinical outcome of ventilator associated pneumonia. **Indian J Crit Care**, 12(2), 96-101, 2011.

GWYNN, M. N.; PORTNOY, A.; RITTENHOUSE, S. F.; PAYNE, D. J. Challenges of antibacterial discovery revisited. **Annals New York Acad. Sci.** 1213, 5 - 19, 2010.

HANSELMAN, B. A.; KRUTH, S. A.; ROUSSEAU, J.; WEESE, J. S. Coagulase positive staphylococcal colonization of humans and their household pets. **Can. Vet. J.** 50(9), 954-958, 2009.

HARBARTH, S.; RUEF, C.; FRANCIOLI, P.; WIDMER, A.; PITTET, D. Nosocomial infections in Swiss university hospitals: a multi-centre survey and review of the published experience. Swiss-Noso Network. **Schweiz Med Wochenschr**, 129(42), 1521-1528, 1999.

HENRIQUES I.S.; FONSECA F.; ALVES, A.; SAAVEDRA, M.J., CORREIA, A. Occurrence and diversity of integrons and β -lactamase genes among ampicillin-resistant isolates from estuarine waters. **Res Microbiol.** 157, 938-47, 2006.

HEROLD, B.C.; IMMERGLUCK, L.C.; MARANAM, M.C.; LAUDERDALE, D.S.; GASKIN, R.E.; BOYLE-VAVRA, S.; LEITCH, C.D.; DAUM, R.S. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children with no identified predisposing risk. **JAMA**, v.279, n.8, p.593-598, 1998.

HIDRON, A.L.; KOURBATOVA, E.V.; HALVOSA, J.S.; TERRELL, B.J.; MCDUGAL, L.K.; TENOVER, F.C.; BLUMBERG, H.M.; KING, M.D. Risk factors for colonization with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in patients admitted to an urban hospital: emergence of community-associated MRSA nasal carriage. **Clin Infect Dis**, 41(2), 159-166, 2005.

HIGUCHI, W.; TAKANO, T.; TENG, L.; YAMAMOTO, T. Structure and specific detection of staphylococcal cassette chromosome mec type VII. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.377, n.3, p.752-756, 2008.

HIRAMATSU, K.; ARITAKA, N.; HNAKI, H.; KAWASAKI, S.; HOSODA, Y.; HORI, S.; FUKUCHI, Y.; KOBAYASHI, I. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. **Lancet**, 350(9052), 1670-1673, 1997

HIRAMATSU, K.; CUI, L.; KURODA, M.; ITO, T. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Trends Microbiol.**, v.9, n.10 p.486-493, 2001.

HOLMES, R.L., JORGENSEN, H. Inhibitory activities of 11 antimicrobial agents and bactericidal activities of vancomycin and daptomycin against invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates obtained from 1999 through 2006. **Antimicrob. Agents Chemother.** 52: 757-760, 2008.

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

HUBER, H.; ZIEGLER, D.; PFÜGER, V.; VOGEL, G.; ZWEIFEL, C.; STEPHAN, R. Prevalence and characteristics of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from livestock, chicken carcasses, bulk tank milk, minced meat, and contact persons. **BMC Vet Res**, 27, 7-6, 2011.

HUSSAIN, Z.; STOAKES, L.; JOHN, M. A.; GARROW, S.; FITZGERALD, V. Detection of methicillin resistance in primary blood culture isolates of coagulase-negative staphylococci by PCR, slide agglutination, disk diffusion, and a commercial method. **J. Clin. Microbiol.**, v.40, n.6, p.2251-2253, 2002.

HYNES, W.L.; WALTON, S.L. Hyaluronidases of Gram-positive bacteria. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.183, n.2, p.201-207, 2000.

ITO, T.; KATAYAMA, Y.; ASADA, K.; MORI, N.; TSUTSUMIMOTO, K.; TIENSATORN, C.; HIRAMATSU, K. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.45, n.5, p.1323-1336, 2001.

ITO, T.; OKUMA, K.; MA, X.X.; YUZAWA, H.; HIRAMATSU, K. Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. **Drug Resist. Updat.**, v.6, n.1, p.41-52, 2003.

ITO, T.; MA, X.X.; TAKEUCHI, F.; OKUMA, K.; YUZAWA, H.; HIRAMATSU, K. Novel type V staphylococcal cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccr*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.48, n.7, p.2637-2651, 2004.

IWG-SCC - INTERNATIONAL WORKING GROUP ON THE CLASSIFICATION OF STAPHYLOCOCCAL CASSETTE CHROMOSOME. Classification of staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*): Guidelines for reporting novel SCC*mec* elements. **Antimicrob Agents Chemother.** 53(12): 4961-67, 2013.

JARLOV, J. O. Phenotypic characteristics of coagulase-negative staphylococci: typing and antibiotic susceptibility. **Acta, Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.**, v.107 (suppl. 91), p.1-42, 1999.

JERASSY, Z.; YINNON, A.M.; MAZOUZ-COHEN, S.; BENENSON, S.; SCHLESINGER, Y.; RUDENSKY, B. & RAVEH, D. Prospective hospital-wide studies of 505 patients with nosocomial bacteraemia in 1997 and 2002. **J Hosp Infect** 62(2), 230-236, 2006.

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

KAASE, M.; LENGHA, S.; FRIEDRICH, S.; SZABADOS, F.; SAKINC, T.; KLEINE, B.; GATERMANN, S.G. Comparison of phenotypic methods for penicillinase detection in *Staphylococcus aureus*. **Clin. Microbiol. Infect.**, v.14, n.6, p.614-616, 2008.

KANEKO, J.; KAMIO, Y. Bacterial two-component and hetero-heptameric pore-forming cytolytic toxins: structure, pore-forming mechanism, and organization of the genes. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v.68, n.5, p.981-1003, 2004.

KASSIS, C.; RANGARAJ, G.; JIANG, Y.; HACHEM, R.Y.; RAAD, I. Differentiating coagulase-negative staphylococcal bacteremia from those representing contamination using time to positivity and quantitative blood cultures methods. **J Clin Microbiol**, 47(10), 3255-3260, 2009.

KATAYAMA, Y.; ITO T.; HIRAMATSU, K. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.44, n.6, p.1549-1555, 2000.

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

KLEVENS, R.M.; EDWARDS, J.R.; RICHARDS, C.L.; HORAN, T.C.; GAYNES, R.P.; POLLOCK, D.A. & CARDO, D.M. Estimating health care-associated infections and deaths in U.S. hospitals, 2002. **Public Health Rep**, 122(2), 160-166, 2007.

KLOOS, W.E.; BANNERMAN, T.L. *Staphylococcus and Micrococcus*. In: Manual of Clinical Microbiology – 7th edition. 264-282. Edited by: Murray, P.R. ; Baron, E.J.; Tenover, F.C. & Tenover, F.C. & Tenover, R.H. Washington – DC, ASM Press, USA, 1999.

KLUYTMANS, J.; VAN BELKUM, A.; VERBRUGH, H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.10, n.3, p.505-520, 1997.

KO, K.S.; LEE, J.Y.; SUH, J.Y.; OH, W.S.; PECK, K.R.; LEE, N.Y.; SONG, J.H. Distribution of major genotypes among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Asian countries. **J Clin Microbiol**, 43(1), 421-426, 2005.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHERECKENBERGER, P.C.; WINN JR, W.C.; PROCOP, G.W.; WOODS, G.L. **Diagnóstico Microbiológico**. 6ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KREISWIRTH, B.; KORNBLUM, J.; ARBEIT, R.D.; EISNER, W.; MASLOW, J.N.; MCGEER, A.; LOW, D.E.; NOVICK, R.P., Evidence for a clonal origin of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Science**, 259, 227–230, 1993.

LAMARO-CARDOSO, J.; DE LENCASTRE, H.; KIPNIS, A.; PIMENTA, F.C.; OLIVEIRA, L.S.C.; OLIVEIRA, R.M.; NOUÉR, S.S.; AIRES DE SOUSA, M.; MILHEIRIÇO, C.; ANDRADE, A.L.S. Molecular Epidemiology and Risk Factors for Nasal Carriage of *Staphylococcus aureus* and Methicillin-Resistant *S. aureus* in Infants Attending Day Care Centers in Brazil. **J Clin Microbiol**, 47(12), 3991-3997, 2009

LAMBRIS, J.D.; RICKLIN, D.; GEISBRECHT, B.V. Complement evasion by human pathogens. **Nat Rev Microbiol**, 6(2), 132-142, 2008.

LARSEN, K.W.; JACOBSEN, T.; BERGH, K.; TVETE, P.; KVELLO, E.; SCHEEL, O. Outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in two nursing homes in Central Norway. **J Hosp Infect**, 60, 312-316, 2005.

LAURENT, F., LELIÈVRE, H., CORNU, M., VANDENESCH, F., CARRET, G. ETIENNE, J.; FLANDROIS, J.P. Fitness and competitive growth advantage of new gentamicin susceptible MRSA clones spreading in French hospitals. **J Antimicrob Chemother**, 47(3), 277-283, 2001.

LENCASTRE, H.A resistência aos antibióticos na década de 1990. **Dimensão** 6, n.23, p.75-90, 2001.

LESKI, T.; OLIVEIRA, D.; TRZCINSKI, K.; SANTOS SANCHES, I.; AIRES DE SOUSA, M.; HRYNIEWICZ, W.; DE LENCASTRE, H. Clonal distribution of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Poland. **J Clin Microbiol**, 36(12), 3532-3539, 1998.

LEVY, S.B. The challenge of antibiotic resistance. **Scientific American**, v.278, n.3, p.32-39, 1998.

LI, S.; SKOV, R.L.; HAN, X.; LARSEN, A.R.; LARSEN, J.; SØRUM, M.; WULF, M.; VOSS, A.; HIRAMATSU, K.; ITO, T. Novel types of staphylococcal cassette chromosome *mec* elements identified in clonal complex 398 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. **Antimicrob Agents Chemother**, 55(6), 3046-3050, 2011.

LIVERMORE, D.M. Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. **Clin. Infect. Dis.**, v.36 (suppl.1), p.11-23, 2003.

LO, W.T.; LIN, W.J.; TSENG, M.H.; LU, J.J.; LEE, S.Y.; CHU, M.L.; WANG, C.C. Nasal carriage of a single clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among kindergarten attendees in northern Taiwan. **BMC Infect Dis**, 51:7, 2007.

LOIR, Y.L.; BARON, F.; GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. **Genet. Mol. Res.**, v.2, n.1, p.63-76, 2003.

LOUIE, L.; MAJURY, A.; GOODFELLOW, J.; LOUIE, M.; SIMOR, A.E. Evaluation of a latex agglutination test (MRSA-screen) for detection of oxacillin resistance in coagulase-negative staphylococci. **J. Clin. Microbiol.**, v.39, n.11, p.4149-4151, 2001.

LOWDER, B.V.; FITZGERALD, J.R. Human origin for avian pathogenic *Staphylococcus aureus*. **Virulence**, 1(4), 283-284, 2010.

LOWY, F.D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. **J. Clin. Invest.**, v.111, n.9, p.1265-1273, 2003.

LOWY, F.D. Medical Progress: *Staphylococcus aureus* infections. **N. Engl. J. Med.**, v. 339, n.8, p.520-532, 1998.

LU, P.L.; CHIN, L.C.; PENG, C.F.; CHIANG, Y.H.; CHEN, T.P.; MA, L.; SIU, L.K. Risk factors and molecular analysis of community methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage. **J Clin Microbiol**, 43(1), 132-139, 2005

MACHADO, G.P.M. Aspectos epidemiológicos das infecções hospitalares. In: **Manual de Infecção Hospitalar**, MARTINS, M.A. (ed), 2ª ed. MEDSi. Rio de Janeiro, Brasil. p. 27-31, 2001.

MACHADO, A. Resistência bacteriana: novas opções terapêuticas. **Prática Hospitalar**, n.46, p.210-212, 2006.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de BROCK**. 10ª ed. Prentice Hall, São Paulo. 608p, 2004.

MARANAN, M.C.; MOREIRA, B., BOYLE-VAVRA, S., DAUM, R.S. Antimicrobial resistance in *Staphylococci*: epidemiology, molecular mechanisms and clinical relevance. **Infect. Dis. Clinics. North. Am.**, v.11, n.4, p.813-841, 1997.

MARCEL, J.P.; ALFA, M.; BAQUERO, F.; ETIENNE, J.; GOOSSENS, H.; HARBARTH, S.; HRYNIEWICZ, W.; JARVIS, W.; KAKU, M.; LECLERCQ, R.; LEVY, S.; MAZEL, D.; NERCELLES, P.; PERL, T.; PITTET, D.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C.; WOODFORD, N.; JARLIER, V. Healthcare-associated infections: think globally, act locally. **Clin Microbiol Infect**, 14(10), 895–907, 2008.

MARTINEAU, F.; PICARD, F.J.; LANSAC, N.; MÉNARD, C.; ROY, P.H.; OULLETTE, M.; BERGERON, M.G. Correlation between the resistance genotype determined by multiplex PCR assays and the antibiotic susceptibility patterns of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. **Antimicrobial Agents and Chemother.**, v.44, n.2, p.231-238, 2000.

MARTINEZ-AGUÍLAR, G.; HAMMERMAN, W.A.; MASON JR., E.O.; KAPLAN, S.L. Clindamycin treatment of invasive infections caused by community-acquired, methicillin-

resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in children. **Pediatr Infect Dis, J.**, 22(7), 593-598, 2003.

MARTINS, M.A. Aspectos gerais das infecções hospitalares. In: **Manual de Infecção Hospitalar**, MARTINS, M.A. (ed), 2ª ed. MEDSi. Rio de Janeiro, Brasil. p. 3-10, 2001.

MARTINS, A.; CUNHA, M.L.R.S. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci: epidemiological and molecular aspects. **Microbiol. Immunol.**, v.51, n.9, p.787-795, 2007.

MATO, R.; SANTOS, S.; VENDITII, M.; PLATT, D. J.; CHUNG, M.; DE LENCASTRE, H. Spread of the multiresistant Iberian clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) to Italy and Scotland. **Microbial Drug Resist**, 4, 107-112, 1998.

MCDUGAL, L.K.; STEWARD, C.D.; KILLGORE, G.E.; CHAITRAM, J.M.; MCALLISTER, S.K.; TENOVER, F.C. Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database. **J Clin Microbiol**, 41, 5113-5120, 2003.

MENESTRINA, G.; SERRA, M.D.; PRÉVOST, G. Mode of aUTion of β -barrel pore-forming toxins of the staphylococcal α -toxin family. **Toxicon.**, v.39, n.11, p.1661-1672, 2001.

MILHEIRIÇO, C.; OLIVEIRA, D.C.; DE LENCASTRE, H. Update do the multiplex PCR strategy for assignment for *mec* element in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob Agents Chemother.**, 51(9), 3374-3377, 2007.

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, 2007.

MIREYA, U.A.; MARTÍ, P.O.; XAVIER, K.V.; CRISTINA, L.O., MIGUEL, M.M.; MAGDA, C.M. Nosocomial infections in pediatric and neonatal intensive care units. **J Infect**, 54(3), 212-220, 2007.

MOELLERING, R. C. J. Discovering new antimicrobial agents. **Int. J. Antimicrob. Agents**. . 37, 2 -9, 2011.

MOLLAGHAN, A.M.; LUCEY, B.; COFFEY, A.; COTTER, L. Emergence of MRSA clone ST22 in healthy young adults in the community in the absence of risk factors. **Epidemiol Infect**, 138, 673-676, 2010.

MONECKE, S.; COOMBS, G.; SHORE, A.C.; COLEMAN, D.C.; AKPAKA, AP.; BORG, M.; CHOW, H.; IP, M.; JATZWALK, L.; JONAS, D.; KADLEC, K.; KEARNS, A.; LAURENT, F.; O'BRIEN, F.G.; PEARSON, J.; RUPPELT, A.; SCHWARZ, S.; SCICLUNA, E.; SLICKERS, P.; TAN, H.L.; WEBER, S.; EHRLICH, R. A field guide to pandemic, epidemic and sporadic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **PLoS One**, 6(4), e17936, 2011.

MONECKE, S.; MÜLLER, E.; BUECHLER, J.; REJMAN, J.; STIEBER, B.; AKPAKA, P.E.; BANDT, D.; BURRIS, R.; COOMBS, G.; HIDALGO-ARROYO, G.A.; HUGHES, P.; KEARNS, A.; ABÓS, S.M.; PICHON, B.; SKAKNI, L.; SÖDERQUIST, B.; EHRICHT, R. Rapid detection of Pantone-Valentine leukocidin in *Staphylococcus aureus* cultures by use of a lateral flow assay based on monoclonal antibodies. **J Clin Microbiol**, 51(2):487-495, 2013

MOON, A. H.; KAMBLE, V. A. Comparative studies on: Drug resistance patterns of common clinical bacterial isolates against essential oils and commercial antibiotics. **Asiatic J. Biotech. Res.** 03 (10), 1447-1454, 2012.

MUSSER, J.M.; KAPUR, V. Clonal analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from intercontinental sources: association of the mec gene with divergent phylogenetic lineages implies dissemination by horizontal transfer and recombination. **J Clin Microbiol**, 30, 2058-2063, 1992

MUTO, C.A., JERNIGAN, J.A., OSTROWSKY, B.E., RICHEL, H.M., JARVIS, W.R., BOYCE, J.M., FARR, B.M. SHEA Guideline for preventing nosocomial transmission of multidrug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus*. **Infect. Control. Hosp. Epidemiol.**, v.24, n.5, p.362-386, 2003.

NAIMI, T.S.; LEDELL, K.H.; BOXRUD, D.J.; GROOM, A.V.; STEWARD, C.D.; JOHNSON, .K.; BESSER, J.M.; O'BOYLE, C.; DANILA, R.N.; CHEEK, J.E.; OSTERHOLM, K.A.; MOORE, M.T.; SMITH, K.E. Epidemiology and clonality of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Minnesota, 1996–1998. **Clin Infect Dis**, 33(7), 990-996, 2001

NATIONAL NOSOCOMIAL INFECTIONS SURVEILLANCE (NNIS) SYSTEM REPORT. Data summary from January 1992 through June 2004. **Am. J. Infect. Control.**, v.32, n.8, p.470-485, 2004.

NAVARRE, W.W.; SCHNEEWIND, O. Surface proteins of Gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v.63, n.1, p.174-229, 1999.

NIMMO, G.R.; COOMBS, G.W.; PEARSON, J.C.; O'BRIEN, F.G.; CHRISTIANSEN, K.J.; TURNIDGE, J.D.; GOSBELL, I.B.; COLLIGNON, P.; MCLAWS, M.L. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the Australian community: an evolving epidemic. **Med J Aust**, 184(8), 384-388, 2006.

OLIVEIRA, A.C.; LIMA, E.D.R.P.; LIMA, A.P. Post-discharge surgical site infection surveillance in a hospital in Brazil. **Am J Surg** 193(2), 266-268, 2007.

OLIVEIRA A.C. Infecções Hospitalares: repensando a importância da higienização das mãos no contexto da multirresistência. **Rev. Min. Enf.** 7(20), 140-4, 2003.

OLIVEIRA, D.C.; TOMASZ, A.; DE LENCASTRE, H. Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Lancet Infect. Dis.**, v.2, n.3, p.180-189, 2002

OLIVEIRA, D.C.; MILHEIRIÇO, C.; DE LENCASTRE, H. Redefining a structural variant of staphylococcal cassette chromosome *mec*, SCC*mec* type VI. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.50, n.10, p.3457-3459, 2006.

OLIVEIRA, G.A.; DELL'AQUILA, A.M.; MASIERO, R.L.; LEVY, C.E.; GOMES, M.S.; CUI, L.; HIRAMATSU, K.; MAMIZUCA, E.M. Isolation in Brazil of nosocomial *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin. **Infect Control Hosp Epidemiol**, 22(7), 443-448, 2001.

ONCUL, O.; ULKUR, A.A.; TURHAN, V.; YENIZ, E. KARACAER, Z.; YILDIZ, F. Prospective analysis of nosocomial infections in a Burn Care Unit, Turkey. **Indian J Med Res**, 130 (6), 758-764, 2009.

ORWIN, P. M.; LEUNG, D. Y. M.; DONAHUE, H. L.; NOVICK, R. P.; SCHLIEVERT, P. M. Biochemical and biological properties of staphylococcal enterotoxin K. **Infect. Immun.**, v.69, n.1 p.360-366, 2001.

PAPAKYRIACOU, H.; VAZ, D.; SIMOR, A.; LOUIE, M.; MCGAVIN, M.J. Molecular analysis of the accessory gene regulator (*agr*) locus and balance of virulence factor expression in epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **J Infect Dis**, 181, 990-1000, 2000

PARKINS, M.D.; GREGSON, D.B.; PITOUT, J.D.D.; ROSS, T.; LAUPLAND, K.B. Population-based study of the epidemiology and the risk factors for *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infection. **Infection**, 38(1), 25-32, 2010.

PATTI, J.M.; BREMELL, T.; KRAJEWSKA-PIETRASIK, D.; ABDELNOUR, A.; TARKOWSKI, A.; RYDÉN, C., HÖÖK, M. The *Staphylococcus aureus* collagen adhesin is a virulence determinant in experimental septic arthritis. **Infect. Immun.**, v.62, n.1, p.152-161, 1994.

PEACOCK, S. J. *Staphylococcus*. In: **Topley & Wilson's Microbiology & Microbial Infections**, Boviello, S.P.; Murray, P.R. & Funke G. (eds), 10th ed, vol.2. ASM Press. Washington, DC. USA. p.772-831, 2005.

PEREIRA, E.M.; SCHUENCK, R.P.; NOUÉR, S.A.; SANTOS, K.R. Methicillin-resistant *Staphylococcus lugdunensis* carrying SCC*mec* type V misidentified as MRSA. **Braz J Infect Dis**. 15:293-5, 2011.

PESSOA-SILVA, C.L.; RICHTMANN, R.; CALIL, R.; SANTOS, R.M.R.; COSTA, M.L.M.; FROTA, A.C.C.; WEY, S.B. Healthcare-associated infections among neonates in Brazil. **Infect Control Hosp**, 25(9), 772-777, 2004

PITTET, D.; ALLEGRANZI, B.; STORR, J.; BAGHERI-NEJAD, S.; DZIEKAN, G.; LEOTSAKOS, A.; DONALDSON, L. Infection control as a major World Health Organization priority for developing countries. **J Hosp Infect**, 68 (4), 285-292, 2008.

PITTET, D.; MCGUCKIN M. Evaluation of a patient-empowering hand hygiene programme in the U.K. **J. Hosp Infect** 48, 222-227, 2001.

PITTET, D., HARBARTH, S., RUEF, C., FRANCIOLI, P., SUDRE, P., PÉTIGNAT, C., TRAMPUZ, A., WIDMER, A. Prevalence and risk factors for nosocomial infections in four university hospitals in Switzerland. **Infect. Control. Hosp. Epidemiol.**, v.20, n.1, p. 37-42, 1999.

RAPINI, L.S.; TEIXEIRA, J.P.; MARTINS, N. E.; CERQUEIRA, M.M.O.P.; SOUZA, M.R.; PENNA, C.F.A.M. Perfil de resistência antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus* sp. isoladas de queijo tipo coalho. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.**, v.56, n.1, p.130-133, 2004.

REINERT, C. ; MCCULLOCH, J.A. ; WATANABE, S. ; ITO, T. ; HIRAMATSU, K.; MAMIZUKA. Type IV SCC_{mec} found in decade old Brazilian MRSA isolates. **Braz J Infect Dis**, 12(3), 213-216, 2005.

REIS, R. C. N.; ODA, S. C.; DE ALMEIDA, M. V.; LOURENÇO, M. C. S.; VICENTE, F. R. C.; BARBOSA, N. R., TREVIZANI, R.; SANTOS, P.L.C.; LE HYARIC, M. Synthesis and Antimicrobial Activity of Amphiphilic Carbohydrate Derivatives. **J. Braz. Chem. Soc.** 19, 6,1065-1072, 2008.

RHODEN, D. L; MILLER, M. Four-year prospective study of STAPH-IDENT system and conventional method for reference identification of *Staphylococcus*, *Stomatococcus* and *Micrococcus* spp. **J. Clin. Microbiol.**, v.33, n.1, p.96-98, 1995.

RIBEIRO, A.; CORONADO, A.Z.; SILVA-CARVALHO, M.C.; FERREIRA-CARVALHO, B.T.; DIAS, C.; ROZENBAUM, R.; DEL PELOSO, P.F.; DA COSTA FERREIRA LEITE, C.; TEIXEIRA, L.A.; FIGUEIREDO, A.M. Detection and characterization of international community-acquired infections by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Rio de Janeiro and Porto Alegre cities causing both community- and hospital-associated diseases. **Diagn Microbiol Infect Dis**, 59(3), 339-345, 2007

ROBERT, S.; CHAMBERS, S. Diagnosis and management of *Staphylococcus aureus* infections of the skin and soft tissue. **Intern. Med. J.**, v.35 (suppl.2), p.97-105, 2005.

ROBERTS, R.B., CHUNG, M., DE LENCASTRE, A., HARGRAVE, J., TOMASZ, A., NICOLAU, D.P., JOHN, J.F.Jr.; KORZENIOWSKI, O. Distribution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones among health care facilities in Connecticut, New Jersey, and Pennsylvania. **Microbial Drug Resist**, 6, 245-251, 2000

ROBERTS, R.B., DE LENCASTRE, A., EISNER, W., SEVERINA, E.P., SHOPSIN, B., KREISWIRTH, B.N.; TOMASZ, A. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in 12 New York hospitals. **J Hosp Infect**, 178, 164-171, 1998.

ROBERTS, R.B.; TENNENBERG, A.M.; EISNER, W.; HARGRAVE, J.; DRUSIN, L.M.; YURT, R.; KREISWIRTH, B.N. Outbreak in a New York teaching hospital burn center caused by Iberian epidemic clone of MRSA. **Microbial Drug Resist**, 4, 175-183, 1998.

ROBERTS, J.C.; GULINO, S.P.; PEAK, K.K.; LUNA, V.A.; SANDERSON, R. Fatal necrotizing pneumonia due to a Pantone-Valentine leukocidin positive community-associated

methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* and Influenza co-infection: a case report. **Ann Clin Microbiol Antimicrob**, 19, 7-5, 2008.

ROBICSEK, A.; SUSENO, M.; BEAUMONT, J.L.; THOMSON R.B. JR.; PETERSON, L.R. Prediction of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* involvement in disease sites by concomitant nasal sampling. **J Clin Microbiol**, 46(2), 588-592, 2008.

ROSENTHAL, V.D.; MAKI, D.G.; JAMURILAT, S.; MEDEIROS, E.A.; TODI, S.K.; GOMEZ, D.Y.; LEBLEBICIOGLU, H.; KHADER, I.A.; NVALES, M.G.M.; BERBA, R.; WONG, F.M.R.; BARKAT, AM.; PINO, O.R.; DUENAS, L.; MITREV, Z.; BIJIE, H.; GURSKIS, V.; JANJ. S.S.; MAPP, T.; HIDALGO, R.F.; JABALLAH, N.B.; RAKA, L.; GIKAS, A.; AHMED, A.; THU, L.T.A.; SIRITT, M.E.G.; INICC MEMBERS. International nosocomial infection control consortium (INICC) report, data summary for 2003-2008, issued June 2009. **Am J Infect Control**, 38(3), 95-106, 2010.

ROSENTHAL, V.D., MAKI, D.G., SALOMAO, R., ÁLVAREZ-MORENO, C., MEHTA, Y., HIGUERA, F., CUELLAR, L.E., ARIKAN, O.A., BOUQAL, R., LEBLEBICIOGLU, H. Device-associated nosocomial infections in 55 intensive care units of 8 developing countries. International Nosocomial Infection Control Consortium. **Ann. Intern. Med.**, v.145, n.8, p.582-591, 2006.

SABERSHEIKH, S.; SAUDERS, N.A. Quantification of virulence-associated gene transcripts in epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by real time PCR. **Mol. Cell. Probes.**, v.18, n.1, p.23-31, 2004.

SADER, H.S.; JONES, R.N.; GALES A.C.; SILVA J.B.; PIGNATARI A.C. SENTRY GROUP. SENTRY antimicrobial surveillance program report: Latin American and Brazilian results for 1997 through 2001. **Braz. J. Infect. Dis.**, v.8, n.1, p.25-79, 2004.

SÁ-LEAO, R., SANTOS, S.I., DIAS, D., PERES, I., BARROS, R.M.; DE LENCASTRE, H. Detection of a naive clone of *Staphylococcus aureus* with low-level resistance to methicillin in a pediatric hospital in Portugal and in international samples: relics of a formerly widely disseminated strain? **J Clin Microbiol**, 37, 1913-1920, 1999.

SALVATORE, R. N.; YOON, C. H.; JUNG, K. W. Synthesis of secondary amines. **Tetrahedron**, 2001, 57, 7785-7811.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Extraction and purification of plasmid DNA. Molecular Cloning: a Laboratory Manual**. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY. Appendix A.5.1989.

SANCHES, I.S.; AIRES DE SOUZA, M.; SOBRAL, L.; CALHEIROS, I.; FELICIO, L.; PEDRA, I.; DE LENCASTRE, H. Multidrug-resistant Iberian epidemic clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* endemic in a hospital in northern Portugal. **Microb Drug Resist**, 1, 299-306, 1995.

SANCHES, I.S.; SARAIVA, Z.C.; TENDEIRO, T.C.; SERRA, J.M.; DIAS, D.C.; DE LENCASTRE, H. Extensive intra-hospital spread of a methicillin-resistant staphylococcal clone. **Int J Infect Dis**, 3, 26-31, 1998

SANTOS, K.R.N.; TEIXEIRA, L.M.; BRAVO NETO, G.P.; FONSECA, L.S.; GONTIJO FILHO, P.P. Mupirocin- and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* spreading in an intermediate-care unit in a Brazilian hospital. **Infect Control Hosp Epidemiol**, 19(9), 622-623, 1999.

SANTOS, A.L.; SANTOS, D.O.; FREITAS, C.C.; FERREIRA, B.L.A.; AFONSO, I.F.; RODRIGUES, C.R.; CASTRO, H.C. *Staphylococcus aureus*: visiting a strain of clinical importance. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v.43, n.6, p.413-423, 2007.

SARVIKIVI, E.; LYYTIKÄNEN, O.; VAARA, M.; SAXÉN, H. Nosocomial bloodstream infections in children: an 8-year experience at a tertiary-care hospital in Finland. **Clin Microb Infect**, 14(11), 1072-1075, 2008.

SCANVIC, A.; DENIC, F.; GAILLON, S.; GIRY, P.; ANDREMONT, A.; LUCET, J. Duration of colonization by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* after hospital discharge and risk factors for prolonged carriage. **Clin. Infect. Dis.**, v.32, n.10, p.489-495, 2001.

SCHUENCK, R.P.; NOUÉR, S.A.; WINTER, C.O.; CAVALCANTE, F.S.; SCOTTI, T.D.; FERREIRA, A.L.; GIAMBIAGI-DE-MARVAL, M. DOS SANTOS, K.R. Polyclonal presence of non-multiresistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates carrying SCCmec IV in health care-associated infections in a hospital in Rio de Janeiro, Brazil. **Diagn Microbiol Infect Dis**, 64(4), 434-441, 2009.

SCHUENCK, RP.; CAVALCANTE, FS.; EMERY, E.; GIAMBIAGI-DE MARVAL, M.; DOS SANTOS KR. *Staphylococcus aureus* isolates belonging to different multilocus sequence types present specific virulence gene profiles. **Immunol Med Microbiol**. (3): 501-4, 2012.

SILVA-CARVALHO, M.C.; BONELLI, R.R.; SOUZA, R.R.; MOREIRA, S.; DOS SANTOS, L.C.; DE SOUZA CONCEIÇÃO, M.; DE MELLO JÚNIOR, S.J.; CARBALLIDO, J.M.; RITO, P.N.; VIEIRA, V.V.; TEIXEIRA, L.A.; SÁ FIGUEIREDO, A.M. Emergence of multiresistant variants of the community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineage ST1-SCCmecIV in 2 hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. **Diagn Microbiol Infect Dis**, 65(3), 300-305, 2009

SILVERSTEIN, D.M.; MOYLAN, K. Cause and outcome of central venous catheter infections in paediatric haemodialysis patients. **Nephrol Dial Transplant** 25(10), 3332-7, 2010

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*. **Antimicrob Agents Chemother.** 55(8), 3765-3773, 2011.

SILVER, L. L. Challenges of antibacterial discovery. **Clin. Microb. Ver.** 24 (1), 71 – 108, 2011.

SMITH-PALMER, A.; STEWART, J. FYFE, L. Influence of subinhibitory concentrations of plant essential oils on the produTION of enterotoxins A and B and α -toxin by *Staphylococcus aureus*. **J. Med. Microbiol.**, v.53, p.1023-1027, 2004.

SMITH, T.; JARVIS, W. Antimicrobiol resistance in *Staphylococcus aureus*. **Microb. Infect.**, v.1, p.795-805, 1999.

SONG J. H. What's new on the antimicrobial horizon? **Int. J. Antimicrob. Agents.** 32 (4), 207 – 213, 2008.

SOUSA JÚNIOR, F.C.; SILVA-CARVALHO, M.C.; FERNANDES, M.J.B.C.; VIEIRA, M.F.P.; PELLEGRINO, F.L.P.C.; FIGUEIREDO, A.M.S.; DE MELO, M.C.N.; MILAN, E.P. Genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates obtained in the Northeast region of Brazil. **Braz J Med Biol Res**, 42(10), 877-881, 2009.

STEERS, E.; FOLTZ EL.; GRAAVES VS. An inocula replicating apparatus dor continue testing of bacterial susceptibility to antibiotics. **Antibiot. Chemother.**, v.9, p.307-311, 1959.

STREIT, J.M., JONES, R.N., SADER, H.S., FRITSCHÉ, T.R. 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). **Intern. J. Antimicrob. Agents.**, v.24, n.2, p.111-118, 2004.

STROMMINGER, B.; KETTLITZ, C.; WERNER, G.; WITTE, W. Multiplex PCR assay simultaneous deteUTION of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus*. **J. Clin. Microbiol.**, v.41, n.9, p.4089-4094, 2003.

SU, Y.; WONG, A.C.L. Optimal condition for the produUTION of unidentified staphylococcal enterotoxins. **J. Food Prot.**, v.56, p.313-316, 1993.

TAVARES, W. Bactérias Gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.33, n.3, p.281-301, 2000.

TAVARES, W. Resistência bacteriana. In: **Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos**. 3ª ed., São Paulo, Atheneu, p. 55-144, 2002.

TAVARES, D.A.; SÁ-LEÃO, R.; MIRAGAIA, M.; DE LENCASTRE, H. Large screening of CA-MRSA among *Staphylococcus aureus* colonizing healthy young children living in two areas (urban and rural) of Portugal. **BMC Infect Dis**, 10:110, 2010

TEIXEIRA, L. A.; RESENDE, C. A.; ORMONDE, L. R.; ROSENBAUM, R.; FIGUEIREDO, A.M.; DE LENCASTRE, H; TOMAZS, A. Geographic spread of epidemic multiresistant *Staphylococcus aureus* clone in Brazil. **J Clin Microbiol**, 33, 2400-2404, 1995.

TEIXEIRA, L.A.; LOURENÇO, M.; FIGUEIREDO, A. Emergence of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone related to the Brazilian epidemic clone III:B:A causing invasive disease among AIDS patients in a Brazilian hospital. **Microb Drug Resist**, 2,393-399, 1996.

TEIXEIRA, M.M.; ARAÚJO, M.C.; SILVA-CARVALHO, M.C.; BELTRAME, C.O.; OLIVEIRA, C.C.; FIGUEIREDO, A.M.; OLIVEIRA, A.G. Emergence of clonal complex 5 (CC5) methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates susceptible to trimethoprim-sulfamethoxazole in a Brazilian hospital. **Braz J Med Biol Res**. 45(7), 637-643, 2012.

TENOVER, F.C.; ARBEIT, R.D.; GOERING, R.V.; MICKELSEN, P.A.; MURRAY, B.E.; PERSING, D.H.; SWAMINATHAN, B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **J Clin Microbiol**, 33(9), 2233-2239, 1995.

TENOVER, F.C.; MCALLISTER, S.; FOSHEIM, G.; MCDUGAL, L.K.; CAREY, R.B.; LIMBAGO, B.; LONSWAY, D.; PATEL, J.B.; KUEHNERT, M.J.; GORWITZ, R. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from nasal cultures collected from individuals in the United States in 2001 to 2004. **J Clin Microbiol**, 46(9), 2837-2841, 2008.

TENOVER, F.C.; MCDUGAL, L.K.; GOERING, R.V.; KILGORE, G.; PROJAN, S.J.; PATEL, J.B.; DUNMAN, P.M. Characterization of a strain of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* widely disseminated in the United States. **J Clin Microbiol**, 44(1), 108-118, 2006

THEURETZBACHER, U. Future antibiotics scenarios: is the tide starting to turn? **Int. J. Antimicrob. Agents**.34, 15–20, 2009.

TOMASZ, A. New mechanism for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: clinical isolates that lack the PBP 2a gene and contain normal penicillin-binding proteins with modified penicillin-binding capacity. **Antimicrob Agents Chemother.**, v.33, n.11, p.1869-1874, 1989.

TRINDADE, P.; PACHECO, R.L.; COSTA, S.F.; ROSSI, F.; BARONE, A.A.; MAMIZUCA, E.M.; LEVIN, A.S. Prevalence of SCCmec type IV in nosocomial bloodstream infections of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **J Clin Microbiol**, 43(7), 3435-3437, 2005.

TUNG, H.; GUSS, B.; HELLMAN, U.; PERSSON, L.; RUBIN, K.; RYDÉN, C. A bone sialoprotein-binding protein from *Staphylococcus aureus*: a member of the staphylococcal Sdr family. **Biochem. J.**, v.345, p.611-619, 2000.

VAN BELKUM, A., KOOLS-SIJMONS, M.; VERBRUGH, H. Attachment of *Staphylococcus aureus* to eukaryotic cells and experimental pitfalls in staphylococcal

adherence assays: a critical appraisal. **J. Microbiol. Methods**, 48, p. 19-42, 2002.

VAN BELKUM, A.; TASSIOS, P.T.; DIJKSHOORN, L.; HAEGGMAN, S.; COOKSON, B.; FRY, N.K.; FUSSING, V.; GREEN, J.; FEIL, E.; GERNER-SMIDT, P.; BRISSE, S.; STRUELENS, M. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. **Clin Microbiol Infect Dis**, 13(Suppl 3), 1-46, 2009.

VANDENESCH, F.; NAIMI, T.; ENRIGHT, M.C.; LINA, G.; NIMMOS, G.R.; HEFFERNAN, H.; LIASSINE, N.; BES, M.; GREENLAND, T.; REVERDY, M.E.; ETIENE, J. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine Leukocidin genes: worldwide emergence. **Emerg. Infect. Dis.**, v.9, n.8, p.978-984, 2003.

VAN HAL S.J.; PATERSON, D.L. New Gram-positive antibiotics: better than vancomycin? **Curr Opin Infect Dis**. 24(6):515-20, 2011.

VINCENT, J.L.; RELLO, J.; MARSHALL, J.; SILVA, E.; ANZUETO, A.; MARTIN, C.D.; MORENO, R.; LIPMAN, J.; GOMERSALL, C.; SAKR, Y.; REINHART, K.; THE EPIC II GROUP OF INVESTIGATION. International study of prevalence and outcomes of infeUTIOn in intensive care units. **JAMA**, 302(21), 2323-2329, 2009

VIVONI, A.M.; DIEP, B.A.; MAGALHÃES, A.C.G.; SANTOS, K.R.N.; RILEY, L.W.; SENSABAUGH, G.F; MOREIRA B.M. Clonal composition of *Staphylococcus aureus* isolates at a Brazilian university hospital: identification of international circulating lineages. **J. Clin. Microbiol.**, v.44, n.5, p.1686-1691, 2006.

WALDRON, D.E.; LINDSAY, J.A. Sau1: a novel lineage-specific type I restriUTIOn-modification system that blocks horizontal gene transfer into *Staphylococcus aureus* and between *S. aureus* isolates of different lineages. **J Bacteriol**, 188(15), 5578-5585, 2006

WANNET, W.J.B.; SPALBURG, E.; HECK, M.E.O.C.; PLUISTER, G.N.; TIEMERSMA, E.; WILLEMS, R.J.L.; HUIJSDENS, X.W.; DE NEELING, A.J.; ETIENNE, J. Emergence of virulent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains carrying Panton Valentine leucocidin genes in the Netherlands. **J. Clin. Microbiol.**, v.43, n.7, p.3341-3345, 2005.

WEINACHT, K.G.; ROCHE, H. C.; KRINOS, M.; COYNE, M.J.; PARKHILL, J. Comstock, Tyrosine site-specific recombinases mediate DNA inversions affeUTIing the expression of outer surface proteins of *Bacteroides fragilis*, **Mol. Microbiol.** 53 :1319–1330, 2004.

WENDT C. Hand hygiene-comparison of international recommendations. **J Hosp Infect** 48 (Suppl A), S23-S28, 2001.

WERTHEIM, H.F.L.; MELLES, D.C.; VAS, M.C.; VAN LEEUWEN, W.; VAN BELKUM, A.; VERBRUGH, H.A.; NOUWEN, J.I. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. **Lancet Infect. Dis.**, v.5, n.12, p.751-762, 2005.

WERTHEIM, H.F.L.; VOS, M.C.; OTT, A.; VANBELKUM, A.; VOSS, A.; KLUYTMANS, J.A.J.W.; VAN KEULEN, P.H.J.V.; VANDENBROUKE-GRAULS, C.M.J.E.; MEESTER,

M.H.M.; VERBRUGH, H.A. Risk and outcome of nosocomial *Staphylococcus aureus* bacteraemia in nasal carriers versus non-carriers. **Lancet**, 364(9435), 703-705, 2004.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). **Prevention of hospital-acquired infeUTIion: a praUTIcal guide**. 2nd edition, 2002.

WIBBENMEYER, L.; WILLIAMS, I.; WARD, M.; XIAO, X.; LIGHT, T.; LATENSER, B.; LEWIS, R.; KEALEY, G.P. & HERWALDT, L. Risk factors for acquiring vancomycin-resistant *Enterococcus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on a burn surgery step-down unit. **J Burn Care Res**, 31(2), 269-279, 2010.

WIEST, D.B.; COCHRAN, J.B.; TECKLENBURG, F.W. Chloramphenicol Toxicity Revisited: A 12-Year-Old Patient With a Brain Abscess. **J Pediatr Pharmacol Ther**.17(2):182–188, 2012.

WILKINSON, B. J. Biology. In: **The Staphylococci in human disease**. Crossley K.B. & Archer G.L.(eds). Churchill Livingstone. New York, USA. p.1-38, 1997.

WILSON, M. Bacterial adhesion to host tissues: mechanisms and consequences. In: **Advances in Molecular and Cellular Microbiology**. Wilson M. (Editor). Cambridge University Press, Cambridge, 2002.

WOLCOTT, R. D.; RHOADS, D. D.; BENNETT, M.E.; WOLCOTT, B.M.; GOGOKHIA L.; COSTERTON J.W.; DOWD, S. E. Chronic wounds and the medical biofilm paradigm. **J. Wound Car**. 19:45-6, 2010.

ZAVADINACK, M.; HERREIRO, F.; BANDEIRA, C.O.P.; ITO, Y.; CIORLIN, E.; SAQUETI, E.E.; ANSILEIRO, I.J.; GONSALVES, L. & SIQUEIRA, V.L.D. *Staphylococcus aureus*: incidência e resistência antimicrobiana em abscessos cutâneos de origem comunitária. **Acta Scientiarum**, v.23, n.3, p.709-712, 2001.

ZBINDEN, R.; RITZLER, M.; RITZLER, E.; BERGER-BÁCHI, B. DeteUTIion of penicillin-binding protein 2a by rapid slide latex agglutination test in coagulase-negative staphylococci. **J. Clin. Microbiol.**, v.39, n.1, p.412, 2001.

ZHANG, K.; SPARLING, J.; CHOW, B.L.; ELSAYED, S.; HUSSAIN, Z.; CHURCH, D.L.; GREGSON, D.B.; LOUIE, T.; CONLY, J.M. New quadriplex PCR assay for deteUTIion of methicillin and mupirocin resistance and simultaneous discrimination of *Staphylococcus aureus* from coagulase negative staphylococci. **J. Clin. Microbiol.**, v.42, n.11, p.4947-4955, 2004.

ZHANG, K.; McCLURE, J.A.; ELSAYED, S.; CONLY, J.M. Novel staphylococcal cassette chromosome mec type, tentatively designated type VIII, harboring class A mec and type 4 ccr gene complexes in a Canadian epidemic strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.53, n.2, p.531-540, 2009.

ZHAO, Y.; JIANG, X. Multiple strategies to activate gold nanoparticles as antibiotics. **Nanoscale**, 5, 8340–8350, 2013.

APÊNDICE A – Características clínico-epidemiológicas em linhagens de ORSA associadas a pacientes internados no HU/UFJF de 2005 a 2010.

Características clínico-epidemiológicas		Período amostrado					
		2005 (n=25)	2006 (n=13)	2007 (n=27)	2008 (n=21)	2009 (n=10)	2010 (n=07)
Gênero	Masculino	72,0%	69,2%	74%	66,6%	70,0%	71,4%
	Feminino	28,0%	30,8%	26%	33,4%	30,0%	28,6%
Média de idade (anos)		50,2	54,9	52,2	59,3	58,5	64,4
Tipo de infecção	Bacteremia	4,0%	23,1%	22,2%	33,3%	30,0%	14,3%
	Bacteremia/cateter	12,0%	30,7%	11,1%	14,3%	10,0%	0,0%
	Sítio cirúrgico	28,0%	0,0%	18,5%	14,3%	0,0%	0,0%
	Infecção de ferida	0,0%	0,0%	11,1%	4,8%	10,0%	14,3%
	TGI	8,0%	0,0%	7,4%	0,0%	0,0%	0,0%
	Osteomomuscular	8,0%	0,0%	3,8%	0,0%	0,0%	0,0%
	Sistema Respiratório	36,0%	46,2%	18,5%	23,8%	50,0%	71,4%
	ITU	4,0%	0,0%	7,4%	9,5%	0,0%	0,0%
	Espécimes clínicos	Sangue	20,0%	15,4%	18,5%	38,1%	30,0%
Secreção traqueal		20,0%	30,8%	18,5%	14,3%	50,0%	71,4%
Urina		4,0%	0,0%	7,5%	9,5%	0,0%	0,0%
Ponta cateter		16,0%	30,8%	11,1%	19,0%	10,0%	0,0%
Exsudatos		12,0%	23,0%	22,2%	4,8%	10,0%	14,3%
Swabs de sítio cirúrgico		28,0%	0,0%	22,2%	14,3%	0,0%	0,0%
Evolução do paciente	Alta	56,0%	46,1%	55,5%	61,9%	30,0%	57,1%
	Óbito	36,0%	53,9%	44,5%	38,1%	60,0%	42,9%
	Tranferência	8,0%	0,0%	0,0%	0,0%	10,0%	0,0%
Unidade	Clínica médica	24,0%	23,1%	22,2%	42,9%	40,0%	14,3%
	Clínica cirúrgica	36,0%	23,1%	29,6%	14,3%	0,0%	14,3%
	UTI	36,0%	53,8%	44,4%	33,3%	50,0%	71,4%
	Pediatria	4,0%	0,0%	0,0%	9,5%	10,0%	0,0%
	TMO	0,0%	0,0%	3,8%	0,0%	0,0%	0,0%

ITU, infecção do trato urinário; TMO, transplante de medula óssea; UTI, unidade de terapia intensiva

APÊNDICE B – Características das 45 linhagens ORSA isoladas na unidade de tratamento intensivo do HU/UFJF, entre 2005 a 2010

Número do isolado	Data de isolamento (mês/dia/ano)	Espécime Clínico	Perfil de Resistência	Tipo SCC ^{mec}	Genotipo [§]	Clonalidade [‡]	CC [*]
5	3/08/05	Urina	AZI/CHL/CLI/ERY/GEN/LEV/RIF/SXT/TET	III	H1	CEB	8
23	5/17/05	ST	AZI/CHL/CLI/ERY/GEN/LEV/RIF/SXT/TET	III	A2	CEB	8
24	9/08/05	Sangue	AZI/CHL/CLI/ERY/GEN/LEV/RIF/SXT/TET	III	H1	CEB	8
26	7/24/05	ST	AZI/CLI/ERY/GEN/LEV/RIF/SXT/TET	III	H2	CEB	8
30	1/18/05	ST	AZI/CLI/ERY/GEN/LEV/RIF/SXT/TET	III	J2	CEB	8
40	7/24/05	ST	AZI/CLI/ERY/GEN/LEV/RIF/SXT/TET	III	M1	CEB	8
45	1/11/05	Sangue	AZI/CLI/ERY/GEN/LEV/RIF/SXT/TET	III	L1	CEB	8
55	7/18/05	Sangue	AZI/CHL/CLI/ERY/GEN/LEV/RIF/SXT/TET	III	C2	CEB	8
66	8/31/05	LP	AZI/CLI/ERY/GEN/LEV/RIF/SXT/TET	NT	O1	ND	ND
72	12/06/06	Sangue	AZI/CLI/ERY/GEN/LEV/RIF/SXT/TET	III	D1	CEB	8
80	9/23/06	ST	AZI/CLI/ERY/GEN/LEV/RIF/SXT/TET	III	K1	CEB	8
90	12/09/06	ST	AZI/CHL/CLI/ERY/GEN/LEV/RIF/SXT/TET	III	D2	CEB	8
99	9/06/06	PC	AZI/CLI/ERY/GEN/LEV/RIF/SXT/TET	III	A3	CEB	8
104	12/11/06	ST	AZI/CHL/CLI/ERY/GEN/LEV/RIF/SXT/TET	III	A1	CEB	8
108	12/18/06	PC	AZI/CHL/CLI/ERY/GEN/LEV/RIF	III	C1	CEB	8
113	10/09/06	ST	AZI/CHL/CLI/ERY/GEN/LEV/RIF/SXT/TET	III	C1	CEB	8
126	9/18/07	ST	AZI/CHL/CLI/ERY/GEN/LEV/RIF/SXT/TET	III	C2	CEB	8
134	9/10/07	ST	AZI/CHL/CLI/ERY/GEN/LEV/RIF/SXT/TET	III	B1	CEB	8
138	12/31/07	Sangue	AZI/CLI/ERY/GEN/LEV/RIF/TET	III	C3	CEB	8
139	12/24/07	LP	AZI/CHL/CLI/ERY/GEN/LEV/RIF/SXT/TET	III	H1	CEB	8
140	12/04/07	Sangue	AZI/CHL/CLI/ERY/GEN/LEV/RIF/SXT/TET	III	J1	CEB	8
141	4/02/07	Sangue	AZI/CLI/ERY/GEN/LEV/RIF	II	G1	USA100	5
145	1/30/07	ST	AZI/CHL/CLI/ERY/GEN/LEV/RIF/SXT/TET	III	B2	CEB	8
155	2/28/07	LP	AZI/CHL/CLI/ERY/GEN/LEV/RIF/SXT/TET	III	A2	CEB	8
157	2/04/07	SC	AZI/CHL/CLI/ERY/GEN/LEV/RIF/SXT/TET	III	E1	CEB	8
159	7/08/07	ST	AZI/CHL/CLI/ERY/GEN/LEV/RIF/SXT	II	G2	USA100	5
247	3/25/07	ST	AZI/CHL/CLI/ERY/GEN/LEV/RIF/SXT/TET	III	E2	CEB	8
252	6/25/07	PC	AZI/CHL/CLI/ERY/GEN/LEV/RIF/SXT/TET	III	C4	CEB	8
169	1/30/08	ST	AZI/CHL/CLI/ERY/LEV/RIF/TET	III	H1	CEB	8
171	8/16/08	Sangue	AZI/CLI/ERY/GEN/LEV/RIF	NT	N1	ND	ND
177	2/03/08	ST	AZI/CHL/CLI/ERY/GEN/LEV/SXT/TET	IV	Q1	USA400	1
180	1/14/08	PC	CLI/ERY/GEN/LEV/SXT/TET	IV	T1	USA800	5
184	10/13/08	SC	AZI/CLI/ERY/GEN/LEV	I	S1	USA500	5
211	2/07/08	PC	AZI/CHL/CLI/ERY/GEN/LEV/RIF/SXT/TET	III	H1	CEB	8
213	3/16/08	PC	AZI/CLI/ERY/LEV/SXT/	NT	R1	ND	ND
216	12/14/09	ST	AZI/CHL/CLI/ERY/GEN/LEV/RIF/SXT/TET	III	H1	CEB	8
221	8/17/09	ST	AZI/CHL/CLI/ERY/GEN/LEV/RIF/TET	II	G1	USA100	5
227	8/03/09	ST	AZI/CHL/CLI/ERY/LEV/RIF/TET	II	F1	USA100	5
229	7/18/09	ST	AZI/CHL/CLI/ERY/LEV/RIF	NT	P1	ND	ND
230	8/09/09	ST	AZI/CHL/CLI/ERY/GEN/LEV/RIF/TET	II	F1	USA100	5
231	4/18/10	ST	AZI/CHL/CLI/ERY/GEN/LEV/RIF/SXT/TET	III	I1	CEB	8
236	2/06/10	ST	AZI/CHL/CLI/ERY/GEN/LEV/RIF/TET	II	F1	USA100	5
237	2/21/10	ST	AZI/CHL/CLI/ERY/GEN/LEV/RIF/SXT/TET	III	F2	BEC	8
260	11/30/10	ST	AZI/CLI/ERY/LEV/RIF	II	F1	USA100	5
261	8/25/10	Sangue	AZI/CLI/ERY/LEV	II	F1	USA100	5

AZI, azitromicina; CEB, clone epidêmico brasileiro; CLI, clindamicina; CHL, cloranfenicol; ERY, eritromicina; GEN, gentamicina; LEV, levofloxacino; LP, líquido peritoneal; PC, ponta de cateter; RIF, rifampicina; SC, sítio cirúrgico; ST, secreção traqueal; SXT, sulfametoxazol/trimetoprim; TET, tetraciclina; CC, complexo clonal; NT, não tipável; ND, não determinado

[§]Definido por PFGE de acordo com Van Belkum et al, 2007.

[‡]De acordo com McDougal et al, 2003.

* De acordo com Cockfield et al, 2007.

APÊNDICE C – Artigo publicado em periódico internacional

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 23 (2013) 2883–2887



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bmcl

Synthesis and antimicrobial activity of novel amphiphilic aromatic amino alcohols

Angelina M. de Almeida^a, Thiago Nascimento^b, Bianca S. Ferreira^a, Pedro P. de Castro^b, Vânia L. Silva^b, Cláudio G. Diniz^b, Mireille Le Hyaric^{a,*}

^a Departamento de Química, ICE, Universidade Federal de Juiz de Fora, 36036-330 Juiz de Fora, MG, Brazil

^b Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, ICB, Universidade Federal de Juiz de Fora, 36036-330 Juiz de Fora, MG, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 January 2013

Revised 12 March 2013

Accepted 20 March 2013

Available online 28 March 2013

Keywords:

Antimicrobial activity

MRSA

Amino alcohol

Alkyloxybenzaldehyde

2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-

diol

Reductive amination

ABSTRACT

We report in this work the preparation and in vitro antimicrobial evaluation of novel amphiphilic aromatic amino alcohols synthesized by reductive amination of 4-alkyloxybenzaldehyde with 2-amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol. The antibacterial activity was determined against four standard strains (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) and 21 clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. The antifungal activity was evaluated against four yeast (*Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* and *Candida parapsilosis*). The results obtained showed a strong positive correlation between the lipophilicity and the antibiotic activity of the tested compounds. The best activities were obtained against the Gram-positive bacteria (MIC = 2–16 $\mu\text{g ml}^{-1}$) for the five compounds bearing longer alkyl chains (**4c–g**; 8–14 carbons), which were also the most active against *Candida* (MIC = 2–64 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Compound **4e** exhibited the highest levels of inhibitory activity (MIC = 2–16 $\mu\text{g ml}^{-1}$) against clinical isolates of MRSA. A concentration of twice the MIC resulted in bactericidal activity of **4d** against 19 of the 21 clinical isolates.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

The evolutionary adaptation of microorganisms has led to the development of drug-resistant strains of bacteria and fungi. The emergence of multidrug resistant organisms has become a major public health problem, as they turn the management of infectious diseases more precarious,^{1–3} and there is an urgent need for new active compounds. Amino alcohols are important as building blocks in organic synthesis, and their presence in chemical structures is often associated with biological activities, as in ethambutol and other antimicrobial compounds.^{4–7} Our group showed in previous works the antimicrobial and immunological activities of series of aliphatic and aromatic amino alcohols derivatives are related to their lipophilicity.^{8–11} The present paper describes the synthesis of new amphiphilic aromatic amino alcohols derived from 4-hydroxybenzaldehyde and their evaluation as antibacterial and antifungal compounds, as well as the study of the relationship between activity and lipophilicity.

Compounds **2a–g** were obtained using described procedures.^{12,13} 4-hydroxy-benzaldehyde **1** was first alkylated using the Williamson ether synthesis and then submitted to direct reductive amination reaction⁹ in the presence of 2-amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol (Tris) to give the targeted amino

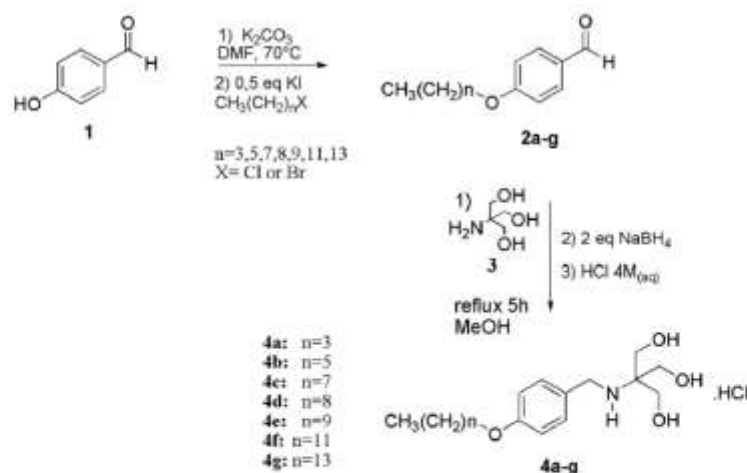
alcohols **4a–f** in 62–87% yield (Scheme 1). All the synthesized compounds were characterized by FTIR, ¹H and ¹³C NMR, and high resolution mass spectrometry.

The antibacterial activity of the prepared compounds was assessed in vitro against two Gram-positive bacterial strains (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213 and *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228), two Gram-negative bacteria (*Escherichia coli* ATCC 11229 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) and 21 clinical isolates of MRSA obtained from the culture collection at the Laboratory of Bacterial Physiology and Molecular Genetics, Federal University of Juiz de Fora. The minimal inhibitory concentration (MIC) of the selected compounds was determined by the broth dilution method in Mueller Hinton medium (DIFCO Laboratories, Detroit, MI, USA), according to the CLSI guidelines.^{14,15}

The MIC values of the compounds, as well as of chloramphenicol and vancomycin, used as positive controls, are reported in Table 1. The data show that the series of amino alcohols was more active against Gram-positive bacteria (MIC = 2–1024 $\mu\text{g ml}^{-1}$) than against Gram-negative strains (16–1024 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Compounds **4a** and **4b**, bearing the shortest alkyl chains (respectively 4 and 6 carbon atoms) were the less active substances. Compounds **4c–g** displayed a higher antibacterial activity than chloramphenicol, but they were less active than the reference drug vancomycin. These compounds were highly active against *S. aureus*, with MIC ranging

* Corresponding author. Tel.: +55 3221023310; fax: +55 3221023314.

E-mail address: mireille.hyaric@ufjf.edu.br (M. Le Hyaric).



Scheme 1. Synthesis of amino alcohols 4a–f.

Table 1
Inhibitory activity of compounds 4a–g expressed as MIC ($\mu\text{g ml}^{-1}$)

	MIC ($\mu\text{g/ml}$)							Chloramphenicol	Vancomycin
	4a	4b	4c	4d	4e	4f	4g		
<i>Reference strains</i>									
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	1024	128	8	8	8	8	2	16	0.5
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	512	128	16	8	4	8	2	32	–
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229	1024	256	32	16	32	>256	>256	16	–
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	512	512	>256	>256	16	>256	>256	32	–
<i>MRSA clinical isolates</i>									
176	–	–	32	8	8	8	16	64	1
178	–	–	128	16	8	8	8	4	1
195	–	–	32	8	8	8	16	4	0.5
205	–	–	16	8	8	8	16	8	1
207	–	–	64	16	8	4	>1024	4	1
212	–	–	32	32	8	8	>1024	8	1
215	–	–	16	16	4	8	>1024	64	1
218	–	–	16	8	4	4	8	64	0.5
225	–	–	128	8	8	8	>1024	8	1
227	–	–	32	16	4	4	>1024	64	1
231	–	–	16	8	8	4	2	64	1
232	–	–	16	16	16	8	8	64	1
235	–	–	16	8	4	4	4	64	1
236	–	–	16	8	4	4	8	64	1
237	–	–	16	16	16	4	4	32	1
238	–	–	16	32	8	4	4	32	1
255	–	–	8	16	4	4	8	4	0.5
257	–	–	8	8	4	16	2	8	1
259	–	–	8	8	4	4	2	128	0.5
260	–	–	16	16	8	4	2	4	0.5
264	–	–	8	8	2	4	16	8	0.5

from 2 to 8 $\mu\text{g ml}^{-1}$. The highest inhibitory activity was found for 4g (carrying an alkyl chain with 14 carbon atoms), showing MIC = 2 $\mu\text{g ml}^{-1}$ against both *S. aureus* and *S. epidermidis*.

The inhibitory potencies, MIC₅₀ and MIC₉₀, corresponding to 50% and 90% inhibition, were determined against 21 MRSA clinical strains for lipophilic amino alcohols 4c–g. The results, depicted in Tables 1 and 2, show that compounds 4c–f were active against all the MRSA isolates (MIC = 2–128 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Compounds 4e and 4f

Table 2
Inhibitory activity of compounds 4c–g against MRSA, expressed as MIC₅₀ and MIC₉₀

	4c	4d	4e	4f	4g	Chloramphenicol ^a
MIC ₅₀	16	8	8	4	8	16
MIC ₉₀	64	16	8	8	>1024	32
Range	8–128	8–32	2–16	4–16	2 >1024	8–128

^a Sensibility: 43.7%; resistance: 56.3%.

Table 3
Correlation between pMIC (MIC expressed in mmol l^{-1}) and $\log P$

	pMIC							Pearson's correlation coefficient (r^2)
	4a	4b	4c	4d	4e	4f	4g	
$\log P$	1.02	1.86	2.69	3.11	3.53	4.36	5.2	
<i>S. aureus</i>	2.49	3.45	3.67	4.68	4.70	4.73	5.36	0.90
<i>S. epidermidis</i>	2.79	3.43	4.37	4.68	5.00	4.73	5.36	0.86
<i>E. coli</i>	2.49	3.13	4.06	4.38	4.1	ND	ND	0.90
MRSA			4.287 ± 0.149	4.529 ± 0.156	4.842 ± 0.278	4.842 ± 0.278	5.030 ± 0.315	0.84

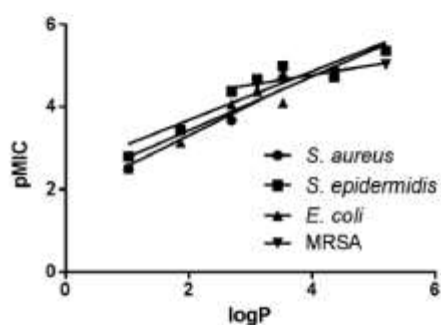


Figure 1. Linear regression analysis for antibacterial activity.

showed the most potent *in vitro* antibacterial activity, with $\text{MIC}_{90} = 8 \mu\text{g ml}^{-1}$ for both of them, superior to that of chloramphenicol.

The lipophilicity of a chemical substance, defined by its partition coefficient between *n*-octanol and water, is an important

Table 5
Antifungal activities

	MIC ($\mu\text{g ml}^{-1}$)							Itraconazole
	4a	4b	4c	4d	4e	4f	4g	
<i>Candida albicans</i> ATCC 22019	Nt	Nt	4	4	4	4	16	Nt
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 750	>512	>512	32	64	8	8	32	>512
<i>Candida glabrata</i> ATCC 18804	512	256	8	4	2	2	8	256
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 90030	>512	>512	32	32	8	4	8	>512

Nt: not tested.

physicochemical parameter that reflects the ability of the compound to penetrate biological membranes. This coefficient, expressed as $\log P$ has a great influence on the bioavailability of the drug, and is often correlated to its biological activity.¹⁶ In an attempt to establish a correlation between antibacterial activity and lipophilicity, the MIC values of compounds 4a–g, expressed in mol l^{-1} , were first transformed in pMIC and $\log P$ was calculated using Chemdraw Ultra (CambridgeSoft) (Table 3). The data obtained were submitted to linear regression analysis using

Table 4
Minimal bactericidal activities

	Minimal bactericidal concentration ($\mu\text{g ml}^{-1}$)					
	4c	4d	4e	4f	4g	Chloramphenicol
Reference strains						
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	32	16	8	8	16	–
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	128	16	8	8	512	128
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229	32	32	32	–	–	–
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	–	–	–	–	–	–
MRSA clinical isolates						
176	–	32	–	128	–	–
178	–	32	128	–	–	–
195	–	32	–	–	–	–
205	–	–	–	–	–	–
207	–	64	–	–	–	–
212	–	64	128	128	–	128
215	–	32	–	–	–	–
218	128	–	–	–	–	128
225	512	16	–	–	–	512
227	–	64	–	–	–	–
231	16	32	8	4	4	16
232	16	32	32	16	8	16
235	32	32	4	32	8	32
236	32	16	4	8	8	32
237	16	32	16	4	4	16
238	16	32	8	4	4	16
255	8	32	8	16	16	8
257	8	64	8	16	8	8
259	8	32	4	16	2	8
260	32	32	16	4	8	32
264	64	32	2	8	64	64

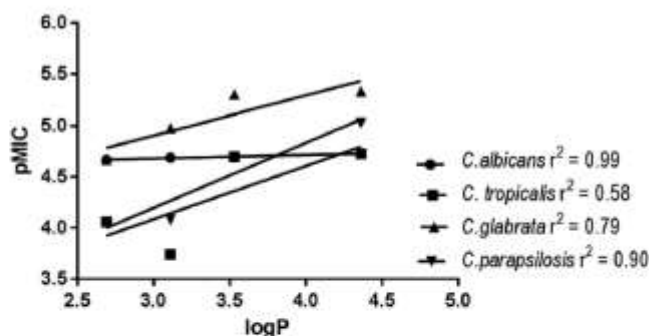


Figure 2. Linear regression analysis for antifungal activity.

Graphpad Prism (Fig. 1). A high collinearity ($r > 0.9$) was observed between the parameters for the 3 standard strains as well as for the MRSA strains, indicating that, for this series of compounds, the antibacterial activity depends on the lipophilicity.

Linear regression led to the following functions:

- *S. aureus*: $\text{pMIC} = 0.6575 \log P + 2.109$.
- *S. epidermidis*: $\text{pMIC} = 0.5945 \log P + 2.488$.
- *E. coli*: $\text{pMIC} = 0.7480 \log P + 1.805$.
- MRSA: $\text{pMIC} = 0.2413 \log(P) + 3.812$.

Considering the antibacterial activities of compounds **4c–g**, we investigated their bactericidal activity against standard strains and against MRSA clinical isolates (Table 4). To ensure the bactericidal concentrations, 0.1 ml from selected concentrations (two dilutions above the MIC, dilution recorded as the MIC, and two dilutions higher than the MIC) were streaked out to a tryptic soy agar plate, which was incubated for 24 h. The bactericidal concentration of each chemical substance, for each bacterial strain, was considered as the lowest concentration of drug resulting in no bacterial growth (100% killing rate).

None of the compounds exhibited bactericidal activity against *P. aeruginosa*. Compounds **4c–e** were bactericidal against *E. coli* at the same concentrations found for the MIC (**4c** and **4e**) or twice the MIC (**4d**). The less lipophilic compound **4c** had bactericidal activity against 14 strains of MRSA, with MBC values ranging from 8 to $512 \mu\text{g ml}^{-1}$.

The minimal bactericidal concentrations obtained for compounds **4e** and **4f** against the Gram-positive standard strains were comparable to their MIC ($8 \mu\text{g ml}^{-1}$). The two amino alcohols also displayed bactericidal activity against 13 of the 21 MRSA isolates, in concentrations ranging from 2 to $128 \mu\text{g ml}^{-1}$ and $4–128 \mu\text{g ml}^{-1}$, respectively. Although **4d** was not the most active compound, it had bactericidal effect on 19 of the 21 MRSA strains, in a concentration of twice its MIC (MBC = $16–32 \mu\text{g ml}^{-1}$).

The antifungal activities of compounds **4a–g** were evaluated against four strains of *Candida* (*Candida albicans* ATCC 22019, *Candida tropicalis* ATCC 750, *Candida glabrata* ATCC 18804, *Candida parapsilosis* ATCC 90030). Antifungal susceptibility testing was performed using the broth microdilution method according to CLSI guidelines for antifungigram (CLSI) document M27-A3.¹⁷ Itraconazole was used as reference antifungal agent.

The MIC values of the tested compounds are presented in Table 5. Itraconazole was used as a positive control. Compounds **4e** and **4f** were the most active, having MIC ranging from 2 to $8 \mu\text{g ml}^{-1}$. As observed in the antibacterial evaluation, the less

lipophilic amino alcohols **4a** and **4b** were also the less active compounds against the tested fungus. Although a moderate to good correlation ($0.76 < r < 0.99$) could be established between pMIC and logP for compounds **4c–f** (Fig. 2), a longer alkyl chain (14 atoms, compound **4g**) resulted in a loss of activity against all the tested strains.

In conclusion, a series of novel *N*-(4-alkoxybenzyl)-1,3-dihydroxy-2-(hydroxymethyl)propan-2-ammonium chloride was synthesized. These amphiphilic compounds displayed good to moderate in vitro antibacterial and antifungal activities against ATCC isolates of bacteria (Gram-positive and Gram-negative) and fungus. The most lipophilic compounds (**4c–g**) were also the most active ones and exhibited good activity against MRSA clinical isolates. **4g** expressed the highest activity against *S. aureus* and *S. epidermidis*. Amino alcohols **4e** and **4f** were the most active against MRSA clinical isolates. Compound **4e** was also the most active against the tested *Candida* strains.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge CAPES, CNPq and FAPEMIG for fellowships and financial support.

The authors thank Dr. Robert H. Dodd from ICSN (CNRS, Gif/Yvette, France) for the HRMS spectra.

Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.03.078>.


References and notes


- Levy, S. B.; Marshall, B. *Nat. Med.* **2004**, *12*, 122.
- Obtisch, M. D.; Fish, D. N.; McLaren, R.; Jung, R. *Pharmacotherapy* **2005**, *25*, 1353.
- Demain, A. L.; Sanchez, S. J. *Antibiot.* **2009**, *62*, 5.
- Gomes, C. R. B.; Moreth, M.; Cardinot, D.; Kopke, V.; Cunico, W.; Lourenço, M. C. S.; Souza, M. V. N. *Chem. Biol. Drug Des.* **2011**, *78*, 1031.
- Katiyar, D.; Tiwari, K. V.; Tewari, N.; Verma, S. S.; Sinha, S.; Galkwad, A.; Srivastava, A.; Chaturvedi, V.; Srivastava, R.; Srivastava, B. S.; Tripathi, R. P. *Eur. J. Med. Chem.* **2005**, *40*, 351.
- Salmi, C.; Loncle, C.; Letourmeux, Y.; Brune, J. M. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 4453.
- Almeida, M. V.; Le Hyaric, M.; Amaranie, G. W.; Lourenço, M. C. S.; Brandão, M. L. L. *Eur. J. Med. Chem.* **2007**, *42*, 1076.
- Almeida, C. G.; Garbois, G. D.; Amaral, L. M.; Diniz, C. G.; Le Hyaric, M. *Biomed. Pharmacother.* **2010**, *64*, 287.
- Correa, T. A.; Reis, E. F. C.; Alves, L. L.; Alves, C. S.; Castro, S. B. R.; Dias, A. T.; Taveira, A. F.; Le Hyaric, M.; Couri, M. R. C.; Ferreira, A. P.; Almeida, M. V. *Chem. Biol. Drug Des.* **2010**, *76*, 451.

10. Almeida, C. G.; Reis, S. G.; Almeida, A. M.; Diniz, C. G.; Silva, V. L.; Le Hyaric, M. *Chem. Biol. Drug Des.* **2011**, *78*, 876.
11. Taveira, A. F.; Le Hyaric, M. L.; Reis, E. F.; Araújo, D. P.; Ferreira, A. P.; Souza, M. A.; Alves, L. L.; Lourenço, M. C. S.; Vicente, F. R.; Almeida, M. V. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 7789.
12. Hasegawa, J.; Hamada, M.; Miyamoto, T.; Nishide, K.; Kajimoto, T.; Uenishi, J.; Noda, M. *Carbohydr. Res.* **2005**, *340*, 2360.
13. Janusko, P.; Kaszynski, B.; Gruner, B. *Org. Chem.* **2007**, *46*, 6078.
14. CLSI *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 17th Informational Supplement. CLSI Document M100-S16, 26; CLSI: Wayne, PA, 2007.
15. Alviano, W. S.; Alviano, D. S.; Diniz, C. G.; Antoniolli, A. R.; Alviano, C. S.; Farias, L. M.; Carvalho, M. A. R.; Souza, M. M. G.; Bolognese, A. M. *Arch. Oral Biol.* **2008**, *53*, 545.
16. Van de Waterbeemd, H.; Testa, B. *Adv. Drug Res.* **1987**, *16*, 85.
17. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts*, 3rd ed.; CLSI: Wayne, PA, 2008.

APÊNDICE D – Artigo submetido em periódico internacional

Home
About
Search
Current
Archives
Announcements
Other ▾


User Home



Home > User > Author > Submissions > #5390 > Summary

#5390 Summary

summary
review
editing

Submission

Authors	Thiago Cesar Nascimento, Vânia Lucia Silva, Márcia Lucas Araújo, Marina Barros Campos, Alessandra Barbosa Ferreira-Machado, Dennis Carvalho Ferreira, Murilo Gomes Oliveira, Claudio Galuppo Diniz	
Title	Epidemiology and antimicrobial susceptibility trends of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in a tertiary hospital	
Original file	5390-35644-2-SM.DOC 2014-03-13	
Supp. files	5390-35645-1-SP.DOC 2014-03-13	ADD A SUPPLEMENTARY FILE
	5390-35646-1-SP.DOC 2014-03-13	
	5390-35647-1-SP.TIF 2014-03-13	
Submitter	Dr. Claudio Galuppo Diniz	
Date submitted	March 13, 2014 - 01:10 AM	
Section	Articles	
Editor	Emanuela Fusinato	



© PAGEPress 2008-2013 - PAGEPress is a registered trademark property of PAGEPress srl, Italy. - VAT: IT02125780185

User

You are logged in as...
claudiodiniz2013

- [My Journals](#)
- [My Profile](#)
- [Log Out](#)

Follow PAGEPress on
LinkedIn!

Epidemiology and antimicrobial susceptibility trends of methicillin-resistant

***Staphylococcus aureus* in a tertiary hospital**

Thiago César Nascimento,¹ Vânia Lúcia da Silva,¹ Márcia Lucas Araújo,¹ Marina Barros Campos,¹ Alessandra Barbosa Ferreira-Machado,¹ Dennis de Carvalho Ferreira,² Murilo Gomes Oliveira,³ Cláudio Galuppo Diniz¹

¹ Department of Parasitology, Microbiology and Immunology, Federal University of Juiz de Fora, 36036-900, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil;

² Department of Medicine Oral, Veiga de Almeida University, 20271-021, Rio de Janeiro, Brazil;

³ Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Juiz de Fora, 36036-900, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil.

Acknowledgments

The authors are grateful to the Programa de Pós-Graduação em Saúde – Universidade Federal de Juiz de Fora (PPGS/UFJF), Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for financial support.

The authors are also grateful to staff from the Laboratory Prof. Maurilio Baldi, and Suzane F. Silva, Pedro P. Castro, Marina O. Fajardo, Débora M. Coelho, for technical help with the medical records and record books from the clinical microbiology laboratory.

Correspondence: Professor Cláudio Galuppo Diniz, PhD, Laboratory of Bacterial Physiology and Molecular Genetics, Department of Parasitology, Microbiology and Immunology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Juiz de Fora, 36.036-900, Juiz de Fora, MG, Brazil. Phone/Fax: + 55 32 2102-3213. E-mail: claudio.diniz@ufjf.edu.br

Key words: *Staphylococcus aureus*, antimicrobial susceptibility, methicillin-resistance.

Contributions: T. C. Nascimento, M. L. Araújo, M. B. Campos and A. B. Ferreira-Machado have contributed to the experimental data collection and analyses; D. C. Ferreira has contributed to analyses; M.G. Oliveira has contributed to experimental data collection and experimental design; V. L. Silva and C.G. Diniz have contributed to the experimental design, funding and data analyses.

Conflict of interest: the authors declare that they have no conflict of interest.

Abstract

Staphylococcus aureus is a major cause of health care associated infections worldwide. The aim of this work was to evaluate epidemiological characteristics and antimicrobial susceptibility of Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) strains isolates from infections in a Brazilian tertiary hospital. Clinical and epidemiological data of the patients were collected. Bacterial strains were isolated and identified using the classical identification tests. Antimicrobial susceptibility assays were performed using the disc-diffusion method. A total of 590 samples of *S. aureus* were isolated from patients and 42.5% were characterized as MRSA. Considering the clinical specimens, most of samples were isolated from blood and tracheal secretion, catheter tip, surgical site swabs, wound secretion, exudates and urine. Overall, a high frequency of resistance was observed against ciprofloxacin, clindamycin, erythromycin, amikacin, gentamicin, trimethoprim-sulfamethoxazole, tetracycline and chloramphenicol. Association between death and multidrug-resistance in elderly patients, and death and occurrence of bacteremia by multidrug-resistant MRSA was observed. Our data are highly relevant for surveillance systems

and to map on a wider scale the dynamics of circulation of MRSA and raise discussions on containment strategies and rational use of empiric chemotherapy.

IntroductiOn

The Gram positive cocci *Staphylococcus aureus* is one of the most common microorganisms isolated from infections related to health care around the world. This scenario has gotten worse over time due to an increase in antimicrobial resistance rate, especially to methicillin, a penicillinase-resistant semisynthetic penicillin, antimicrobial of choice for the treatment of infections caused by antimicrobial-resistant *S. aureus*.¹⁻³

Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) are resistant to other penicillins and may be resistant to other β -lactams such as cephalosporins, carbapenems and monobactams.⁴ These bacteria, initially related to infections associated to health care (hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* HA-MRSA), nowadays also represent a major problem in the community (community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CA-MRSA).^{5,6} While the community-associated MRSA diseases are related to skin infections, the more severe clinical infections are more frequently related to hospitalized patients.⁷

Although in Brazil, researches show a high frequency of MRSA colonization in patients with bacteremia,^{8,9} the most of the scientific data considering epidemiology and antimicrobial susceptibility patterns of MRSA to other antimicrobial, are originated in other countries. Thus, the available information is not, indeed, representative of the Brazilian reality, which makes difficult to guide the empirical chemotherapy. In this respect, considering the worldwide spread of MRSA and the lack of regional data on HA-MRSA epidemiology and antimicrobial susceptibility patterns, the aim of this study was to describe epidemiological characteristics and

antimicrobial susceptibility trends of MRSA strains associated to patients admitted to a tertiary hospital, between 2005 and 2010, in Brazil.

Materials and Methods

A total of 590 samples of *S. aureus* were isolated and identified from different clinical specimens from patients admitted between 2005 and 2010 to the teaching hospital at Federal University of Juiz de Fora, Brazil, and 42.5% (n=251) were characterized as MRSA. Considering only the non-replicate isolates, 103 MRSA strains were considered in this study (Table 1), which was approved by the Ethics Committee of the Federal University of Juiz de Fora (certificate no. 267/2011). Clinical and epidemiological data of the patients were collected from medical records and record books from the clinical microbiology laboratory Prof. Maurilio Baldi at the UFJF Teaching Hospital.

All the clinical specimens were inoculated in Mannitol Salt Agar (Difco, USA) with a 0.001 mL sterile loop and incubated at 35.5°C for up to 48 hours. Bacterial strains (3 to 5 colonies/clinical specimens) in monomicrobial cultures were isolated and identified using the classical identification tests.¹⁰ Antimicrobial susceptibility assays were performed on Mueller–Hinton agar (HiMedia) using the disc-diffusion method and growth inhibition zones were interpreted according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).¹¹ Antimicrobial discs amikacin (30µg), ciprofloxacin (5µg), clindamycin (2µg), chloramphenicol (30µg), erythromycin (15µg), gentamicin (10µg), trimethoprim-sulfamethoxazole (25µg), tetracycline (30µg) and vancomycin (30µg) were of commercial grade (Laborclin Ltda, Brazil). MRSA was detected by resistance to to ceftioxin (30µg) and oxacillin (1µg) disks. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 was used for quality control. Besides the descriptive analysis, univariate analysis were performed estimating the odds ratios (OR) with their respective 95% confidence intervals

(CI) to verify the associations between microbial resistance with discharged, transferred and deceased patients. The same analysis were performed among the type of MRSA infection and patient's age and outcome ($p < 0.05$). For means comparisons the Mann-Whitney test was used. The comparison of each factor was done by the non parametric Fisher's exact test.

Results

Detailed clinical and epidemiological characteristics of the patients are presented in table 1. Overall, 71% of bacteria were recovered from male patients and 29% from female. The average age was 54.4 years old. Overall, positive correlations between age or gender, and MRSA infected patients were not observed ($p = 1.00$). Although mainly associated to patients admitted in intensive care unit (43.7%), MRSA were also isolate from patients admitted to adult infirmary (28.1%), surgical unit (23.3%), pediatrics (3.9%) and bone marrow transplantation unit (1%). Considering the associated infections, 34% and 20.4% of the samples were isolated from respiratory tract and bacteremia infections, respectively. MRSA was also isolated from surgical site, catheter-related bacteremia, wound infections, infections of the musculoskeletal system, tract urinary and digestive system.

Considering the clinical specimens, most of samples were isolated from tracheal secretion and blood (26.2% and 23.3% respectively) followed by surgical site swabs, catheter tip, exudates, wound secretion and urine (Table 1). Regarding to the patients, 53.4% were discharged, 43.6% died and 3% were transferred to other hospitals. Overall, a high frequency of resistance was observed against ciprofloxacin (92.5%), clindamycin (89.7%), erythromycin (86.9%), amikacin (73.8%), gentamicin (70%), trimethoprim-sulfamethoxazole (63.5%), tetracycline (60.7 %) and chloramphenicol (52.3%). No bacterial resistance was observed against vancomycin (Figure 1). Association between death and multiresistant MRSA was observed in elderly patients (OR=3.57 - 95% CI: 0.3 - 38.8). Association was also

observed between death and the occurrence of bacteremia in patients with multiresistant MRSA (OR=1.57 - 95% CI: 0.2 - 10.4).

When considering MRSA occurrence over time and their antimicrobial susceptibility, alterations in the resistance patterns were observed. In 2005, from the tested drugs, the most effective antimicrobial was chloramphenicol, and high resistance levels were observed against amikacin, ciprofloxacin, clindamycin, erythromycin, gentamicin, trimethoprim-sulfamethoxazole and tetracycline. In 2006, increased resistance was observed against all tested drugs with rates of 100% resistance against ciprofloxacin, clindamycin, gentamicin, and trimethoprim-sulfamethoxazole. In the subsequent two years, decreased resistance was observed, especially in 2008, with exception for chloramphenicol in 2007. In 2009 it was observed high levels of sensitivity to amikacin, gentamicin, trimethoprim-sulfamethoxazole and tetracycline (90%). In 2010, there was a re-emergence of high resistance levels (100%), especially against ciprofloxacin, clindamycin and erythromycin. Considering amikacin, gentamicin, trimethoprim-sulfamethoxazole and tetracycline, although it has been observed an increased resistance compared to the previous year, the resistance rates remained relatively low (28.6%).

Discussion

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* has become a global problem and active surveillance for this pathogen, with appropriate prevention measures, can reduce its infections rates and reduce treatment costs.¹² This study showed the clinical epidemiology of MRSA isolates from inpatients, identifying the distribution of this pathogen in different settings, associated with gender and average and more age type of infection, clinical specimens, and patient evolution of a teaching hospital. The results obtained demonstrate there was no statistically significant difference when the mean age of patients was compared among the years

of the study ($p>0.05$). The incidence of MRSA infections is among the highest in the elderly population.¹³ Study conducted in Sacramento, EUA, demonstrated that the average age of health care associated-MRSA patients was 54, which was 15 years older than the average age of patients with community associated-MRSA.¹⁴

It is accepted that morbidity and mortality rates especially from infections with MRSA in bloodstream tend to be even greater in the elderly due to their physiological conditions and immunological status.¹⁵ The impact of methicillin-resistance on mortality among patients infected with *S. aureus* has been primarily evaluated in patients with bacteremia, and the results were variable.^{8,16} A meta-analysis involving studies with mortality data published between the years 1980 to 2000 was performed. Among 31 cohort studies including 3.963 patients, of whom 34% were infected with MRSA, there was a significant increase in mortality associated with bacteremia.¹⁷ Although there are few national data to compare our results, according to the literature methicillin-resistance significantly increased in the early 2000s in developed regions, such as the European countries¹⁸ and the USA¹⁹ and developing regions such as Latin America.²⁰

In Brazil, oxacillin is used as penicillinase-resistant semisynthetic penicillin, being oxacillin-resistant *S. aureus* (ORSA) equivalent to the MRSA strains in other regions. Reports from different hospitals between 1997 and 2001 with totalizing 1.516 *S. aureus* samples showed resistance rates of oxacillin resistance as of 3.8%.²¹ Reports comprising the period between 2005 and 2008, involving 2.218 samples, showed ORSA occurrence of 31.0%, and most of these bacteria were also resistant against erythromycin, clindamycin, ciprofloxacin, and levofloxacin.²² With regard to the ORSA observations, our data corroborate these previous studies. An increase in MRSA-associated hospital infections has been reported in intensive care units in USA, which ranged from only 2% in 1974 to rates of 22% in 1995 and 64% in 2004.²³ Subsequent studies showed stabilization in this tendency with rates of 56% between 2006 and 2007.²⁴

Another study conducted in a teaching hospital in the USA, which evaluated MRSA colonization or infections in hospitalized patients revealed that the most common types of infections were bacteremia (28%), pneumonia (20%), soft tissue infections (16%), and bones or joints infections (16%).²⁵ Overall, the most frequently reported risk factors related to the acquisition of MRSA bacteremia include previous antibiotic chemotherapy, prolonged stay in ICU, previous MRSA infection and colonization, use of invasive devices such as central venous catheters and urinary catheter, previous hospitalization and presence of co-morbidities.^{9,26}

The therapy used for MRSA infections is still rather limited. Some drugs have been used in recent years such as dalbavancin, linezolid, tigecycline and daptomycin.^{27,28} However, the use of vancomycin is still the choice for treatment of these infections. The increase use of glycopeptides has facilitated the selection of resistance and the high toxicity caused in the human body, have shown the necessity of the restricted use of these antimicrobials.^{29,30}

As a whole, the dynamics of antimicrobial resistance, observed in this study, show that the widespread use of ciprofloxacin, clindamycin and erythromycin should not be encouraged as the first empiric therapy option. By the other hand, the effectiveness of drugs such as chloramphenicol might be related to its low prescription over the years in our region. Based on results from antimicrobial susceptibility testing, the use of amikacin, gentamicin, tetracycline and trimethoprim-sulfamethoxazole should be sustained due to the variations observed for their effectiveness among the isolated bacteria.

We observed vancomycin as the most effective drug; other authors also suggest that it should be used only for serious infections, when other antimicrobials are without therapeutic effect.^{29,30} Historically, the occurrence of antimicrobial resistance is inevitable. This is due to the natural species evolution caused by environmental selective pressures. In this respect,

retrospective studies on antimicrobial susceptibility patterns should improve strategies to limit the emergence of multi-drug-resistant bacterial strains.

Our data are highly relevant not only for surveillance systems, but to map on a wider scale the dynamics of circulation of such microorganism and raise discussions on containment strategies and rational use of empiric chemotherapy.

Conclusion

This study showed relevant data on the levels of MRSA in critical areas and associated specimens respiratory tract secretions and blood. The high levels of antimicrobial resistance suggest the extent of the phenomenon and confirm data from the recent literature on the nature of the multidrug-resistant strains of *S. aureus*. Retrospective studies on antimicrobial susceptibility patterns should improve strategies to limit the emergence of multi-drug-resistant bacteria. Our data are highly relevant for surveillance systems and to map on a wider scale the dynamics of circulation of MRSA and raise discussions on containment strategies and rational use of empiric chemotherapy

References

1. Boucher HW, Corey GR. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin Infect Dis 2008; 46:344-9.
2. Morton AP, Clements AC, Doidge SR, et al. Surveillance of healthcare-acquired infections in Queensland, Australia: data and lessons from the first 5 years. Infect Control Hosp Epidemiol 2008;29:695-701.

3. Rosenthal VD, Maki DG, Mehta A, et al. International Nosocomial Infection Control Consortium report, data summary for 2002-2007, issued January 2008. *Am J Infect Control* 2008;36:627-37.
4. Ito T, Okuma K, Ma XX, Yuzama H, Hiramatsu K. Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. *Drug Resist. Updat* 2003;6:41-52.
5. Chambers HF. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? *Emerg. Infect. Dis* 2001;7:178-82.
6. Haley CC, Mittal D, Laviolette A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection or colonization present at hospital admission: multivariable risk factor screening to increase efficiency of surveillance culturing. *J Clin Microbiol* 2007;45:3031-38.
7. Gorwitz RJ, Kruszon-Moran D, McAllister SK, et al. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and update. *J Infect Dis* 2008;197:1226-34.
8. Conterno LO, Wey SB, Castelo A. Risk factors for mortality in *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1998;19:32-7.
9. Guilarde AO, Turchi MD, Martelli CM, Primo MG. *Staphylococcus aureus* bacteraemia: incidence, risk factors and predictors for death in a Brazilian teaching hospital. *J Hosp Infect* 2006; 63:330-6.
10. Bannerman TL, Peacock SJ. *Staphylococcus, Micrococcus* and other catalase-positive cocci. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, editors. *Manual of clinical microbiology*. 9th ed. Washington [DC]: ASM Press; 2007. pp 390-411.
11. Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twentieth informational supplement. CLSI document M100eMS20. Wayne [PA]. Clinical Laboratory Standards Institute; 2010.

12. Azeez-Akande O. Global trend of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and emerging challenges for control. *Afr J Clin Exper Microbiol* 2010;1:150-8.
13. Kuehnert MJ, Hill HA, Kupronis BA, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* hospitalizations, United States. *Emerg Infect Dis* 2005;11:868-72.
14. Huang H, Flynn NM, King JH, et al. Comparisons of Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and Hospital-Associated MRSA Infections in Sacramento, California. *J Clin Microbiol* 2006;44:2423-7.
15. High K. InfeUTIion as a cause of age-related morbidity and mortality. *Ageing Res Rev* 2004;3:1-14.
16. Selvey LA, Whitby M, Johnson B. Nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia: is it any worse than nosocomial methicillin sensitive *Staphylococcus aureus* bacteremia? *Infect Control Hosp Epidemiol* 2000;21:645-8.
17. Cosgrove SE, Sakoulas G, Perencevich EN, et al. Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2003;36:53-9.
18. European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS). 2005 <
<http://www.rivm.nl/earss/database.html>>
19. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report. Data summary from january 1992 through june 2004. *Am J Infect Control* 2004;32:470-85.
20. Diekema DJ, Pfaller MA, Scmitz FJ, et al. Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific Region for the SENTRY antimicrobial surveillance program, 1997-1999. *Clin Infect Dis* 2001;32:114-32.

21. Sader HS, Jones RN, Gales AC, et al. Sentry Group. Sentry antimicrobial surveillance program report: latinamerican and brazilian results for 1997 through 2001. *Braz J Infect Dis* 2004;8:25-79.
22. Gales AC, Sader HS, Ribeiro J, et al. Antimicrobial susceptibility of gram-positive bacteria isolated in brazilian hospitals participating in the SENTRY program (2005-2008). *Braz J Infect Dis* 2009;13:90-8.
23. Klevens RM, Edwards JR, Tenover FC, et al. Changes in the epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in intensive care units in US hospitals, 1992-2003. *Clin Infect Dis* 2006;42:389-91.
24. Hidron AI, Edwards JR, Patel J, et al. NHSN annual update: 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. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2008;29:996-1011.
25. Huang SS, Platt R. Risk of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection after previous infection or colonization. *Clin Infect Dis* 2003;36:281-5.
26. Carnicer-Pont D, Bailey KA, Mason BW, et al. Risk factors for hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia: a case-control study. *Epidemiol Infect* 2006;134:1167-73.
27. Aksoy DY, Unal S. New antimicrobial agents for the treatment of Gram-positive bacterial infections. *Clin Microbiol Infect* 2008;14:411-20.
28. Streit JM, Jones RN, Sader HS, Fritsche TR. 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). *Intern J Antimicrob Agents* 2004;24:111-8.

29. Hiramatsu K, Cui L, Kuroda M, Ito T. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Trends Microbiol 2001;9:486-93.

30. Rybak MJ. The pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of vancomycin. Clin Infect Dis 2006;42:35-9.

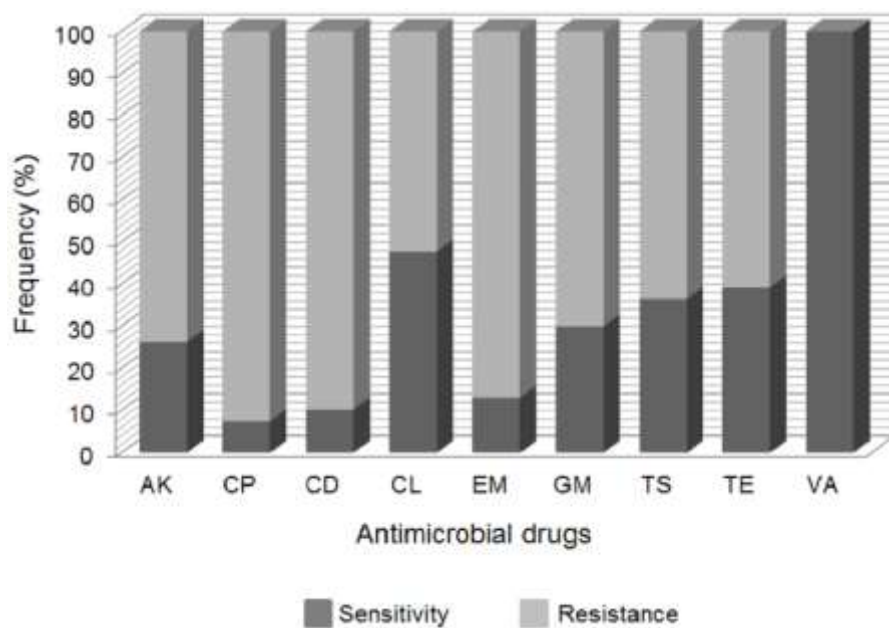


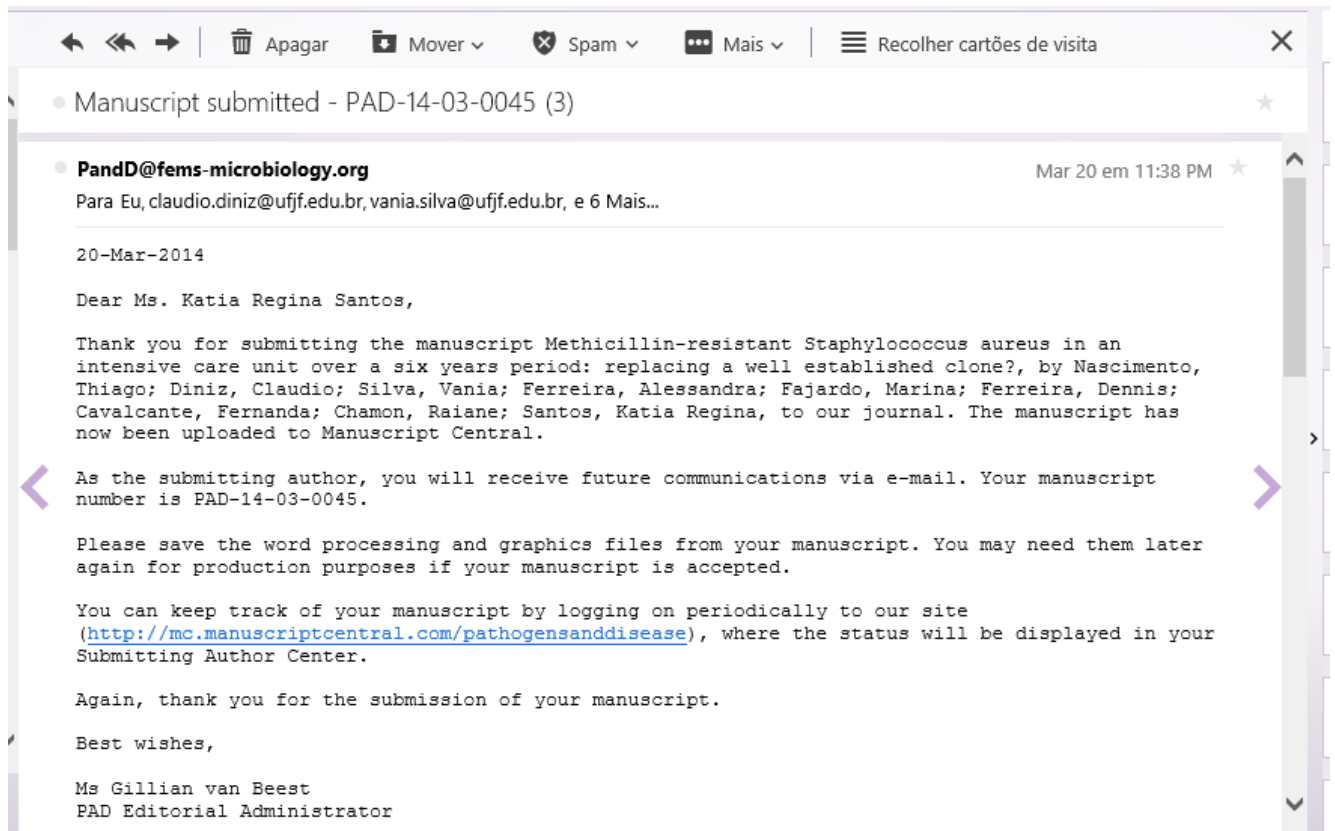
Figure 1. Antimicrobial resistance levels of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a tertiary hospital over a 6-year period. AK, amikacin; CP, ciprofloxacin; CD, clindamycin; CL, chloramphenicol; EM, erythromycin; GM, gentamicin, TS, trimethoprim-sulfamethoxazole; TE, tetracycline; VA, vancomycin.

Table 1. Epidemiological parameters and frequency of antimicrobial resistance in MRSA strains associated to patients admitted to a tertiary hospital over a 6-year period

Epidemiological parameters		Sampled period					
		2005 (n=25)	2006 (n=13)	2007 (n=27)	2008 (n=21)	2009 (n=10)	2010 (n=07)
Gender	Male	72.0%	69.2%	74%	66.6%	70.0%	71.4%
	Female	28.0%	30.8%	26%	33.4%	30.0%	28.6%
Average age (years)		50.2	54.9	52.2	56.5	58.5	64.4
Type of InfeUTIon	Bacteremia	4.0%	23.1%	22.2%	33.3%	30.0%	14.3%
	Catheter bacteremia	12.0%	30.7%	11.1%	14.3%	10.0%	0.0%
	Surgical Site	28.0%	0.0%	18.5	14.3%	0.0%	0.0%
	Wound infeUTIon	0.0%	0.0%	11.1%	4.8%	10.0%	14.3%
	Digestive system	8.0%	0.0%	7.4%	0.0%	0.0%	0.0%
	Musculoskeletal	8.0%	0.0%	3.8%	0.0%	0.0%	0.0%
	Respiratory system	36.0%	46.2%	18.5%	23.8%	50.0%	71.4%
	UTI	4.0%	0.0%	7.4%	9.5%	0.0%	0.0%
Clinical specimens	Blood	20.0%	15.4%	18.5%	38.1%	30.0%	14.3%
	Tracheal secretion	20.0%	30.8%	18.5%	14.3%	50.0%	71.4%

	Urine	4.0%	0.0%	7.5%	9.5%	0.0%	0.0%
	Catheter tip	16.0%	30.8%	11.1%	19.0%	10.0%	0.0%
	Exudates	12.0%	23.0%	22.2%	4.8%	10.0%	14.3%
	Surgical Site Swabs	28.0%	0.0%	22.2%	14.3%	0.0%	0.0%
Patient evolution	Discharged	56.0%	46.1%	55.5%	61.9%	30.0%	57.1%
	Death	36.0%	53.9%	44.5%	38.1%	60.0%	42.9%
	Transference	8.0%	0.0%	0.0%	0.0%	10.0%	0.0%
Hospital seUTIon	Infirmary	24.0%	23.1%	22.2%	42.9%	40.0%	14.3%
	Surgery	36.0%	23.1%	29.6%	14.3%	0.0%	14.3%
	Intensive care	36.0%	53.8%	44.4%	33.3%	50.0%	71.4%
	Pediatric	4.0%	0.0%	0.0%	9.5%	10.0%	0.0%
	BMT	0.0%	0.0%	3.8%	0.0%	0.0%	0.0%

APÊNDICE E – Artigo submetido em periódico internacional



Pathogens and Disease



<http://mc.manuscriptcentral.com/fems>

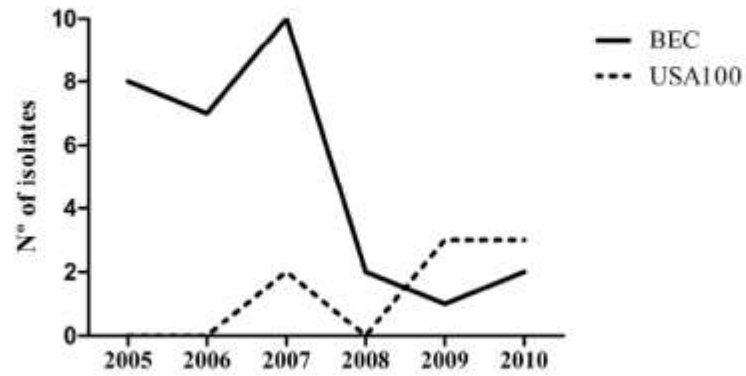
Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in an intensive care unit over a six years period: replacing a well established clone?

Journal:	<i>Pathogens and Disease</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Short Communication
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Nascimento, Thiaqo; Federal University of Juiz de Fora, Department of Parasitology, Microbiology and Immunology Diniz, Claudio; Federal University of Juiz de Fora, Department of Parasitology, Microbiology and Immunology Silva, Vania; Federal University of Juiz de Fora, Department of Parasitology, Microbiology and Immunology Ferreira, Alessandra; Federal University of Juiz de Fora, Department of Parasitology, Microbiology and Immunology Fajardo, Marina; Federal University of Juiz de Fora, Department of Parasitology, Microbiology and Immunology Ferreira, Dennis; Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes Cavalcante, Fernanda; Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes; Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes Chamon, Raiane; Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes Santos, Katia Regina; Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes
Keywords:	MRSA, SCCmec, PFGE lineage, clonal complex, ICU

SCHOLARONE™
Manuscripts

ScholarOne Support 1-434/964-4100

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



67x36mm (600 x 600 DPI)

1
2
3 **Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in an intensive care unit over a six**
4 **years period: replacing a well established clone?**
5
6

7
8
9 Thiago C. Nascimento¹, Cláudio G. Diniz¹, Vânia L. da Silva¹, Alessandra B. Ferreira-
10 Machado¹, Marina O. Fajardo¹, Dennis C. Ferreira², Fernanda S. Cavalcante², Raiane C.
11 Chamon² & Kátia R. N. dos Santos²
12
13
14
15
16
17

18 ¹Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, Universidade Federal de
19 Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil
20

21 ²Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio
22 de Janeiro, Brazil
23
24
25
26
27

28
29 **Correspondence**
30

31 Kátia Regina Netto dos Santos, PhD
32

33 Laboratório de Infecção Hospitalar, Departamento de Microbiologia Médica, Instituto
34 de Microbiologia Paulo de Góes, CCS, Bloco I, Sal 010, UFRJ, Cidade Universitária,
35 Rio de Janeiro, RJ, Brazil. Phone/fax number: +55 21 2560 8344/+55 21 2560 8028.
36
37 E-mail: santoskrn@micro.ufrj.br (K.R. Netto dos Santos)
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47

48 **Keywords:** MRSA; SCC_{mec}; PFGE lineages; clonal complex; ICU.
49

50 **Running title:** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in ICU
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60**Abstract**

This study aimed to characterize 45 MRSA isolates from a Brazilian intensive care unit (ICU), between 2005 and 2010, in relation to their drugs susceptibility, SCCmec types, and genotypic diversity and clonal complexes. Except to vancomycin and linezolid high rates of resistance were found to others nine drugs tested, which MIC₉₀ values were >16 µg/mL. SCCmec types III (66.7%), II (17.8%), IV (4.4%), I (2.2%) and non typeable SCCmec (8.9%) were found. Most (66.7%) of the isolates were related to the Brazilian epidemic clone (BEC) CC8/SCCmec III, which was prevalent between 2005 and 2008, whereas the USA100/CC5/SCCmec II lineage emerged in 2007 and was more frequent in 2009 and 2010 in the ICU. Isolates carrying the SCCmec type IV (USA400/CC1 and USA800/CC5 lineages) and I (USA500/CC5) were also detected. This study showed the BEC/CC8/SCCmec III as the main cause of ICU associated MRSA infections and the emergence of USA100/CC5 isolates that may be replacing the BEC in this hospital unit.

Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is one of the major cause of healthcare-associated infections worldwide and is associated with significant morbidity, mortality and increased costs of treatments, especially in intensive care units (ICUs) (Raineri et al., 2007). Resistance to methicillin in *S. aureus* isolates is a growing problem and more than 30% of isolates from ICUs are methicillin-resistant (Raineri et al., 2007). In Brazil these rates can be reach up to 60% (Ribas et al., 2009). Methicillin resistance is due to the *mecA* gene, located in a staphylococcal cassette chromosome (SCCmec) and the most frequent types are I, II, III and IV (Chambers & Deleo, 2009). Healthcare-associated MRSA infections are generally caused by multidrug-resistant isolates harbouring the SCCmec types II or III (Schuenck et al., 2012; Teixeira et al., 2012).

1
2
3 In Brazil, although isolates related to the Brazilian epidemic clone
4 (BEC)/SCC*mec*III/CC8 have caused about 90% of hospital-acquired staphylococcal
5 infections (Vivoni et al., 2006), at the last decade an increased occurrence of nosocomial
6 infections due to isolates carrying the SCC*mec* IV has been documented (Silva-
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

York/Japan) clone carrying the SCC*mec* type II has also been detected in Brazilian hospitals but related to less than 4% of isolates (Teixeira et al., 2012; Cavalcante et al., 2014).

Although the characterization of nasal MRSA isolates from patients from ICU have been described (Robicsek et al., 2008; Cavalcante et al., 2014), there are few studies that performed molecular characterization of isolates from infections in an ICU (Teixeira et al., 2012; Caboclo et al., 2013). Since in Brazil, there have not been described studies involving isolates from infections in ICU, we investigated the phenotypic and molecular characteristics of MRSA isolates from infection sources of patients admitted to a ICU.

This study was conducted at a teaching hospital in Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil, a tertiary institution with 146 beds, being six of them in an Intensive Care Unit (ICU). The MRSA isolates were obtained from the ICU, between 2005 and 2010, of different sources as tracheal secretion (53.3), blood (20%), catheter tip (13.4%), and others (13.3%) (Table 1). Bacterial identification and susceptibility to methicillin were determined at the hospital laboratory by classical identification tests (Bannerman & Peacock, 2007) and cefoxitin disk diffusion (CLSI, 2010), respectively.

Antimicrobial susceptibility was tested for azithromycin, clindamycin, chloramphenicol, erythromycin, levofloxacin, linezolid, gentamicin, rifampin, tetracycline, trimethopim/sulfamethoxazole (SXT) and vancomycin (Sigma-Aldrich, St

1
2
3 Louis, MO) by the disk diffusion test and the broth microdilution test, to determine the
4
5 Minimum Inhibitory Concentration (MIC), as recommended by the CLSI (2010).
6

7
8 Bacterial DNA was extracted as previously described (Pitcher et al., 1989) and
9
10 determination of *SCCmec* types was performed according to Milheiro et al. (2007).
11
12 All MRSA isolates were typed by PFGE after digestion of whole-cell DNA with *Sma*I
13
14 in a CHEF-DRIII system (Bio-Rad, Richmond, CA), as previously described (Vivoni et
15
16 al., 2005). Cluster analysis was assessed using the unweighted pair group methodology
17
18 based on the Dice coefficient. PFGE type clusters were defined using a coefficient of
19
20 similarity of 80%, and the visual interpretation was done using the criteria of Van
21
22 Belkum et al. (2007). The clonality of the isolates was obtained by comparison with
23
24 previously published pictures (McDougal et al., 2003). One isolate representative of
25
26 each PFGE profile was chosen for characterization of the clonal complex (CC),
27
28 according to Cockfield et al. (2007). Statistical comparisons were performed by analysis
29
30 of contingency tables using Fisher's exact test; significance was established at 5% ($P <$
31
32 0.05).
33
34

35
36 Considering only the non-replicate isolates, a total of 45 MRSA isolates were
37
38 recovered from ICU-admitted patients, between 2005 and 2010. Except to vancomycin
39
40 and linezolid ($MIC_{90} = 2.0\mu\text{g/mL}$) high rates of resistance were found to others nine
41
42 antimicrobials tested, which MIC_{90} values were $>1024.0\mu\text{g/mL}$ for azithromycin,
43
44 clindamycin and gentamicin, $512.0\mu\text{g/mL}$ for erythromycin, $256.0\mu\text{g/mL}$ for rifampin,
45
46 $128.0/2432.0\mu\text{g/mL}$ for SXT, $64.0\mu\text{g/mL}$ for tetracycline and chloramphenicol,
47
48 and $16.0\mu\text{g/mL}$ for levofloxacin (Table 1).
49

50
51 Among the 45 MRSA isolates evaluated, 30 (66.7%) harbored the *SCCmec* III, 8
52
53 (17.8%) the *SCCmec* II, 2 (4.4%) the *SCCmec* IV and 1 (2.2%) the *SCCmec* I. Non
54
55 typeable *SCCmec* was found in 4 (8.9%) MRSA isolates. In general, the *SCCmec* types
56
57
58
59
60

1
2
3 III and II isolates presented high resistance rates for antimicrobials, except to SXT, for
4
5 which resistance was of 90% among type III isolates and of 12.5% for the type II ones
6
7 (p<0.0001) (data not shown).

8
9
10 *S. aureus* isolates carrying SCCmec III were associated to 22 PFGE pulsotypes,
11
12 which were related to the BEC/clonal complex (CC) 8 (Table 2). All the 8 isolates that
13
14 carried the SCCmec II were related to the USA100/CC5 lineage. The two isolates that
15
16 carried the SCCmecIV belonged to two lineages related to the USA400/CC1 and
17
18 USA800/CC5. The SCCmec I isolate was associated to USA500/CC5 and others four
19
20 MRSA isolates were not related to any clonality already described.

21
22
23 Over the time, there was a variation in the occurrence of MRSA isolates related
24
25 to the two frequent lineages, BEC/CC8 and USA100/CC5. Figure 1 shows that this
26
27 temporal variation occurred between 2005 and 2010, highlighting an initial
28
29 dissemination of BEC isolates until 2008, with prevalence of them of 77% among the
30
31 isolates, followed by spread of USA100 isolates that emerged in 2007 and were
32
33 prevalent (60%) in 2009 and 2010. The USA400, USA500 and USA800 sporadic
34
35 lineages occurred in 2008.

36
37
38 Brazilian studies have evaluated the epidemiology of MRSA and indicated that a
39
40 number of lineages restricted to other continents are emerging in our hospitals
41
42 (Schuenck et al., 2012; Caboclo et al., 2013) In Brasil, Cavalcante et al. (2014)
43
44 characterized different MRSA lineages from nasal colonization circulating within a
45
46 teaching hospital (Cavalcante et al., 2014). However, to our knowledge, this is the first
47
48 study that investigated molecular characteristics of MRSA isolates from infections in a
49
50 Brazilian ICU.

51
52
53 In this study, except for vancomycin and linezolid, and SXT, for which
54
55 SCCmec type II isolates were mainly susceptible, high rates of resistance were verified
56
57
58
59
60

1
2
3 against the antimicrobials evaluated among the prevalent lineages. This fact can be
4 related to the presence of *SCCmec* types III and II isolates that, in general, carry many
5 resistance genes and were found among 89% of isolates in the present study. These
6 resistance profiles were related to the BEC/CC8 and USA100/CC5 lineages,
7
8 respectively. BEC in Brazilian hospitals represents about 90% of type III isolates among
9 that obtained of infections (Schuenck et al., 2012; Teixeira et al., 2012) and 77% among
10 isolates from nasal colonization (Cavalcante et al., 2014). However, regarding ICU
11 isolates the data are rare. Some studies have showed percentages of BEC isolates
12 ranging from 57% (Teixeira et al., 2012) to 78% (Oliveira et al., 2001) in infections, but
13 these isolates had been obtained in global evaluations of MRSA isolates within the
14 hospital. Anyway, our findings were similar to found by these authors since we found
15 66.7% of BEC isolates in the ICU, a lineage very well adapted to the hospital
16 environment, where antibiotics are frequently used (Deuremberg & Stobberingh, 2008).
17
18

19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

MRSA isolates carrying *SCCmec* type II represented 17.8% from ICU isolates and although the great sensibility to SXT they presented multiresistance profiles very similar to BEC isolates. All type II isolates belonged to the USA100/CC5, a lineage very found in USA hospitals (Tenover et al., 2012) and that is occurring in Brazilian hospitals (Silva-Carvalho et al., 2009; Caboclo et al., 2013). In 2007, MRSA isolates harboring the *SCCmec* types II emerged in our ICU and were prevalent (60%) in 2009 and 2010, replacing the BEC that was more frequently found (77%) between 2005 and 2008. Interestingly although the prevalence of USA100/CC5/type II isolates in Brazil is still very low (Teixeira et al., 2012; Cavalcante et al., 2014), a study performed by our group in a public hospital in Rio de Janeiro showed that among MRSA isolates carrying the *SCCmec* II, 85% was related to this lineage (Caboclo et al., 2013). It is important to mention that the spread of this lineage can be facilitated by the characteristics of the

1
2
3 methicillin resistance, since its *mec* cassette is smaller than type III cassette and thus
4
5 may favor a more rapid bacterial growth.
6

7
8 Although the prevalence of BEC/type III and USA100/type II lineages, a variety
9
10 of lineages were identified in the present study, including two *SCCmec* type IV isolates,
11
12 each one related to USA400/CC1 or USA800/CC5, and one *SCCmec* I isolate that was
13
14 associated to USA500/CC5. The great genetic diversity found among MRSA isolates
15
16 from ICU patients can be explained by a high turnover of patients who are transferred
17
18 from different hospital wards to this unit (Cavalcante et al., 2014).
19

20
21 Isolates carrying the *SCCmec* type IV are found primarily among MRSA isolates
22
23 from community individuals, who do not have traditional risk factors, such as prolonged
24
25 hospitalization, intravenous drug use, or immunosuppression (Tavares et al., 2010).
26
27 However, the occurrence of the USA400/CC1 and USA800/CC5 lineages has been
28
29 already described in hospitals in Brazil (Schuenck et al., 2012; Caboclo et al., 2013) and
30
31 worldwide (Huang et al., 2007; Abdel-Haq et al., 2009). Moreover, in general, isolates
32
33 that carry the *SCCmec* type IV exhibit sensitivity to most antimicrobials (Martinez-
34
35 Aguilar et al., 2003). However, as just described in Brazilian previous studies (Silva-
36
37 Carvalho et al., 2009; Caboclo, 2013; Cavalcante et al., 2014) our type IV isolates
38
39 presented resistant to many antimicrobials.
40
41

42
43 In summary, our results confirmed the predominance of BEC as the main cause
44
45 of ICU-associated MRSA infections. However the emergence of USA100/CC5 isolates
46
47 that may be replacing the BEC in this hospital unit was also observed. Moreover,
48
49 *SCCmec* type IV isolates, traditionally community, were also detected.
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Acknowledgments

The authors are grateful to the Programa de Pós-Graduação em Saúde – Universidade Federal de Juiz de Fora (PPGS/UFJF), Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for financial support. The authors are also grateful to staff from the Laboratory Prof. Maurilio Baldi, and Suzane F. Silva, Pedro P. Castro, Débora M. Coelho, for technical help with the medical records and record books from the clinical microbiology laboratory.

References

- Abdel-Haq N, Al-Tatari H, Chearskul P, Salimnia H, Asmar BI, Fairfax MR & Anjad M (2009) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in hospitalized children: correlation of molecular analysis with clinical presentation and antibiotic susceptibility testing (ABST) results. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **28**:547-551.
- Bannerman TL & Peacock SJ (2007) *Staphylococcus*, *Micrococcus* and other catalase-positive cocci. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, editors. *Manual of clinical microbiology*, 9th ed, pp. 390-411. Washington [DC]: ASM Press.
- Caboclo RMF, Cavalcante FS, Iorio NLP, Schuenck RP, Olendzki AN, Felix MJ, Chamon RC & Santos KRN (2013) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Rio de Janeiro hospitals: dissemination of the USA400/ST1 and USA800/ST5 SCCmec type IV and USA100/ST5 SCCmec type II lineages in a public institution and polyclonal presence in a private one. *Am J Infect Control* **41**:21-26.

- 1
2
3 Cavalcante FS, Schuenck RP, Ferreira DC, Costa CR, Nouér SA & Santos KRN (2014)
4
5 Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*: spread of specific lineages among
6
7 patients in different wards at a Brazilian teaching hospital. *J Hosp Infect* **86**:151-154.
8
9
10 Chambers HF & Deleo FR (2009) Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the
11
12 antibiotic era. *Nat Rev Microbiol* **7**:629-641.
13
14 Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) (2010) Performance standards for
15
16 antimicrobial susceptibility testing: Twentieth informational supplement. CLSI
17
18 document M100eMS20. Wayne [PA]: Clinical Laboratory Standards Institute.
19
20
21 Cockfield JD, Pathak S, Edgeworth JD & Lindsay JA (2007) Rapid determination of
22
23 hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineages. *J Med*
24
25 *Microbiol* **56**:614-619.
26
27
28 Deuremberg RH & Stobberingh EE. The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infect*
29
30 *Genet Evol* **8**:747-763.
31
32
33 Huang YH, Tseng SP, Hu JM, Tsai JC, Hsueh PR, & Teng LJ (2007) Clonal spread of
34
35 SCCmec type IV methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* between community
36
37 and hospital. *Clin Microbiol Infect* **13**:717-724.
38
39
40 Martinez-Aguilar G, Hammernan WA, Mason Jr EO & Kaplan SL (2003) Clindamycin
41
42 treatment of invasive infections caused by community-acquired, methicillin-resistant
43
44 and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in children. *Pediatr Infect Dis J*
45
46 **22**: 593-598.
47
48
49 McDougal LK, Steward CD, Killgore GE, Chaitram JM, McAllister SK & Tenover FC
50
51 (2003) Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus*
52
53 *aureus* isolates from the United States: establishing a national database. *J Clin*
54
55 *Microbiol* **41**:5113-5120.
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- Milheiriço C, Oliveira DC & de Lencastre H (2007) Update to the multiplex PCR strategy for assignment of mecelement types in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **51**:3374-3377.
- Oliveira GA, Faria JB, Levy CE & Mamiçuka EM (2001) Characterization of the Brazilian Endemic Clone of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from Hospitals Throughout Brazil. *Braz J Infect Dis* **5**:163-170.
- Pitcher DG, Saunders NA & Owen RJ (1998) Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Lett Appl Microbiol* **8**:151-156.
- Raineri E, Crema L & De Silvestri (2007) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* control in an intensive care unit: a 10 year analysis. *J Hosp Infect* **67**:308-315.
- Ribas RM, Freitas C & Gontijo Filho PP (2009) Nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia in a tertiary care hospital: Risk factors, overall mortality and antimicrobial resistance. *Int J Med* **1**:412-417.
- Robicsek A, Suseno M, Beaumont JL, Thomson RB & Peterson LR (2008) Prediction of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* involvement in disease sites by concomitant nasal sampling. *J Clin Microbiol* **46**: 588-592.
- Silva-Carvalho MC, Bonelli RR & Souza RR (2009) Emergence of multiresistant variants of the community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineage ST1-SCCmec IV in 2 hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis* **65**:300-305.
- Schuenck RP, Cavalcante FS, Emery E, Marval MG & Santos KR (2012) *Staphylococcus aureus* isolates belonging to different multilocus sequence types present specific virulence gene profiles. *FEMS Immunol Med Microbiol* **65**:501-504.

- 1
2
3 Tavares DA, Sá-Leão R, Miragaia M & De Lencastre H (2010) Large screening of CA-
4 MRSA among *Staphylococcus aureus* colonizing healthy young children living in
5 two areas (urban and rural) of Portugal. *BMC Infect Dis* **10**:110.
6
7
8
9
10 Teixeira MM, Araújo MC, Silva-Carvalho MC, Beltrame CO, Oliveira, CCHB,
11 Figueiredo MAS & Oliveira, AG (2012) Emergence of clonal complex 5 (CC5)
12 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates susceptible to
13 trimethoprim-sulfamethoxazole in a Brazilian hospital. *Braz J Med Biol Res* **45**:637-
14 643.
15
16
17
18
19
20
21 Tenover FC, Tickler IA, Goering RV, Kreiswirth, BN, Mediavilla JR & Persing DH
22 (2012) Characterization of nasal and blood culture isolates of methicillin-resistant
23 *Staphylococcus aureus* from patients in United States hospitals. *Antimicrob Agents*
24 *Chemother* **56**:1324-1330.
25
26
27
28
29
30 Van Belkum A, Tassios PT, Dijkshoorn L & European Society of Clinical
31 Microbiology and Infectious Diseases (ESC-MID) Study Group on Epidemiological
32 Markers (ESGEM) (2007) Guidelines for the validation and application of typing
33 methods for use in bacterial epidemiology. *Clin Microbiol Infect* **13**:1-46.
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
- Vivoni AM, Santos KRN, de-Oliveira MP, Giambiagi-deMarval M, Ferreira ALP, Riley
LW & Moreira BM (2005) Mupirocin for controlling methicillin-resistant
Staphylococcus aureus: lessons from a decade of use at a university hospital. *Infect*
Control Hosp Epidemiol **26**:662-667.
- Vivoni AM, Diep BA, Magalhães ACG, Santos KR, Riley LW, Sensabaugh GF &
Moreira BM (2006) Clonal composition of *Staphylococcus aureus* isolates at a
Brazilian University Hospital: identification of international circulating lineages. *J*
Clin Microbiol **44**:1686-1691.

Table 1 Antimicrobial resistance of 45 MRSA isolates from a Brazilian ICU, between 2005 and 2010

Antimicrobial agent	Minimal Inhibitory Concentration ($\mu\text{g/mL}$)			No (%) of resistant isolates
	MIC ₅₀	MIC ₉₀	Range	
Azithromycin	>1024.0	>1024.0	0.5 – >1024.0	44 (97.7)
Chloramphenicol	32.0	64.0	4.0 – 128.0	30 (66.6)
Clindamycin	>1024.0	>1024.0	512.0 – >1024.0	45 (100)
Erythromycin	512.0	512.0	256.0 – 512.0	45 (100)
Gentamicin	128.0	1024.0	0.125 – >1024.0	40 (88.8)
Levofloxacin	4.0	16.0	2.0 – 32.0	45 (100)
Linezolid	2.0	2.0	1.0 – 2.0	0 (0)
Rifampin	2.0	256.0	0.0625 – >1024.0	40 (88.8)
Tetracycline	32.0	64.0	0.0625 – 128.0	35 (77.7)
Trimethoprim/sulfamethoxazole	32.0/608.0	128.0/2432.0	0.0625/2.3 - 1024.0/19456.0	32 (71.1)
Vancomycin	1.0	2.0	0.5 – 2.0	0 (0)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Table 2 General characteristics of 45 MRSA isolates from a Brazilian ICU, between 2005 and 2010

Isolation year (No. of isolates)	Clinical source (No. of isolates)	Antimicrobial Resistance Profile (No. of isolates) ^a	SCC _{mec} type (No. of isolates)	Genotype (No. of isolates) ¹	Clonality/CC (No. of isolates) ^{2,3}
2005 (9)	TS (4), Blood (3), Urine (1), PL (1)	Azi/Gen/Rif/Sxt/Tet (5), Azi/Chl/Gen/Rif/Sxt/Tet (4)	III (8), NT (1)	H1 (2), A2 (1), H2 (1), J2 (1), M1 (1), L1 (1), C2 (1), O1 (1)	BEC/8 (8), ND (1)
2006 (7)	TS (4), CT (2), Blood (1)	Azi/Chl/Gen/Rif/Sxt/Tet (3), Azi/Gen/Rif/Sxt/Tet (3), Azi/Chl/Gen/Rif (1)	III (7)	C1 (2), D1 (1), K1 (1), D2 (1), A3 (1), A1 (1)	BEC/8 (7)
2007 (12)	TS (5), Blood (3), PL (2), SS (1), CT(1)	Azi/Chl/Gen/Rif/Sxt/Tet (9), Azi/Chl/Gen/Rif/Sxt (1), Azi/Gen/Rif/Tet (1), Azi/Gen/Rif (1)	III (10), II (2)	C2 (1), B1 (1), C3 (1), H1 (1), J1 (1), G1 (1), B2 (1), A2 (1), E1 (1), G2 (1), E2 (1), C4 (1)	BEC/8 (10), USA100/5 (2)
2008 (7)	CT (3), TS (2), Blood (1), SS (1)	Azi/Chl/Gen/Rif/Sxt/Tet (1), Azi/Chl/Gen/Sxt/Tet (1), Azi/Chl/Rif/Tet (1), Gen/Sxt/Tet (1), Azi/Gen/Rif (1), Azi/Gen(1), Azi/Sxt (1)	III (2), IV (2), I (1), NT (2)	H1 (2), N1 (1), Q1 (1), T1 (1), S1 (1), R1 (1)	BEC/8 (2), USA500/1(1), USA800/5 (1), USA400/1(1), ND (2)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figure legend

Fig. 1 Temporal variation of BEC/CC8 and USA100/CC5, MRSA prevalent lineages in ICU from a Brazilian teaching hospital in Minas Gerais, Brazil.

For Peer Review

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48

2009 (5)	TS (5)	Azi/Chl/Gen/Rif/Tet (2), Azi/Chl/Gen/Rif/Sxt/Tet (1), Azi/Chl/Rif/Tet (1), Azi/Chl/Rif (1)	II (3), III (1), NT (1)	F1 (2), H1 (1), G1 (1), P1 (1)	USA100/5 (3), BEC/8 (1), ND (1)
2010 (5)	TS (4), Blood (1)	Azi/Chl/Gen/Rif/Sxt/Tet (2), Azi/Chl/Gen/Rif/Tet (1), Azi/Rif (1), Azi (1)	II (3), III (2)	F1 (3), II (1), F2 (1)	USA100/5 (3), BEC/8 (2)

Azi, azithromycin; Chl, chloramphenicol; Cli, clindamycin; Ery, erythromycin; Gen, gentamicin; Lev, levofloxacin; Rif, rifampin; Sxt, sulfamethoxazole/trimethoprim; Tet, tetracycline; CT, catheter tip; TS, tracheal secretion; PL, peritoneal liquid; SS, surgical site; CC, clonal complex; NT, non typeable; ND, not determined.

¹All isolates were resistant to levofloxacin, clindamycin and erythromycin

²Defined by pulsed-field gel electrophoresis according to Van Belkum et al, 2007.

³According to McDougal et al, 2003.

⁴According to Cockfield et al, 2007.

APÊNDICE F – Outras atividades acadêmico-científicas desenvolvidas no período de dezembro de 2010 a abril de 2014

1. Artigos:

1.1. Autoria:

- Potential spread of multidrug-resistant coagulase-negative staphylococci harbouring *mecA* gene through healthcare waste.

1.2. Co-autoria:

- Antimicrobial susceptibility patterns of *Gardnerella vaginalis* and vaginolysin gene in isolates from women with symptomatic bacterial vaginosis and asymptomatic patients.
- Optimization of prokaryotic RNA yield for transcriptional analysis of *Bacteroides fragilis* in experimental infeUTIOn.
- Descontaminação de escovas dentais com uma solução de cloreto de sódio à 10%.

2. Resumos publicados em anais de congresso:

2.1. Internacionais:

- **NASCIMENTO, T.C.**; SILVA, V.L.; FONTES, C.O.; PAIVA, M.R.B.; FAJARDO, M.O.; FORTUNATO, S.O.; OLIVEIRA, T.L.R.; CASTRO, P.P.; SILVA, S.F.; DINIZ, C.G. Antimicrobial Susceptibility Patterns and Virulence Characteristics of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolated in a Tertiary Hospital from 2005 to 2010. In: 113th General Meeting - American Society for Microbiology, 2013, Denver. ASM 2013 - Abstracts, 2013.
- SOUZA, D.M.K.; DINIZ, C.G.; OLIVEIRA, L.M.A.; COELHO, D.M.; TALHA, L.S.; **NASCIMENTO, T.C.**; FERREIRA-MACHADO, A.B.; SILVA, V.L. Antimicrobial Susceptibility Patterns of *Gardnerella vaginalis* and Vaginolysin Gene in Isolates from Women with Symptomatic Bacterial Vaginosis and Asymptomatic Patients. In: 113th General Meeting - American Society for Microbiology, 2013, Denver. ASM 2013 - Abstracts, 2013.

- FREITAS, M.C.R.; FERREIRA-MACHADO, A.B.; REZENDE, A.B.; OLIVEIRA, L.M.A.; NASCIMENTO, T.C.; GAMEIRO, J.; SILVA, V.L.; DINIZ, C.G. Experimental Infection Model to Study Drug-Bacteria Interactions: Colonization and Physiological Characteristics of *Bacteroides fragilis* Exposed to Subinhibitory Concentrations of Metronidazole. In: 113th General Meeting - American Society for Microbiology, 2013, Denver. ASM 2013 - Abstracts, 2013.
- NASCIMENTO, T.C.; ARAUJO, M.L.; CASTRO, P.P.; CAMPOS, M.B.; FAJARDO, M.O.; SILVA, S.F.; OLIVEIRA, M.G.; SILVA, V.L.; DINIZ, C.G. Aspectos epidemiológicos e susceptibilidade aos antimicrobianos de linhagens de *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina isoladas em um hospital terciário. In: XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia - Programa e Resumos, 2012, Santos-SP. XXI ALAM - Congresso Latinoamericano de Microbiologia, 2012. p. 74.
- NASCIMENTO, T.C.; FORTUNATO, S.O.; OLIVEIRA, T.L.R.; CASTRO, P.P.; OLIVEIRA, L.M.A.; SILVA, S.F.; SILVA, V.L.; DINIZ, C.G. Correlação entre susceptibilidade a antimicrobianos e determinantes de virulência em linhagens de MRSA multirresistentes isoladas em um hospital terciário. In: XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia - Programa e Resumos, 2012, Santos-SP. XXI ALAM - Congresso Latinoamericano de Microbiologia, 2012. p. 74.
- SOUZA, D.M.K.; JUNQUEIRA, M.L.; NASCIMENTO, T.C.; SILVA, V.L.; OLIVEIRA, M.G. Detecção de marcadores fenotípicos de resistência em linhagens da família *Enterobacteriaceae* isoladas em um hospital terciário. In: XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia - Programa e Resumos, 2012, Santos-SP. XXI ALAM - Congresso Latinoamericano de Microbiologia, 2012. p. 168.
- FREITAS, M.C.R.; FERREIRA-MACHADO, A.B.; MELO, J.; REZENDE, A.B.; CASTRO, P.P.; NASCIMENTO, T.C.; SILVA, V.L.; DINIZ, C.G. Adequação de modelo experimental para o estudo in vivo da interação entre *Bacteroides fragilis*, antimicrobianos e hospedeiros. In: XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia, 2012, Santos-SP. XXI ALAM - Congresso Latinoamericano de Microbiologia - Programa e Resumos, 2012. p. 83.

2.2. Nacionais:

- NASCIMENTO, T.C.; FONTES, C.O.; ARAUJO, M.L.; FAJARDO, M.O.; PAIVA, M.R.B.; FORTUNATO, S.O.; CASTRO, P.P.; OLIVEIRA, T.L.R.; SILVA, S.F.; SILVA, V.L.; DINIZ, C.G. Aspectos epidemiológicos, da virulência e resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* resistentes a oxacilina isoladas de Unidade de Terapia Intensiva. In: 27º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2013, Natal, RN. ANAIS DO 27º CBM 2013, 2013.

- FREITAS, M.C.R.; FERREIRA-MACHADO, A.B.; REZENDE, A.B.; OLIVEIRA, L.M.A.; NASCIMENTO, T.C.; ANDRADE, A.B.; FERREIRA, L.F.; SILVA, V.L.; DINIZ, C.G. Avaliação dos Níveis Populacionais de *Bacteroides fragilis* em Modelo de Infecção Experimental após Exposição à Concentração Subinibitória de Metronidazol. In: 27º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2013, Natal, RN. ANAIS DO 27º CBM 2013, 2013.
- SOUZA, D.M.K.; DINIZ, C.G.; OLIVEIRA, L.M.A.; COELHO, D.M.; TALHA, L.S.; CASTRO, P.P.; NASCIMENTO, T.C.; FERREIRA-MACHADO, A.B.; SILVA, V.L. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de linhagens de *Gardnerella vaginalis* isoladas de pacientes com e sem vaginose bacteriana em Juiz de Fora/MG. In: III Congresso Latino-Americano de Resistência Microbiana e X Sul Encontro de Controle de Infecção, 2013, Gramado/RS. Journal of Infection Control, 2013. v. 2.
- NASCIMENTO, T.C.; FORTUNATO, S.O.; OLIVEIRA, T.L.R.; CAMPOS, M. B.; COELHO, D.M.; SILVA, V.L.; DINIZ, C.G. Tolerância a metais tóxicos e possível associação com resistência múltipla a antimicrobianos em linhagens de MRSA isoladas de um hospital terciário. In: 26º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2011, Foz do Iguaçu, PR. Anais do 26º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2011.
- NASCIMENTO, T.C.; FORTUNATO, S.O.; OLIVEIRA, T.L.R.; SILVA, S.F.; SILVA, V.L.; DINIZ, C.G. Correlação entre susceptibilidade a antimicrobianos e produção de biofilme em linhagens de MRSA isoladas em um hospital terciário. In: 26º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2011, Foz do Iguaçu, PR. Anais do 26º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2011.

3. Participação em eventos:

3.1. Internacionais:

- 113th General Meeting - American Society for Microbiology. 2013.
- XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia. 2012.
- III Simpósio Internacional de Microbiologia Clínica. 2012.

3.2. Nacionais:

- 27º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2013.
- XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia. 2012.

- 26º Congresso Brasileiro de Microbiologia. 2011.

4. Atividades docentes:

4.1. Docência:

- Professor Substituto – Departamento de Enfermagem Básica – Faculdade de Enfermagem – Universidade Federal de Juiz de Fora.

Período: março de 2014 – atualmente

Disciplinas Ministradas: Fundamentos de Enfermagem I; Fundamentos de Enfermagem II; Administração em Enfermagem I; Administração em Enfermagem II.

- Professor Substituto – Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia – Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Juiz de Fora.

Período: março de 2010 – dezembro de 2011

Disciplinas Ministradas: Microbiologia Geral (Odontologia); Microbiologia Aplicada à Odontologia (Odontologia); Microbiologia Geral e Aplicada (Enfermagem); Microbiologia I (Medicina); Bacteriologia (Farmácia), Biologia de Microrganismos (Ciências Biológicas).

4.2. Participação em bancas de Pós-graduação *latu sensu* – Especialização

- Participação em banca de Fabiane Beatriz Rodrigues da Silva. Análise da frequência e do perfil de susceptibilidade dos agentes causadores de infecções do trato urinário em pacientes hospitalares e comunitários. Monografia (Aperfeiçoamento/Especialização em Especialização em Análises Clínicas) - Universidade Federal de Juiz de Fora. 2012.

- Participação em banca de Daniele Maria Knupp de Souza. Multirresistência a Antimicrobianos em Bacilos Gram-Negativos: Um Desafio em Hospitais de Ensino. Monografia (Aperfeiçoamento/Especialização em Política e Pesquisa em Saúde Coletiva) - Universidade Federal de Juiz de Fora. 2011.

4.3. Participação em bancas de Trabalhos de Conclusão de Curso - Graduação

- Participação em banca de Marina Barros Campos. Determinação da concentração inibitória fracionária de antimicrobianos associados a nanopartículas de prata. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Federal de Juiz de Fora. 2014.



- Participação em banca de Tamara Lopes Rocha de Oliveira. Resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus* sp. e *Enterococcus* sp. isolados de sistema de aquicultura, mediada por plasmídios. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Federal de Juiz de Fora. 2013.
- Participação em banca de Mayara Rodrigues Brandão de Paiva. Perfil de susceptibilidade de *Staphylococcus* coagulase negativo isolados do queijo Minas Frescal. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Federal de Juiz de Fora. 2013.
- Participação em banca de Samuel Oliveira Fortunato. Dinâmica populacional de cocos gram positivos e bastonetes gram negativos de interesse em saúde humana e animal, em sistemas de biodigestão anaeróbica. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Federal de Juiz de Fora. 2013.
- Participação em banca de Rafaela Alvim Garcia. Isolamento, identificação e perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de *Staphylococcus* spp. isolados de queijo minas frescal. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Federal de Juiz de Fora. 2012.

5. Projetos de Pesquisa:

- Estudo do microbioma e participação de *Staphylococcus aureus* em diferentes sítios de colonização e infecção no paciente HIV: análise fenotípica e molecular de amostras e aspectos epidemiológicos associados à aquisição do patógeno no município de Juiz de Fora e região. (Coordenador).
- Aspectos fisiológicos e moleculares (viruloma e resistoma) de *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina isolados em um hospital terciário, no período de 2005 a 2011. (Integrante).
- Avaliação do transcriptoma e de aspectos fisiológicos e da patogênese de *Bacteroides fragilis* durante infecção experimental em resposta a concentrações sub-inibitórias de metronidazol. (Integrante).

ANEXO A – Parecer Comitê de Ética em Pesquisa

Página 1 de 2

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP-HU CASUFJF

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO

Parecer n°. 267/2011

Protocolo CEP-UFJF: 120-420-2011 **FR:** 452597 **CAAE:** 0084.0.420.000-11

Projeto de Pesquisa: Aspectos fisiológicos e moleculares da resistência a drogas e virulência de *Staphylococcus aureus* oxacilina-resistentes isolados em um hospital terciário, entre 2006 e 2010.

Versão do Protocolo e Data: 17 de agosto de 2011

Grupo: III

Pesquisador Responsável: Cláudio Galuppo Diniz

Pesquisadores Participantes: Thiago César Nascimento, Vânia Lúcia da Silva, Murilo Gomes de Oliveira.

Instituição: Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora

Matéria para análise: Folha de Rosto, Projeto de Pesquisa, Solicitação de Dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, Comprovante de currículo do pesquisador responsável e demais pesquisadores participantes.

Sumário/comentários do protocolo:

O CEP analisou o Protocolo 120-420-2011, Grupo III e considerou que:


Justificativa: objeto bem delimitado, tema relevante para a área de saúde. Atualmente, apesar dos avanços significativos na prevenção e controle das infecções hospitalares, como a melhoria dos métodos de vigilância epidemiológica, das técnicas de desinfecção, esterilização, assepsia e modernização da arquitetura hospitalar, observa-se ainda um aumento nas taxas de infecção hospitalar. Atendendo aos apelos dos órgãos internacionais de vigilância epidemiológica, dado o crescente fenômeno de resistência a drogas, a possível disseminação de marcadores resistência a drogas antimicrobianas e genes de virulência, percebe-se a importância da geração de conhecimento científico sobre a evolução, colonização, ecologia, patologia, fisiologia e epidemiologia de linhagens do gênero *Staphylococcus* isoladas de um hospital terciário da cidade de Juiz de Fora. Os dados obtidos neste projeto podem servir de base para ações educativas voltadas para educação sanitária dos usuários e profissionais do serviço de saúde, além de servir como referência para estratégias que visem minimizar os riscos de ocorrência de infecção hospitalar por estes microrganismos e estimular a reflexão sobre a crescente resistência a drogas e o uso racional de antimicrobianos.

Objetivo: Avaliar características fisiológicas e moleculares relacionadas à resistência a drogas e a virulência de linhagens de *Staphylococcus aureus* resistentes a oxacilina, isolados em um hospital terciário (HU/UFJF) na cidade de Juiz de Fora, entre 2006 e 2010.

Metodologia: Esta pesquisa será de caráter retrospectivo, realizada com linhagens de *Staphylococcus aureus* oxacilina-resistentes (ORSA) contidas na bacterioteca do Laboratório Professor Maurílio Baldi, anteriormente isoladas de 200 pacientes e mantidas segundo Reimer & Carrol. Para o protocolo da pesquisa serão descritos apenas os espécimes clínicos das quais as linhagens foram isoladas, as enfermarias nas quais os pacientes se encontravam na época do isolamento, seu sexo e idade, sem qualquer referência à identidade dos pacientes.

As linhagens bacterianas recuperadas serão re-avaliadas quanto ao seu perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos, desinfetantes e antissépticos de uso hospitalar pelo

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP-HU CASUFJF
RUA CATULO BREVIGLIERI S/N° - R. SANTA CATARINA
36036-110 - JUIZ DE FORA - MG - BRASIL - Fone: 48995206



método de diluição em ágar (CLSI, 2010). Serão realizadas pesquisas sobre fatores de virulência e tipagem epidemiológica usando-se iniciadores específicos por PCR, além de testes sobre resistência a estresse oxidativo, formação de biofilmes, termotolerância e atividade hemolítica

Orçamento: de responsabilidade da FAPEMIG

Fonte de financiamento: FAPEMIG

Cronograma: a coleta de dados será iniciada no 4º semestre de 2011 e terminará no 2º semestre de 2012

Revisão e referências: pertinente ao estudo

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido: Foi solicitada dispensa (por se tratar de um projeto que utilizará dados de arquivo de resultados de laboratório sem referência a identidade dos sujeitos).

Pesquisador: apresenta experiência e qualificação para a coordenação do estudo. Demais membros da equipe também apresentam qualificação para atividade que desempenharão durante o estudo.

O CEP solicita ao pesquisador que atenda a Carta Circular nº. 003/2011 CONEP/CNS datada de 21 de março de 2011, que torna obrigatória a rubrica em todas as páginas do TCLE pelo sujeito de pesquisa ou seu responsável e pelo pesquisador em todos os TCLEs com data posterior a 01 de abril de 2011.

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa – CEP-HU/CAS da UFJF, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 196/96 e suas complementares manifestam-se pela aprovação do protocolo de pesquisa proposto.

Salientamos que o pesquisador deverá encaminhar a este comitê o relatório final.

Situação: Projeto Aprovado

Juiz de Fora, 26 de setembro de 2011.



Representante do Comitê de Ética em Pesquisa
CEP-HU/CAS UFJF

RECERB
DATA: ____/____/2011
ASS: _____

ANEXO B – CLSI 2012

Table 2C
Staphylococcus spp.
M02 and M07

Table 2C. Zone Diameter and MIC Interpretive Standards for Staphylococcus spp.

Testing Conditions		Minimal QC Recommendations (See Tables 3A and 4A for acceptable QC ranges.)
Medium:	Disk diffusion: MHA Broth dilution: CAMHB; CAMHB+2% NaCl for oxacillin, methicillin, and nafcillin; CAMHB supplemented to 50 µg/mL calcium for daptomycin Agar dilution: MHA; MHA+2% NaCl for oxacillin, methicillin, and nafcillin. Agar dilution has not been validated for daptomycin.	Staphylococcus aureus ATCC® 25923 (disk diffusion) Staphylococcus aureus ATCC® 29213 (MIC) Escherichia coli ATCC® 35218 (for β-lactam/β-lactamase inhibitor combinations)
Inoculum:	Direct colony suspension, equivalent to a 0.5 McFarland standard	
Incubation:	35±2°C; ambient air; Disk diffusion: 16 to 18 hours; 24 hours (coagulase-negative staphylococci and ceftoxitin); Dilution methods: 16 to 20 hours; All methods: 24 hours for oxacillin, methicillin, nafcillin, and vancomycin. Testing at temperatures above 35°C may not detect MRS.	

Refer to Tables 2C Supplemental Tables 1, 2, and 3 at the end of Table 2C for additional recommendations for testing conditions, reporting suggestions, and QC.

General Comments

- (1) For disk diffusion, test a maximum of 12 disks on a 150-mm plate and 5 disks on a 100-mm plate (see M02 Section 9.2). Measure the diameter of the zones of complete inhibition (as judged by the unaided eye), including the diameter of the disk. Hold the Petri plate a few inches above a black, nonreflecting background illuminated with reflected light, except for linezolid, oxacillin, and vancomycin, which should be read with transmitted light (plate held up to light source). The zone margin should be considered the area showing no obvious, visible growth that can be detected with the unaided eye. Ignore faint growth of tiny colonies that can be detected only with a magnifying lens at the edge of the zone of inhibited growth. With trimethoprim and the sulfonamides, antagonists in the medium may allow some slight growth; therefore, disregard slight growth (20% or less of the lawn of growth) and measure the more obvious margin to determine the zone diameter. For oxacillin, linezolid, or vancomycin, any discernable growth within the zone of inhibition is indicative of resistance to the respective agent.
- (2) Historically, resistance to the penicillinase-stable penicillins (see Glossary I) has been referred to as "methicillin resistance" or "oxacillin resistance." MRSA are those strains of *S. aureus* that express *mecA* or another mechanism of methicillin resistance, such as changes in affinity of penicillin-binding proteins for oxacillin (modified *S. aureus* [MOD-SA] strains).
- (3) For oxacillin-susceptible *S. aureus* and coagulase-negative staphylococci, results for parenteral and oral cepheims, β-lactam/β-lactamase inhibitor combinations, and carbapenems, if tested, should be reported according to the results generated using routine interpretive criteria. See comment (4) for reporting β-lactam results on oxacillin-resistant strains.
- (4) **WARNING:** For oxacillin-resistant *S. aureus* and coagulase-negative staphylococci (MRS), other β-lactam agents, ie, penicillins, β-lactam/β-lactamase inhibitor combinations, cepheims (with the exception of the cephalosporins with anti-MRSA activity), and carbapenems, may appear active *in vitro*, but are not effective clinically. Results for β-lactam agents other than the cephalosporins with anti-MRSA activity should be reported as resistant or should not be reported. This is because most cases of documented MRS infections have responded poorly to β-lactam therapy, or because convincing clinical data have yet to be presented that document clinical efficacy for those agents.

70

© Clinical and Laboratory Standards Institute. All rights reserved.

January 2012

Vol. 32 No. 3

Table 2C. (Continued)

- (5) Detection of oxacillin resistance: Tests for *mecA* or for the protein expressed by *mecA*, the penicillin-binding protein 2a (PBP 2a, also called PBP2'), are the most accurate methods for prediction of resistance to oxacillin and can be used to confirm results for isolates of staphylococci from serious infections. Isolates of staphylococci that carry the *mecA* gene, or that produce PBP 2a (the *mecA* gene product), should be reported as oxacillin resistant. Isolates that do not carry *mecA* or do not produce PBP 2a should be reported as oxacillin susceptible. Because of the rare occurrence of resistance mechanisms other than *mecA*, if MIC tests are performed in addition to disk diffusion, isolates for which oxacillin MICs are ≥ 4 $\mu\text{g/mL}$ and are *mecA* negative or PBP 2a negative should be reported as oxacillin resistant. These isolates may test as susceptible to cefoxitin by disk diffusion.
- (6) Routine testing of urine isolates of *S. saprophyticus* is not advised, because infections respond to concentrations achieved in urine of antimicrobial agents commonly used to treat acute, uncomplicated urinary tract infections (eg, nitrofurantoin, trimethoprim \pm sulfamethoxazole, or a fluoroquinolone).
- (7) For some organism/antimicrobial agent combinations, the absence or rare occurrence of resistant strains precludes defining any results categories other than "susceptible." For strains yielding results suggestive of a "nonsusceptible" category, organism identification and antimicrobial susceptibility test results should be confirmed. (See Appendix A.)
- (8) For screening tests for β -lactamase production, oxacillin resistance, *mecA*-mediated oxacillin resistance using cefoxitin, reduced susceptibility to vancomycin, and inducible clindamycin resistance, refer to Table 2C **Supplemental Tables 1 and 2** for *S. aureus* group and Table 2C **Supplemental Table 3** for coagulase-negative staphylococci. In addition, further explanation on the use of cefoxitin for prediction of *mecA*-mediated oxacillin resistance can be found in Section 12 of M07-A9 and Section 11 of M02-A11.

NOTE: Information in boldface type is new or modified since the previous edition.

Table 2C.
Staphylococcus spp.
M02 and M07

Table 2C
Staphylococcus spp.
M02 and M07

Table 2C. (Continued)

Test/Report Group	Antimicrobial Agent	Disk Content	Zone Diameter Interpretive Criteria nearest whole mm			MIC Interpretive Criteria (µg/ml)			Comments
			S	I	R	S	I	R	
PENICILLINS									
(9) Penicillin-susceptible staphylococci are also susceptible to other penicillins, β-lactam/β-lactamase inhibitor combinations, antistaphylococcal cepheps, and carbapenems approved for use by the FDA for staphylococcal infections. Penicillin-resistant, oxacillin-susceptible strains are resistant to penicillinase-stable penicillins, but susceptible to other penicillinase-stable penicillins, β-lactam/β-lactamase inhibitor combinations, antistaphylococcal cepheps, and carbapenems. Oxacillin-resistant staphylococci are resistant to all currently available β-lactam antimicrobial agents, with the exception of the newer cephalosporins with anti-MRSA activity. Thus, susceptibility or resistance to a wide array of β-lactam antimicrobial agents may be deduced from testing only penicillin and either cefoxitin or oxacillin. Routine testing of other penicillins, β-lactam/β-lactamase inhibitor combinations, cepheps, or carbapenems is not advised. (10) If a penicillinase-stable penicillin is tested, oxacillin is the preferred agent and results can be applied to the other penicillinase-stable penicillins, cloxacillin, dicloxacillin, flucloxacillin, methicillin, and nafcillin. See comment (4).									
A	Penicillin	10 units	≥29	—	≤28	≤0.12	—	≥0.25	(11) Penicillin-resistant strains of staphylococci produce β-lactamase, and the testing of penicillin instead of ampicillin is preferred. Penicillin should be used to test the susceptibility of all staphylococci to all penicillinase-stable penicillins, such as ampicillin, amoxicillin, azlocillin, carbenicillin, mezlocillin, piperacillin, and ticarcillin. Perform test(s) to detect β-lactamase production on staphylococci for which the penicillin MICs are ≤0.12 µg/ml or zone diameters ≥29 mm before reporting the isolate as penicillin susceptible. Rare isolates of staphylococci that contain genes for β-lactamase production may appear negative by β-lactamase tests. Consequently, for serious infections requiring penicillin therapy, laboratories should perform MIC tests and β-lactamase testing on all subsequent isolates from the same patient. PCR testing of the isolate for the blaZ β-lactamase gene may be considered. See Table 2C, Supplemental Tables 1 and 3 at the end of Table 2C. (12) For oxacillin-resistant staphylococci report penicillin as resistant or do not report.
A	Oxacillin For <i>S. aureus</i> and <i>S. lugdunensis</i>	1 µg oxacillin 1 µg oxacillin 30 µg cefoxitin	≥13	11–12	≤10	≤2 (oxacillin)	—	≥4 (oxacillin) ≥8 (cefoxitin)	For use with <i>S. aureus</i> : (13) If oxacillin intermediate results (disk diffusion testing) are obtained for <i>S. aureus</i> , perform testing for mecA or PBP 2a, the cefoxitin MIC or cefoxitin disk test, an oxacillin MIC test, or the oxacillin-salt agar screening test. Report the result of the alternative test rather than the oxacillin intermediate result [see comment (14) for reporting oxacillin when using cefoxitin as a surrogate test]. For use with <i>S. lugdunensis</i> : For use with <i>S. aureus</i> and <i>S. lugdunensis</i> : (14) Cefoxitin is used as a surrogate for oxacillin resistance; report oxacillin susceptible or resistant based on the cefoxitin result. (15) If both cefoxitin and oxacillin are tested against <i>S. aureus</i> or <i>S. lugdunensis</i> , and either result is resistant, the organism should be reported as oxacillin resistant. See comments (5) and (9).

72

Clinical and Laboratory Standards Institute. All rights reserved.

January 2012

Vol. 33, No. 3

Table 2C. (Continued)

Test/Report Group	Antimicrobial Agent	Disk Content	Zone Diameter Interpretive Criteria nearest whole mm			MIC Interpretive Criteria (µg/mL)			Comments
			S	I	R	S	I	R	
PENICILLINS (Continued)									
A	Oxacillin For coagulase-negative staphylococci except <i>S. lugdunensis</i> .	1 µg oxacillin	—	—	—	≤0.25 (oxacillin)	—	≥0.5 (oxacillin)	For use with coagulase-negative staphylococci except <i>S. lugdunensis</i> . (16) Oxacillin interpretive criteria may overcall resistance for some coagulase-negative staphylococci, because some non- <i>S. epidermidis</i> strains for which the oxacillin MICs are 0.5 to 2 µg/mL lack <i>meaA</i> . For serious infections with coagulase-negative staphylococci other than <i>S. epidermidis</i> , testing for <i>meaA</i> or for PBP 2a or with cefoxitin disk diffusion may be appropriate for strains for which the oxacillin MICs are 0.5 to 2 µg/mL.
		30 µg cefoxitin	≥25	—	≤24	—	—	—	See comments (5), (9), and (14).

Table 2C
Staphylococcus spp.
M02 and M07

Table 2C.
Staphylococcus spp.
M02 and M07

Table 2C. (Continued)

Test/Report Group	Antimicrobial Agent	Disk Content	Zone Diameter Interpretive Criteria nearest whole mm			MIC Interpretive Criteria (µg/ml)			Comments
			S	I	R	S	I	R	
PENICILLINS (Continued)									
O	Ampicillin	10 µg	≥29	—	≤28	≤0.25	—	≥0.5	(17) Class representative for ampicillin and amoxicillin. (18) For oxacillin-resistant staphylococci, report ampicillin as resistant or do not report.
O	Methicillin	5 µg	≥14	10-13	≤9	≤8	—	≥16	For use with <i>S. aureus</i> only.
O	Nafcillin	1 µg	≥13	11-12	≤10	≤2	—	≥4	For use with <i>S. aureus</i> only.
β-LACTAM/β-LACTAMASE INHIBITOR COMBINATIONS									
(18) For oxacillin-resistant staphylococci, report as resistant or do not report.									
See comments (4) and (9).									
O	Axacillin-clavulanic acid	20/10 µg	≥20	—	≤19	≤4/2	—	≥8/4	
O	Ampicillin-sulbactam	10/10 µg	≥15	12-14	≤11	≤8/4	16/8	≥32/16	
O	Piperacillin-tazobactam	100/10 µg	≥18	—	≤17	≤8/4	—	≥16/4	
O	Ticarcillin-clavulanic acid	75/10 µg	≥23	—	≤22	≤8/2	—	≥16/2	
CEPHEMS (PARENTERAL) (including cephalosporins I, II, III, and IV. Please refer to Glossary I.)									
See comments (4), (9), and (19).									
O	Cefamandole	30 µg	≥18	15-17	≤14	≤8	16	≥32	
O	Cefazolin	30 µg	≥18	15-17	≤14	≤8	16	≥32	
O	Cefepime	30 µg	≥18	15-17	≤14	≤8	16	≥32	
O	Cefmetazole	30 µg	≥16	13-15	≤12	≤16	32	≥64	
O	Cefonicid	30 µg	≥18	15-17	≤14	≤8	16	≥32	
O	Cefoperazone	75 µg	≥21	16-20	≤15	≤16	32	≥64	
O	Cefotaxime	30 µg	≥23	15-22	≤14	≤8	16-32	≥64	
O	Cefotetan	30 µg	≥16	13-15	≤12	≤16	32	≥64	
O	Cefotaxime	30 µg	≥18	15-17	≤14	≤8	16	≥32	
O	Ceftazidime	30 µg	≥20	15-19	≤14	≤8	16-32	≥64	
O	Ceftazidime	30 µg	≥20	15-19	≤14	≤8	16-32	≥64	
O	Ceftazidime	30 µg	≥21	14-20	≤13	≤8	16-32	≥64	
O	Cefuroxime (parenteral)	30 µg	≥18	15-17	≤14	≤8	16	≥32	
O	Cephalexin	30 µg	≥18	15-17	≤14	≤8	16	≥32	
O	Moxalactam	30 µg	≥23	15-22	≤14	≤8	16-32	≥64	
CEPHEMS (ORAL)									
See comments (4), (9), and (19).									
O	Cefaclor	30 µg	≥19	15-17	≤14	≤8	16	≥32	
O	Cefdinir	5 µg	≥20	17-19	≤16	≤1	2	≥4	
O	Cefprozil	10 µg	≥21	18-20	≤17	≤2	4	≥8	
O	Cefprozil	30 µg	≥18	15-17	≤14	≤8	16	≥32	
O	Cefuroxime (oral)	30 µg	≥23	15-22	≤14	≤4	8-16	≥32	
O	Loracarbef	30 µg	≥18	15-17	≤14	≤8	16	≥32	

74

Clinical and Laboratory Standards Institute. All rights reserved.

January 2012

Vol. 32 No. 3

Table 2C. (Continued)

Test/Report Group	Antimicrobial Agent	Disk Content	Zone Diameter Interpretive Criteria nearest whole mm			MIC Interpretive Criteria (µg/mL)			Comments
			S	I	R	S	I	R	
LARBA/ENEMS									
See comments (4), (9), and (19).									
O	Doripenem	10 µg	≥30	—	—	≤0.5	—	—	(20) For use with methicillin-susceptible staphylococci only. See comment (7).
O	Ertapenem	10 µg	≥19	16–18	≤15	≤2	4	≥8	
O	Imipenem	10 µg	≥16	14–15	≤13	≤4	8	≥16	
O	Meropenem	10 µg	≥16	14–15	≤13	≤4	8	≥16	
GLYCOPEPTIDES									
B	Vancomycin	—	—	—	—	≤2	4–8	≥16	For use with <i>S. aureus</i> . (21) MIC tests should be performed to determine the susceptibility of all isolates of staphylococci to vancomycin. The disk test does not differentiate vancomycin-susceptible isolates of <i>S. aureus</i> from vancomycin-intermediate isolates, nor does the test differentiate among vancomycin-susceptible, intermediate, and resistant isolates of coagulase-negative staphylococci, all of which will give similar size zones of inhibition. (22) The vancomycin 30-µg disk test detects <i>S. aureus</i> isolates containing the <i>vanA</i> vancomycin resistance gene (VRSA). Such isolates will show no zone of inhibition around the disk (zone = 5 mm). The identification of isolates showing no zone of inhibition should be confirmed. Isolates of staphylococci producing vancomycin zones of ≥7 mm should not be reported as susceptible without performing a vancomycin MIC test. (23) Send any <i>S. aureus</i> for which the vancomycin is ≥ 8 µg/mL to a reference laboratory. See Appendix A. (24) Disk diffusion testing is not reliable for testing vancomycin. Also refer to Table 2C Supplemental Table 2 for <i>S. aureus</i> at the end of Table 2C, Section 12.1.3 in M07-A9, and Section 11.1.3 in M02-A11.

Table 2C
Staphylococcus spp.
M02 and M07

Table 2C
Staphylococcus spp.
M02 and M07

Table 2C. (Continued)

Test/Report Group	Antimicrobial Agent	Disk Content	Zone Diameter Interpretive Criteria nearest whole mm			MIC Interpretive Criteria (µg/mL)			Comments
			S	I	R	S	I	R	
GLYCOPEPTIDES (Continued)									
B	Vancomycin	—	—	—	—	≤4	8–16	≥32	For use with coagulase-negative staphylococci. See comments (21) and (24). (25) Send any coagulase-negative Staphylococcus for which the vancomycin MIC is ≥ 32 µg/mL to a reference laboratory. See Appendix A. See also Section 12.1.3 in M07-A9 and Section 11.1.3 in M02-A11.
Inv.	Teicoplanin	30 µg	≥14	11–13	≤10	≤8	16	≥32	(26) Teicoplanin disk diffusion interpretive criteria were not reevaluated concurrent with the reevaluation of vancomycin disk diffusion interpretive criteria. Therefore, the ability of these teicoplanin interpretive criteria to differentiate teicoplanin-intermediate and teicoplanin-resistant staphylococci from teicoplanin-susceptible strains is not known.
LIPPEPTIDES									
B	Daptomycin	—	—	—	—	≤1	—	—	(27) Disk diffusion testing is not reliable for testing daptomycin. (28) Daptomycin should not be reported for isolates from the lower respiratory tract. See comment (7).
AMINOGLYCOSIDES									
C	Gentamicin	10 µg	≥16	13–14	≤12	≤4	8	≥16	
O	Amikacin	30 µg	≥17	15–16	≤14	≤16	32	≥64	
O	Kanamycin	30 µg	≥18	14–17	≤13	≤16	32	≥64	
O	Netilmicin	30 µg	≥15	13–14	≤12	≤8	16	≥32	
O	Tobramycin	10 µg	≥15	13–14	≤12	≤4	8	≥16	
MACROLIDES									
(29) Not routinely reported on organisms isolated from the urinary tract.									
A	Azithromycin or clarithromycin or erythromycin	15 µg	≥18	14–17	≤13	≤2	4	≥8	
A	Telithromycin	15 µg	≥18	14–17	≤13	≤2	4	≥8	
A	Erythromycin	15 µg	≥23	14–22	≤13	≤0.5	1–4	≥8	
B	Telithromycin	15 µg	≥22	19–21	≤16	≤1	2	≥4	
O	Dithromycin	15 µg	≥19	16–18	≤15	≤2	4	≥8	

76

Clinical and Laboratory Standards Institute. All rights reserved.

January 2012

Vol. 32 No. 3

Table 2C. (Continued)

Test/Report Group	Antimicrobial Agent	Disk Content	Zone Diameter Interpretive Criteria nearest whole mm			MIC Interpretive Criteria (µg/ml)			Comments
			S	I	R	S	I	R	
TETRACYCLINES									
(30) Organisms that are susceptible to tetracycline are also considered susceptible to doxycycline and minocycline. However, some organisms that are intermediate or resistant to tetracycline may be susceptible to doxycycline, minocycline, or both.									
B	Tetracycline	30 µg	≥19	15-18	≤14	≤4	8	≥16	
B	Doxycycline	30 µg	≥16	13-15	≤12	≤4	8	≥16	
B	Minocycline	30 µg	≥15	15-18	≤14	≤4	8	≥16	
FLUOROQUINOLONES									
(31) <i>Staphylococcus</i> spp. may develop resistance during prolonged therapy with quinolones. Therefore, isolates that are initially susceptible may become resistant within three to four days after initiation of therapy. Testing of repeat isolates may be warranted.									
C	Ciprofloxacin or levofloxacin or ofloxacin	5 µg	≥21	16-20	≤15	≤1	2	≥4	
C	Moxifloxacin	5 µg	≥19	16-18	≤15	≤1	2	≥4	
C	Moxifloxacin	5 µg	≥18	15-17	≤14	≤1	2	≥4	
C	Moxifloxacin	5 µg	≥24	21-23	≤20	≤0.5	1	≥2	
U	Lomefloxacin	10 µg	≥22	19-21	≤18	≤2	4	≥8	
U	Narfoxacin	10 µg	≥17	13-16	≤12	≤4	8	≥16	
O	Enoxacin	10 µg	≥18	15-17	≤14	≤2	4	≥8	(32) FDA approved for <i>S. saprophyticus</i> and <i>S. epidermidis</i> (but not for <i>S. aureus</i>)
O	Gatifloxacin	5 µg	≥21	20-22	≤19	≤0.5	1	≥2	
O	Grepafloxacin	5 µg	≥18	15-17	≤14	≤1	2	≥4	
O	Sparfloxacin	5 µg	≥19	16-18	≤15	≤0.5	1	≥2	
Inv.	Fleroxacin	5 µg	≥19	16-18	≤15	≤2	4	≥8	

Table 2C
Staphylococcus spp.
M02 and M07