

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA**

**THIAGO CÉSAR NASCIMENTO**

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA, SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS  
E PESQUISA DO GENE *mecA* EM LINHAGENS DE *Staphylococcus coagulase*  
negativo RECUPERADAS DE RESÍDUOS DOS SERVIÇOS DE SAÚDE**

**Juiz de Fora  
2009**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA**

**Thiago César Nascimento**

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA, SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS  
E PESQUISA DO GENE *mecA* EM LINHAGENS DE *Staphylococcus coagulase*  
negativo RECUPERADAS DE RESÍDUOS DOS SERVIÇOS DE SAÚDE**

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

**Orientador:** Prof. Dr. Cláudio Galuppo Diniz

**Coorientadora:** Prof<sup>a</sup> Dra. Vânia Lúcia da Silva

**Juiz de Fora**

**2009**

Nascimento, Thiago César.

Caracterização fenotípica, susceptibilidade a antimicrobianos e pesquisa do gene *mecA* em linhagens de *Staphylococcus* coagulase negativo recuperadas de resíduos dos serviços de saúde / Thiago César Nascimento. – 2009.

111 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Saúde)–Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2009.

1. Resíduos de serviços de saúde. 2. *Staphylococcus*. I. Título.

CDU 628.4.046

**THIAGO CÉSAR NASCIMENTO**

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA, SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS  
E PESQUISA DO GENE *mecA* EM LINHAGENS DE *Staphylococcus coagulase*  
negativo RECUPERADAS DE RESÍDUOS DOS SERVIÇOS DE SAÚDE**

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

**Aprovada em:**

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Profa. Dra. Simone Gonçalves dos Santos  
Universidade Vale do Rio Doce

---

Profa. Dra. Dionéia Evangelista César  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Profa. Dra. Maria Luzia da Rosa e Silva  
Universidade Federal de Juiz de Fora

***A vocês que me ensinaram a viver com dignidade, que compartilharam do meu ideal e o alimentaram, incentivando-me a prosseguir na jornada, fossem quais fossem os obstáculos, dedico este trabalho a você Pai e a você Mãe, com a mais profunda admiração e respeito.***

## AGRADECIMENTOS

*Ao finalizar mais uma importante etapa, 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 guiar meus passos ao longo de mais esta etapa.*

*Aos meus pais, **Válter e Maria do Carmo**, por todo carinho, atenção e dedicação dispensados a mim desde o início de minha vida que sinceramente tenho dúvidas se faço o suficiente para merecer tanto.*

*Ao meu irmão **Fúlvio** e cunhada **Ana Paula** pelo apoio e incentivo, além dos sobrinhos queridos **Fúlvio Augusto e Ana Clara**.*

*Ao meu irmão **Fabrizio**, desculpas por todo esse tempo de ausência. Desejo-lhe sucesso na carreira que se inicia.*

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

*A toda minha família, obrigado pelo apoio e incentivo.*

*Ao **Prof. Cláudio Galuppo Diniz**, exemplo de profissionalismo e competência, mais do que um orientador, um amigo. Obrigado pelas lições de saber, pela orientação constante, pela dedicação e renúncias pessoais, 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. Aliás, um obrigado é insuficiente para agradecer toda a confiança e ensinamentos dispensados a mim.*

*À **Profa. Vânia Lúcia da Silva**, amiga e orientadora, que cativa a todos com seu jeito doce. Seus ensinamentos me fizeram crescer pessoal e profissionalmente. Saiba que você terá a minha eterna gratidão e admiração.*

*À **Profa. Rosângela Abreu Monteiro de Barros**, obrigado pelo carinho e zelo dispensados durante todos esses anos.*

*Ao **Prof. Márcio Tavares Rodrigues**, ou diria colega de turma? Obrigado pela amizade, apoio e pelo exemplo de honestidade profissional.*

*À **Profa. Maria Luzia da Rosa e Silva**, exemplo de seriedade, obrigado pela amizade, apoio e pelas inestimáveis trocas de ideias.*

*À **Profa. Mariléia Leonel** da Faculdade de Enfermagem pela colaboração neste trabalho. Obrigado também por toda consideração e incentivo.*

A todos os professores e ex-professores da Microbiologia, **Délcio, Francis, Jorge (Mr. Magoo), Natália, Tiago, Bruno, Márcia, Luciana, Fábio, Andressa, Luciene, Gizele, Thaís, Fred, Claudinha, Carolina**. Obrigado por toda consideração desde os tempos de monitoria, como aluno.

À **Profa Gizele Duarte Garcia**. Obrigado pelos conselhos, ensinamentos e pelos momentos de descontração, sem falar no “expresso Bairu” (partiu Gi?).

À doutoranda do IMPPG/UFRJ **Natália Iorio** pelos conselhos, momentos de ajuda e conversas descontraídas, em sua passagem por aqui. Sem querer, você despertou em mim a vontade de me dedicar à microbiologia. Você é um exemplo de amor e dedicação naquilo que faz.

Aos amigos **Angélica** e **Leandro** por toda a ajuda nos momentos de sufoco, prestada no laboratório. Obrigado pelo excelente convívio e amizade há muito tempo.

Ao meu amigo **Werley de Almeida Januzzi**, um ser humano de enorme coração e inteligência, que me ajudou desde o início deste trabalho. O laboratório não é mais o mesmo sem você. Saiba que torço pelo seu sucesso. Obrigado por tudo.

A todos os integrantes e ex-integrantes do Laboratório de Fisiologia e Genética Molecular Bacteriana, **Werley, Maria Lúcia, Daniele Knupp, Danielle, Gabriela, Lorena, Patrícia, Thaís, Mariana, Michele, Felipe, Rafael** e **Camila** (agregados da Química), **Juliana, Natália, Jéssica, Fabrício, Letícia, Job, Rafaella, Renata, Natália, Thiago II**, obrigado por todos os momentos de convivência e descontração.

Às minhas amigas farmacêuticas **Daniele Knupp, Danielle, Gabriela** e **Lorena** por todos os momentos vividos, sejam no laboratório, congressos... Vocês fazem falta por aqui. Sucesso para vocês.

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

Ao Laboratório de Ecologia e Biologia Molecular de Microrganismos do ICB, nas pessoas da **Profa. Cíntia Marques Coelho** e **Profa. Dionéia Evangelista César**, pelo espaço cedido para o término dos experimentos de biologia molecular.

Ao meu grande amigo **Tenente BM Rafael Neves Cosendey** por todos esses anos de amizade. Obrigado pelos conselhos em alguns momentos de dúvidas e incertezas e pelas conversas descontraídas, principalmente em incursões nas “nights” juiz-de-foranas. Sucesso para você em BH.

Aos amigos dos bate-bolas dominicais pelos momentos de descontração, principalmente ao **Daniel, Del’Duca, Rafael, Fabrício Cardoso, Nem** e **Claudinho** por suas amizades há muito tempo.

A algumas pessoas importantes que sempre compreenderam a minha dedicação com o meu trabalho, **Prof. Picinini, Gilmara, Darlan, Rodrigo, Juliana, Amanda, Míriam, Wando, Marcus, Beatriz, Júlia, Thalita**. Obrigado por tudo.

*Ao amigo e colega de mestrado **Dr. Didier**, exemplo de perseverança e seriedade. Obrigado pelo incentivo e amizade gratuita.*

*As colegas do programa de mestrado **Liliane, Maria Lúcia, Renata e Renatinha** pelos momentos de descontração, principalmente durante os estudos de bioestatística.*

*À **Lucilene Santos Lima Vieira** pelo inestimável trabalho de revisão da dissertação.*

*A todos os integrantes do Projeto de Resíduos Sólidos do Hospital Universitário/UFJF. Obrigado por compreenderem alguns momentos de ausência.*

*A todos os professores e funcionários do Instituto de Ciências Biológicas pela atenção que me foi concedida sempre que precisei, entre eles, **Ivone** do Laboratório de Parasitologia e **Francisco** do Laboratório de Imunologia.*

*Ao Programa de Pós-Graduação em Saúde, na pessoa do Coordenador Geral, **Prof. Marcus Gomes Bastos**.*

*À colaboração do Departamento Municipal de Limpeza Urbana (**DEMLURB**) da cidade de Juiz de Fora, MG.*

*À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (**FAPEMIG**), por todo suporte financeiro para execução do projeto.*



***“Sempre acreditei que, se você colocar o trabalho, os resultados virão. Eu não faço coisas com 'meia vontade', porque eu sei que, se eu o fizer, então eu posso esperar resultados de 'meia qualidade’”.***

***Michael Jordan***

## RESUMO

Acredita-se que os resíduos de serviços de saúde (RSS) possam atuar como veículos de disseminação de microrganismos potencialmente patogênicos e de marcadores de resistência a drogas antimicrobianas. Assim, considerando-se os riscos para saúde humana e ambiental associados ao fenômeno da resistência microbiana a drogas, nossos objetivos foram identificar linhagens de *Staphylococcus* coagulase negativo (SCN) isoladas do chorume percolado dos RSS no aterro sanitário de Juiz de Fora, MG, determinar o seu perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de interesse clínico-microbiológico e detectar o marcador molecular *mecA*. Linhagens bacterianas presuntivamente caracterizadas como SCN (n=109) foram identificadas utilizando-se sistema comercial semiautomatizado e o seu perfil de susceptibilidade a antimicrobianos, determinado pela técnica de diluição em ágar, de acordo com as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Apenas 26,6% das amostras de SCN foram identificadas pelo sistema comercial, distribuídas em *S. sciuri* (31%), *S. epidermidis* (27,6%), *S. lentus* (20,7%), *S. vitulinus* (10,3%) *S. saprophyticus* (6,9%), *S. haemolyticus* (3,5%). As outras linhagens foram identificadas como *Staphylococcus* spp. (73,4%). Entre os antimicrobianos avaliados, a penicilina e a oxacilina foram as drogas menos efetivas (61,4% de resistência), seguidas pela eritromicina e azitromicina (27,3% e 22,7% de resistência respectivamente). Os antimicrobianos mais eficazes foram a gentamicina e levofloxacina, para os quais apenas resistência intermediária foi observada (21,6% e 1,1% respectivamente). Todas as amostras foram susceptíveis à vancomicina. Considerando as linhagens resistentes 14 (25,9%) amplificaram o gene específico, enquanto que 40 (74,1%) mostraram-se resistentes à oxacilina por outros mecanismos. Nossos resultados suscitam reflexões relacionadas à sobrevivência de microrganismos potencialmente patogênicos e linhagens resistentes aos antimicrobianos, carreando importantes marcadores de resistência e sua possível disseminação via RSS, contribuindo para seu trânsito intra-hospitalar.

**Palavras-chave:** Resíduos de serviços de saúde. *Staphylococcus* coagulase negativo. Resistência antimicrobiana. Identificação específica.

## ABSTRACT

It is accepted that health-care waste may act as vehicle for spreading potentially pathogenic microorganisms and their genetic resistance markers. Thus, considering the risks for human and environmental health associated with the phenomenon of microbial drug resistance, our objectives were to identify Coagulase-negative *Staphylococcus* (CoNS) strains isolated from the sanitary landfill disposal of health-care waste of Juiz de Fora, MG; to determine the antimicrobial susceptibility patterns against antimicrobials of clinical and microbiological relevance; and to evaluate the occurrence of *mecA* gene. Bacterial strains presumptively characterized as CoNS (n = 109) were identified using a commercial system and the antimicrobial susceptibility patterns determined by the agar dilution technique, according to the recommendations of Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Only 26.6% of the bacterial samples were identified as follows: *S. sciuri* (31%), *S. epidermidis* (27.6%), *S. lentus* (20.7%), *S. vitulinus* (10.3%) *S. saprophyticus* (6.9%), *S. haemolyticus* (3.5%). The other strains were identified as *Staphylococcus* spp. (73.4%). Considering the minimal inhibitory concentrations of the antimicrobials, penicillin and oxacillin drugs were the less effective drugs (61.4% resistance) followed by erythromycin and azithromycin (27.3 and 22.7% resistance, respectively). The most effective antimicrobials were gentamicin and levofloxacin, for which only intermediate resistance was observed (21.6 and 1.1% respectively). All samples were susceptible to vancomycin. Considering the resistant strains, 14 (25,9%) showed to harbour *mecA* gene and in 40 (74,1%) were resistant to oxacillin by other mechanisms. Our results raise considerations related to the survival of potentially pathogenic microorganisms and strains resistant to antibiotics harboring genetic markers. It is possible that these bacteria might spread via health-care waste, contributing dissemination into hospitals.

**Keywords:** Health-care waste. Coagulase-negative *Staphylococcus*. Antimicrobial resistance. Especific Identification.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Fotografia 1: Coleta de amostras de chorume da pilha de resíduos de serviço de saúde (RSS), no aterro sanitário da cidade de Juiz de Fora, MG ..... 37
- Gráfico 1: Identificação das amostras bacterianas isoladas do chorume percolado da pilha de resíduos do serviço de saúde no aterro sanitário de Juiz de Fora, presuntivamente caracterizadas como *Staphylococcus* coagulase negativo. A – Níveis de identificação, considerando-se gênero e espécie; B – Distribuição das espécies, considerando-se o sistema BBLCrystal™ *Gram-Positive Identification Kit*..... 43
- Gráfico 2: Perfil de susceptibilidade à oxacilina das amostras de *Staphylococcus* coagulase negativo, isoladas do chorume percolado da pilha de resíduos do serviço de saúde no aterro sanitário de Juiz de Fora, no período de maio de 2006 a abril de 2007, determinado pelo método de disco-difusão..... 44
- Fotografia 2: Eletroforegrama representativo da confirmação da identidade genética de *Staphylococcus* sp. (gene 16S rRNA PCR) e detecção genética do gene *mecA* por PCR. MM – 100bp DNA ladder; Canaleta 1 – *Staphylococcus mecA* positivo; Canaleta 2 – *Staphylococcus mecA*..... 47

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos das linhagens bacterianas representativas de <i>Staphylococcus</i> sp. coagulase negativo isoladas de chorume produzido por resíduos de serviços de saúde do aterro sanitário da cidade de Juiz de Fora, MG.....	45
Tabela 2: Distribuição dos fenótipos de resistência a um ou mais de um antimicrobiano entre as amostras de <i>Staphylococcus</i> sp. coagulase negativo representativas isoladas de chorume produzido por resíduos de serviços de saúde do aterro sanitário da cidade de Juiz de Fora, MG.....	46
Tabela 3: Distribuição do gene <i>mecA</i> entre as linhagens de <i>Staphylococcus</i> coagulase negativo isoladas de chorume produzido por resíduos de serviços de saúde do aterro sanitário da cidade de Juiz de Fora, MG, sensíveis e resistentes à oxacilina, pelo método de diluição em ágar.....	47
Tabela 4: Perfil de susceptibilidade à oxacilina entre as linhagens de <i>Staphylococcus</i> sp. coagulase negativo isoladas de chorume produzido por resíduos de serviços de saúde do aterro sanitário da cidade de Juiz de Fora, MG.....	48

## LISTA DE SIGLAS

- AIDS** *Acquired Immune Deficiency Syndrome*
- ANVISA** Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- ASM** *American Society for Microbiology*
- ATCC** *American Type Culture Collection*
- BGN** Bastonete Gram-negativo
- CA-MRSA** *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina de origem comunitária
- CDC** *Centers for Disease Control and Prevention*
- CIM** Concentração Inibitória Mínima
- CLSI** *Clinical and Laboratories Standards Institute*
- CNEN** Comissão Nacional de Energia Nuclear
- CONAMA** Conselho Nacional do Meio Ambiente
- DEMLURB** Departamento Municipal de Limpeza Urbana
- DNA** Ácido desoxirribonucleico
- dNTPS** Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
- EDTA** Ácido etilenodiaminotetracético
- HA-MRSA** *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina de origem hospitalar
- HBV** Vírus da hepatite B
- HCV** Vírus da hepatite C
- HIV** Vírus da imunodeficiência humana
- IBGE** Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- ICB/UFJF** Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora
- MRSA** *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina
- ORSA** *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina
- PBP** *Protein binding penicilin* (Proteína ligadora de penicilina)
- PCR** Reação em cadeia da polimerase
- PGRSS** Plano de Gerenciamento de Resíduos de Serviços de Saúde
- RDC** Resolução da Diretoria Colegiada
- RNA** Ácido ribonucleico
- RSS** Resíduos dos Serviços de Saúde
- SCCmec** Cassete cromossômico *mec* de *Staphylococcus*
- SCN** *Staphylococcus* coagulase-negativo

**SENTRY** Programa de vigilância epidemiológica e resistência antimicrobiana

**TBE** Tampão Tris – Borato – EDTA

**TE** Tampão Tris – EDTA

**TSA** Ágar tripcaseína de soja

**TSB** Caldo tripcaseína de soja

**UFC** Unidade formadora de colônia

**UNIFESP** Universidade Federal de São Paulo

**WHO** *World Health Organization*

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>16</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>18</b>
<b>2.1 Resíduos de serviços de saúde (RSS): classificação e legislação.....</b>	<b>18</b>
<b>2.2 Potenciais de risco dos RSS.....</b>	<b>22</b>
<b>2.3 Generalidades sobre <i>Staphylococcus</i>.....</b>	<b>25</b>
2.3.1 <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativo.....	26
<b>2.4 Considerações sobre <i>Staphylococcus</i> e o fenômeno da resistência bacteriana a drogas.....</b>	<b>29</b>
2.4.1 Resistência à Oxacilina.....	31
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>35</b>
<b>3.1 Objetivo geral.....</b>	<b>35</b>
<b>3.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>35</b>
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>36</b>
<b>4.1 Amostras bacterianas.....</b>	<b>36</b>
<b>4.2 Identificação específica das linhagens de <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativo.....</b>	<b>37</b>
<b>4.3 Avaliação do perfil de susceptibilidade a drogas antimicrobianas.....</b>	<b>38</b>
<b>4.4 Extração de DNA.....</b>	<b>39</b>
<b>4.5 Detecção do gene <i>mecA</i> e controle interno para o gênero <i>Staphylococcus</i>.....</b>	<b>40</b>
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>42</b>
<b>5.1 Identificação das linhagens bacterianas.....</b>	<b>42</b>
<b>5.2 Avaliação do perfil de susceptibilidade a drogas antimicrobianas.....</b>	<b>43</b>
<b>5.3 Resistência à oxacilina e detecção do gene <i>mecA</i>.....</b>	<b>46</b>
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>49</b>
<b>6.1 Identificação das linhagens bacterianas.....</b>	<b>49</b>



<b>6.2 Avaliação do perfil de susceptibilidade a drogas antimicrobianas.....</b>	<b>52</b>
<b>6.3 Resistência à oxacilina e detecção do gene <i>mecA</i>.....</b>	<b>54</b>
<b>6.4 Considerações finais.....</b>	<b>56</b>
<b>7 CONCLUSÕES.....</b>	<b>58</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>59</b>
<b>APÊNDICES.....</b>	<b>75</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>108</b>

## 1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Atualmente, em nível mundial, nos deparamos com uma situação de alto acúmulo de lixo, principalmente nas grandes cidades, trazendo preocupação não só às autoridades políticas como também aos órgãos ambientais e a muitos pesquisadores da área, sobre como gerenciar tal problema. Em consequência, nosso planeta vem se tornando cada vez mais um grande reservatório de resíduos das mais diversas naturezas, os quais podem ser os maiores responsáveis pela poluição ambiental e acúmulo de macro e microrganismos transmissores e causadores de várias doenças para a população humana.

Devido à grande variedade de fontes geradoras de resíduos, a legislação vigente classifica os mesmos segundo sua origem. Esta legislação, entretanto, é de competência regional, e variações na classificação dos resíduos podem existir. Como legislação federal norteadora, no Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) classifica os resíduos quanto a sua origem em: resíduos urbanos, resíduos dos serviços de saúde, resíduos dos serviços de transportes, resíduos industriais e resíduos da construção civil.

Considerando-se a totalidade dos resíduos produzidos, destacam-se os RSS, que, embora representem uma pequena parcela dos resíduos totais, ocupam uma posição de extrema importância devido às suas frações infectantes, somadas a características químicas e físicas, oferecendo risco potencial à saúde pública e ao ambiente. No entanto, é grande e polêmica a discussão sobre a importância e o significado dos RSS no real potencial de risco para a saúde humana e ambiental.

Vários autores relatam que os riscos para a saúde pública gerados pelos resíduos dos serviços de saúde são comparáveis aos riscos associados aos resíduos domésticos, o que dispensaria para os primeiros uma atenção especial no que diz respeito ao tratamento, à coleta e à disposição final. A exceção unânime são as culturas microbiológicas e os resíduos perfurocortantes. O risco de contaminação pelo manuseio desses resíduos é alto, tanto no momento da geração, do acondicionamento e do descarte, quanto durante a coleta externa e a disposição final, devido às suas características físicas e ao seu potencial de contaminação através de microrganismos retidos. Isso requer normas seguras de manuseio e

acondiçãoamento, principalmente com os perfurocortantes, já que doenças infectocontagiosas como a AIDS trouxeram uma atenção muito maior a sua problemática.

Desse cenário de avaliação de risco, envolvendo algumas frações específicas dos RSS, há de se considerar outros possíveis mecanismos de sobrevivência de patógenos na massa desses resíduos, como, por exemplo, os materiais biológicos contaminados que podem constituir importantes veículos para os microrganismos causadores de doenças, quando imprópriamente manuseados ou tratados.

Os RSS constituem uma categoria específica devido a sua particularidade, especialmente em razão da presença de resíduos com risco biológico, o que leva os órgãos públicos a repensar uma provável necessidade de realizar sua disposição final diferenciada do resíduo doméstico.

Desta forma, considerando a potencialidade dos RSS como veículos de disseminação de microrganismos potencialmente patogênicos e de marcadores de resistência a drogas antimicrobianas, e dado o crescente fenômeno da resistência, já citado por diversos órgãos internacionais de vigilância epidemiológica, percebe-se a carência de estudos regionais. Assim, dando sequência à linha de pesquisa “Microrganismos associados ao ambiente nosocomial e gerenciamento de resíduos”, foi proposto o presente estudo, com o qual se pretende contribuir para a geração de conhecimento sobre a possível disseminação de microrganismos do gênero *Staphylococcus* spp. e de marcadores de resistência, pelo manejo e segregação ineficientes dos RSS.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Resíduos de Serviços de Saúde (RSS): classificação e legislação

Até o final da década de 80, o termo resíduo recebia um enfoque voltado somente ao ambiente hospitalar, sendo habitualmente designado como lixo hospitalar. Posteriormente, a denominação de resíduos de serviços de saúde foi considerada mais apropriada e completa, englobando os resíduos de quaisquer estabelecimentos de assistência à saúde (SCHNEIDER et al., 2001; TAKAYANAGUI, 2005).

No que diz respeito à definição de RSS, esta é apresentada em diversas referências bibliográficas de caráter legal, sanitário, epidemiológico, preventivo e de controle e algumas se sobrepõem, necessitando de mais esclarecimentos.

De acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) ANVISA nº 306, de 07 de dezembro de 2004, e a Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) nº 358, de 29 de abril de 2005, são definidos como RSS aqueles gerados em todos os serviços relacionados com o atendimento à saúde humana ou animal, inclusive os serviços de assistência domiciliar e de trabalhos de campo; laboratórios analíticos de produtos para a saúde; necrotérios; funerárias e serviços onde se realizem atividades de embalsamamento; serviços de medicina legal; drogarias e farmácias, inclusive as de manipulação; estabelecimentos de ensino e pesquisa na área da saúde; centro de controle de zoonoses; distribuidores de produtos farmacêuticos, importadores, distribuidores produtores de materiais e controles para diagnóstico *in vitro*; unidades móveis de atendimento à saúde; serviços de acupuntura; serviços de tatuagem, dentre outros similares (BRASIL, 2006).

De maneira expressiva, no Brasil, mais de 30 mil unidades de saúde produzem RSS, embora, devido a condições precárias do sistema de gerenciamento de resíduos, não haja estatísticas suficientes e precisas acerca do número de geradores, nem da quantidade de resíduos de serviços de saúde gerada diariamente. Além disso, algumas unidades de saúde desconhecem a quantidade e a composição dos resíduos que produzem (FERREIRA, 1995; GARCIA e ZANETTI-RAMOS, 2004).

Ressalta-se que sua peculiaridade pode determinar riscos à saúde pública e ao meio ambiente, quando imprópriamente tratado, armazenado, transportado e destinado inadequadamente (BIDONE, 2001; DA SILVA et al., 2005; DIAZ, SAVAGE e EGGERTH, 2005).

Segundo dados do IBGE, no ano 2000, das toneladas de resíduos residenciais e comerciais gerados diariamente (aproximadamente 228.413 toneladas), apenas uma fração inferior a 2% corresponde aos RSS e, destes, apenas 10% a 25% necessitam de cuidados especiais, considerando a cadeia de transmissibilidade de doenças, a capacidade de sobrevivência e virulência dos microrganismos e a susceptibilidade do hospedeiro (BRASIL, 2006; SALOMÃO, TREVIZAN e GÜNTHER, 2004; TAKAYANAGUI, 2005).

É importante observar, também, as variáveis que interferem na composição dos RSS, desde a sua origem até as alterações de suas características físicas, tornando-se necessário avaliar a questão do teor de umidade, sua composição gravimétrica, suas características químicas e biológicas. Estas variáveis podem interferir na distribuição e viabilidade de diferentes grupos microbianos, muitas vezes potencialmente patogênicos (BIDONE, 2001).

A geração dos RSS acompanha a atividade assistencial hospitalar desde seu início, porém a importância desse assunto passou a ganhar atenção significativa nos últimos anos, quando começou a ser pauta de uma ampla discussão da sociedade acadêmica, governamental e civil, uma vez que começaram a surgir graves problemas oriundos destes resíduos, entre eles, infecção hospitalar e contaminação do meio ambiente (RIBEIRO FILHO, 2000).

Portanto a quantidade limitada de informações na literatura sobre as características dos diferentes tipos de resíduos gerados em estabelecimentos de saúde (DIAZ et al., 2008), associada à escassez de recursos para o setor de saúde, o que dificulta a adoção por parte dos hospitais de sistemas de manejo, e o descaso com o gerenciamento dos resíduos dos serviços de saúde despertam na comunidade científica e política a necessidade de se repensar essa questão.

Desde que os RSS se tornaram uma preocupação a ponto de gerar discussões entre os diversos setores governamentais, políticas públicas têm sido discutidas e legislações específicas têm sido elaboradas, visando garantir o desenvolvimento sustentável e a preservação da saúde pública. Diante disso, a ANVISA, dentro da competência legal que lhe é atribuída e cumprindo sua missão

de “proteger e promover a saúde da população, garantindo a segurança sanitária de produtos e serviços e participando da construção de seu acesso”, passou a promover um grande debate público e o estabelecimento de uma normativa específica. Por isso, em 2003, foi promulgada a RDC ANVISA nº 33, de 25 de março de 2003, para atender às questões ambientais e de saúde pública e disponibilizar informações técnicas aos estabelecimentos de saúde, assim como aos órgãos de vigilância sanitária sobre as técnicas adequadas de manejo dos RSS, seu gerenciamento e sua fiscalização (BRASIL, 2006).

No entanto, a adoção dessa metodologia de análise de risco que resultou na classificação e na definição de regras de manejo se afastava das orientações da área ambiental estabelecidas na Resolução CONAMA nº 283, de 12 de julho de 2001 (BRASIL, 2006).

A fim de se resolver esta situação, ambos os órgãos buscaram a complementação das regulamentações, e o entendimento foi alcançado com a publicação da RDC nº 306 pela ANVISA, em dezembro de 2004, e da Resolução nº 358 pelo CONAMA, em maio de 2005 (BRASIL, 2006).

Com base em ambas as legislações, competem aos serviços gerais de RSS organizar o sistema de manejo de resíduos em relação a sua classificação. A seguir, resumidamente, descrevem-se os diversos grupos referentes à classificação de RSS, segundo o Ministério da Saúde (BRASIL, 2006):

- Grupo A - engloba os componentes com possível presença de agentes biológicos que, por suas características de maior virulência ou concentração, podem apresentar risco de infecção. Exemplos: placas e lâminas de laboratório, carcaças, peças anatômicas (membros), tecidos, bolsas transfusionais contendo sangue, entre outros.

- Grupo B - compreende substâncias químicas que podem apresentar riscos à saúde pública ou ao meio ambiente, dependendo de suas características de inflamabilidade, corrosividade, reatividade e toxicidade. Ex: medicamentos apreendidos, reagentes de laboratório, resíduos contendo metais pesados, entre outros.

- Grupo C - quaisquer materiais resultantes de atividades humanas que contenham radionuclídeos em quantidades superiores aos limites de eliminação especificados nas normas da Comissão Nacional de Energia Nuclear - CNEN, como, por exemplo, serviços de medicina nuclear e radioterapia, etc.
- Grupo D - não apresentam risco biológico, químico ou radiológico à saúde ou ao meio ambiente, podendo ser equiparados aos resíduos domiciliares. Ex: sobras de alimentos e do preparo de alimentos, resíduos das áreas administrativas, etc.
- Grupo E - materiais perfurocortantes ou escarificantes, tais como lâminas de barbear, agulhas, ampolas de vidro, pontas diamantadas, lâminas de bisturi, lancetas, espátulas e outros similares.

Destaca-se também que as duas resoluções apresentadas apontam para a obrigatoriedade de todos os geradores de resíduos de serviços de saúde elaborarem e executarem um plano de gerenciamento de resíduos de serviços de saúde (PGRSS) adequado a cada estabelecimento de saúde. Este planejamento constitui instrumento de fundamental importância em termos de caracterização quantitativa e qualitativa dos resíduos gerados, a fim de minimizar tanto a quantidade desses resíduos como os riscos de transmissão de doenças e contaminação do meio ambiente (HADADD, 2006).

Até o presente momento, os estabelecimentos de serviços de saúde, em sua maioria, não executam na íntegra as considerações contidas nas resoluções descritas anteriormente. O gerenciamento de resíduos de serviços de saúde constitui um conjunto de procedimentos de gestão, planejamento e implementações a partir de bases técnico-científicas, com observância da legislação, principalmente no que diz respeito às responsabilidades e corresponsabilidades dos geradores, assim como à do responsável técnico para resíduos. Devem-se considerar os princípios de biossegurança, preservação da saúde pública, meio ambiente, normas, exigências legais e técnicas adequadas de manejo dos resíduos de acordo com o que estabelecem os órgãos federais, estaduais e municipais.

## 2.2 Potenciais de risco dos RSS

Antes de qualquer discussão, é necessário conceituar o termo risco, que, segundo a Organização Mundial de Saúde, é a probabilidade de ocorrência de um resultado desfavorável ou algum dano (WHO, 2009). É grande e polêmica a discussão sobre a importância e o significado dos RSS no potencial de risco para a saúde humana e ambiental. Neste momento, o primeiro tipo de risco a ser evidenciado é o biológico, mas não podemos nos esquecer dos riscos mecânicos, físicos e químicos.

Alguns autores afirmam que não existem fatos que comprovem que o resíduo hospitalar seja mais contaminado que o resíduo doméstico e que possa causar doença no ambiente hospitalar ou na comunidade, por não haver evidências científicas que comprovem a existência de uma relação de causa-efeito entre o contato com o resíduo e a aquisição de doenças (RUTALA, ODETTE e SAMSA, 1989; RUTALA e SARUBBI JÚNIOR, 1983; ZANON, 1990; ZANON e EIGENHEER, 1991).

Ampliando as discussões sobre os riscos associados aos RSS, trabalhos científicos confirmam o reconhecimento dos riscos desses resíduos, pela sobrevivência de agentes dotados de elevada resistência às condições ambientais. Morel e Bertussi Filho (1997) identificaram importantes patógenos nos resíduos sólidos, tais como o *Mycobacterium tuberculosis*, que apresentou um tempo de resistência ambiental de até 180 dias na massa de resíduos sólidos. De forma a destacar outras características peculiares de agentes biológicos na presença de RSS, Deus e colaboradores (2004) observaram a resistência à dessecação da enterobactéria *Escherichia coli*, com a possibilidade de causar infecção, na presença de proteínas derivadas de fluidos corpóreos (sangue e derivados).

Dentro do grupo A, cujo potencial de risco está associado à presença de agentes biológicos, o risco de contaminação pelo manuseio desses resíduos é alto, tanto no momento da geração, do acondicionamento e do descarte, quanto durante a coleta externa e a disposição final, devido às suas características físicas e ao seu potencial de contaminação através de microrganismos retidos, requerendo normas seguras de manuseio e acondicionamento (BIDONE, 2001; NAZAR, PORDEUS e WERNECK, 2005; TAKAYANAGUI, 1993). Portanto, a ausência de dados e estudos que justifiquem os riscos dos RSS não pode ser a razão para que estabelecimentos



de saúde deixem de adotar políticas e programas para reduzir possíveis riscos associados a esses resíduos (GARCIA e ZANETTI-RAMOS, 2004).

Em termos de riscos potenciais, com a geração de novos materiais, substâncias e equipamentos com presença de componentes mais complexos, resultado da incorporação de novas tecnologias aos métodos de diagnósticos e tratamento, a produção de RSS vem se tornando cada vez mais perigosa para o homem que os manuseia e para o meio ambiente que os recebe (BRASIL, 2006).

O principal problema relacionado aos RSS é o conteúdo de microrganismos potencialmente patogênicos, que, favorecidos pela pressão seletiva de antimicrobianos, outros medicamentos e produtos químicos, ao serem dispostos em conjunto, podem apresentar um caráter de multirresistência ao ambiente hospitalar, podendo contaminar artigos hospitalares, provocar infecções de difícil tratamento e serem disseminadas no esgoto de hospitais (KÜMMERER, 2003; SANCHEZ, 1995).

Os microrganismos que podem ser encontrados nos RSS apresentam capacidade de persistência ambiental e grande potencial de patogenicidade, considerando-se, sobretudo, a susceptibilidade dos possíveis hospedeiros, humanos ou não, que entrem, eventualmente, em contato com eles. Destacam-se bactérias da microbiota anfibiótica, tais como: *Enterococcus* spp.; *Klebsiella* spp.; *Salmonella* spp.; *Shigella* spp.; *Vibrio cholerae*; *Streptococcus pneumoniae*; *Staphylococcus* spp.; *Staphylococcus aureus*. Além destes, outros microrganismos, como *Neisseria gonorrhoeae*; *Bacillus anthracis*; *Mycobacterium tuberculosis*; vírus do herpes; vírus da imunodeficiência humana; vírus das hepatites A, B e C; *Candida albicans*, e outros fungos também podem ser encontrados. Segundo a literatura, há de se considerar, ainda, a ocorrência de helmintos e outros parasitas nos RSS (BIDONE, 2001; MOREL e BERTUSSI FILHO, 1997).

No que diz respeito ao manejo, o risco dos RSS está vinculado aos acidentes que ocorrem devido às falhas no acondicionamento e segregação dos materiais perfurocortantes sem utilização de proteção mecânica. Já os riscos ao meio ambiente estão ligados ao potencial de contaminação do solo, das águas superficiais e subterrâneas, pelo lançamento de RSS em lixões ou aterros controlados. Por fim, há o risco de contaminação do ar, com a formação de gás metano e gás carbônico, quando os RSS são tratados pelo processo de incineração descontrolado, ainda muito utilizado como sistema de tratamento em algumas

localidades, sem o devido critério técnico, emitindo poluentes para a atmosfera (BRASIL, 2006; COLLINS, 1991; SOUZA, 2005).

Com relação à contaminação ambiental, sabe-se que, apesar de toda a legislação vigente, o destino final de grande parte dos RSS ainda é inadequado, sendo que a maioria dos municípios utiliza-se de lixões como destino final de seus resíduos, e, em apenas uma pequena parcela de municípios, os RSS recebem tratamento adequado e destino final em aterro sanitário (SEGURA-MUNOZ, 2002). Segundo dados do IBGE (2009), no início desta década, 74% dos municípios brasileiros depositavam seus RSS a céu aberto, 57% segregavam os dejetos nos hospitais e apenas 14% das prefeituras tratavam adequadamente os RSS.

Embora ainda existam controvérsias a respeito da possibilidade de o líquido percolado dos RSS atingir mananciais de água potável, a disposição inadequada dos RSS em lixões a céu aberto, sem qualquer tipo de tratamento, facilita a contaminação de rios e outros corpos d'água, sejam superficiais ou subterrâneos e pode disseminar doenças pela proliferação de vetores, além de outras tragédias ambientais. A utilização de aterros sanitários minimiza muito destes problemas (SOUZA, 2005).

Em se tratando da saúde ocupacional de quem manipula os RSS, o pessoal ligado à assistência de saúde, os funcionários do setor de higiene e limpeza, os usuários do serviço, equipe de coleta ou até mesmo os catadores que permanecem em lixões são os que estão mais susceptíveis a adquirir alguma infecção (SANCHEZ, 1995). Os riscos de contaminação estão relacionados à exposição direta durante a manipulação, armazenamento, coleta, transporte e disposição final; ao contato com vetores, plantas, solo; à ingestão de água ou alimentos contaminados e à disseminação por meio de vias aéreas (SANCHEZ, 1995).

Alguns estudos demonstram a contaminação de profissionais da saúde, de serviços de limpeza e até mesmo de profissionais do setor de manutenção em procedimentos envolvendo os resíduos do tipo perfurocortantes, por HIV, hepatite B, tuberculose, HBV e HCV (JOHNSON et al., 2000; RUTALA, 1997; SHAPIRO, 1995).

Dados de um estudo realizado no hospital universitário da UNIFESP e relatado por Souza (2005) revelam, entre os anos de 1992 a 2001, um percentual de 76% de acidentes provocados por materiais perfurocortantes. A pesquisa revela ainda os quatro momentos de acidente: 10% durante o transporte; 21% ao se reencaparem agulhas; 23% durante o manuseio para descarte e 46% ao descartar o

material em local. Possíveis infecções decorrentes destes acidentes estão relacionadas com o grau de exposição aos materiais perfurocortantes contaminados com sangue, hemoderivados e fluidos corpóreos e com o tempo de atividade profissional que o expõe a estes materiais, além de susceptibilidade do hospedeiro, profundidade da lesão e carga microbiana inoculada.

Portanto, faz-se necessária uma atenção especial no gerenciamento e a utilização de técnicas corretas de manejo em todo o caminho percorrido pelos RSS, enquanto resíduos infectantes e com potencial de risco para a saúde humana e ambiental.

Da mesma forma, surgem novas atribuições para os diversos setores da administração pública, como os governos municipais, que passam a não ser mais apenas responsáveis pela prestação dos serviços de coleta e destinação final dos resíduos, mas também são responsáveis, atualmente, pela inserção dos resíduos nas políticas públicas, bem como por buscar processos, estratégias, instrumentos ou mecanismos que contribuam para garantir a continuidade das políticas, programas, ações e investimentos financeiros e sociais, ou seja, são responsáveis pela gestão integrada dos resíduos sólidos (ZANON, 1990).

### **2.3 Generalidades sobre *Staphylococcus***

O gênero *Staphylococcus* pertence à família *Staphylococcaceae*, sendo composto por 41 espécies e 24 subespécies (EUZÈBY, 2009). 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. Eles são imóveis, resistentes à bacitracina, não esporulados, 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; 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 gastrointestinal dos hospedeiros (JARLOV, 1999; RHODEN e MILLER, 1995; WILKINSON, 1997).

Entre as espécies de *Staphylococcus* encontradas em 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. auriculares*, *S. cohnii*, *S. xylosus*, *S. simulans* entre outras. Muitas destas espécies residem no homem, porém *S. xylosus* e *S. simulans* são geralmente transitórios, sendo, primariamente, adquiridos de animais domésticos, enquanto alguns *Staphylococcus* humanos são transitórios ou temporariamente residentes no animal doméstico (BANNERMAN, 2003).

As espécies do gênero *Staphylococcus* podem ser classificadas em coagulase-negativos e coagulase-positivos de acordo com sua capacidade de coagular o plasma humano através da ação da enzima coagulase (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 hospitalares como adquiridas na comunidade (CASEY, LAMBERT e ELLIOTT, 2007; SCANVIC et al., 2001). 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 infecções hospitalares (JARLOV, 1999).

### 2.3.1 *Staphylococcus* coagulase negativo

Membros do grupo dos *Staphylococcus* coagulase-negativo (SCN) foram considerados durante muito tempo como microrganismos saprófitas e contaminantes de pouca importância clínica, entretanto a sua capacidade de causar infecções

tornou-se crescente nas últimas quatro décadas, a partir do aumento na utilização de dispositivos modernos e invasivos de diagnóstico e terapêutica, como próteses articulares, cateteres, válvulas cardíacas e outros dispositivos invasivos associados a pacientes hospitalizados em condições de imunossupressão (CASEY, LAMBERT e ELLIOT, 2007; HUEBNER e GOLDMANN, 1999).

Dessa forma, os SCN ocupam uma posição de destaque entre os patógenos hospitalares, principalmente nas últimas décadas, resultando em aumento da morbidez, do custo e da dificuldade de tratamento (HUEBNER e GOLDMANN, 1999; VON EIFF, PETERS e HEIFMANN, 2002). Dados dos hospitais brasileiros que participam do Programa SENTRY indicam os SCN no segundo lugar entre os patógenos isolados em hemoculturas de pacientes com infecção da corrente sanguínea de 2001 a 2005 (SADER, 2006). Entre as espécies de SCN, as que têm sido mais isoladas de infecções humanas, especialmente de bacteriemias e infecções relacionadas a dispositivos médicos, são *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* e *S. hominis* (BANNERMAN, 2003; ING, BADDOUR e BAYER, 1997; OTTO, 2004 RUHE et al., 2004).

Representantes da espécie *S. epidermidis*, tem sido o SCN mais relacionado com infecções hospitalares (CUNHA et al., 2002), sendo responsável por cerca de 50% a 70% de infecções relacionadas a cateteres (VON EIFF, PETERS e HEIFFMANN, 2002). Esta espécie tem sido isolada de endocardites, infecções de sítio cirúrgico e do trato urinário, fluido cérebro espinhal, próteses articulares e cateter intravascular, sendo o microrganismo mais frequentemente isolado de bacteremias (BANNERMAN, 2003; MULDER, 1995). Infecções causadas por *S. epidermidis*, muitas vezes associadas à introdução de corpos estranhos na pele íntegra, são caracterizadas pela habilidade desta espécie em colonizar superfícies poliméricas e pela formação de uma densa multicamada de células, constituindo um biofilme (VON EIFF, PETERS e HEIFFMANN, 2002).

*S. saprophyticus* é um importante patógeno oportunista em infecções não complicadas do trato urinário, especialmente em mulheres jovens, sexualmente ativas. Ao contrário da maioria das espécies de SCN, *S. saprophyticus* demonstra-se mais sensível aos antibióticos ativos contra microrganismos Gram-positivos, embora não esteja bem documentada na literatura a resistência aos antimicrobianos e a disseminação dessas espécies (BANNERMAN, 2003; HIGASHIDE et al., 2008).

Entre os SCN, *S. haemolyticus* desempenha um papel importante em infecções oportunistas adquiridas no hospital, sendo a segunda espécie mais frequentemente isolada em hemoculturas, estando relacionada a endocardites, otites, septicemias, peritonites, infecções geniturinárias, ósseas e articulares. Esta espécie foi a primeira entre os SCN a demonstrar resistência à teicoplanina e vancomicina e é conhecida por seu fenótipo multidroga resistente com sensibilidade diminuída a meticilina e glicopeptídeos (BANNERMAN, 2003; FALCONE et al., 2006; FLAHAUT, 2008; ING, BADDOUR e BAYER, 1997; SIERADZKI, VILLARI e TOMASZ, 1998). Além da resistência a glicopeptídeos, foram relatadas também linhagens de *S. haemolyticus* resistentes a quinolonas (YONEZAWA et al., 1996). Vários estudos demonstraram a presença de *S. haemolyticus* resistente a múltiplos antimicrobianos no ambiente hospitalar, bem como a transmissão de clones resistentes pelas mãos dos profissionais de saúde (PERDEAU-REMGTON et al., 1995; TABE et al., 1998).

*S. lugdunensis* é um patógeno encontrado principalmente em infecções humanas, tais como infecções cardiovasculares, pele e tecidos moles, corrente sanguínea, trato urinário, sistema nervoso central entre outras (AKIYAMA et al., 1998; ANGUERA et al., 2005; CASANOVA-ROMAN, SANCHEZ-PORTO e CASANOVA-BELLIDO, 2004; CASTRO e DOWDY, 1999; GIANELLA et al., 2006). A terceira espécie mais isolada em infecções hospitalares, *S. hominis*, é causa de artrites e endocardites e tem sido isolada de casos de septicemia (BANNERMAN, 2003; ING, BADDOUR & BAYER, 1997; RUHE et al., 2004).

Assim como *S. lugdunensis*, *S. schleiferi*, após sua descrição em 1988, foi relatado como patógeno causador de uma variedade de infecções nosocomiais, incluindo endocardites, infecções relacionadas a implantes ortopédicos, osteomielites, artrite séptica e infecções do trato urinário (CALVO et al., 2000; PATEL et al., 2000).

Membros do grupo *Staphylococcus sciuri* estão amplamente difundidos na natureza, podendo ser isolados de animais domésticos e selvagens, assim como produtos alimentícios de origem animal (GARCIA et al., 2002; HAUSCHILD e SCHWARZ, 2003; KLOOS et al., 1997; STEPANOVIC et al., 2001; WEBSTER et al., 1994). Pertencem a este grupo *Staphylococcus sciuri* subsp. *carnaticus*, *Staphylococcus sciuri* subsp. *rodentium*, *Staphylococcus sciuri* subsp. *sciuri*, *Staphylococcus lentus* e *Staphylococcus vitulinus* (KLOOS et al., 1997; WEBSTER

et al., 1994). Apesar de estarem associados a animais, estas espécies podem colonizar os seres humanos e estima-se que podem constituir 0,79% a 4,3% do número total de SCN isolados de amostras clínicas (GUIRGUITZOVA, CHANKOVA e ZOZIKOV, 2002; STEPANOVIC et al., 2003). Tem sido associadas a infecções graves como endocardites, peritonites, choque séptico, infecção do trato urinário e, com maior frequência, infecções de ferida (HEDIN e WIDERSTROM, 1998; HORII et al., 2001; SHITTU et al., 2004; STEPANOVIC et al., 2002; STEPANOVIC et al., 2003; WALLET et al., 2000).

Outros SCN têm sido implicados em uma variedade de infecções. Por exemplo, *S. capitis*, *S. caprae*, *S. saccharolyticus*, *S. simulans* e *S. warneri* estão frequentemente associados a endocardites; *S. capitis*, *S. simulans* e *S. warneri*, isolados de septicemias; *S. warneri* e *S. simulans*, isolados de osteomielites; *S. cohnii* tem sido associado a endocardites e pneumonias; *S. cohnii*, *S. xylosus* e *S. caprae*, encontrados em quadros de artrite; *S. caprae* é uma espécie já isolada de feridas e infecções articulares e osteomielites; *S. capitis* e *S. warneri* estão relacionados a infecções de cateteres; enquanto amostras de *S. sciuri* têm sido isoladas de feridas cutâneas e infecções de tecido mole (BANNERMAN, 2003; KONEMAN, 2008).

#### **2.4 Considerações sobre *Staphylococcus* e o fenômeno 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 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 extracromossomais 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 (KONEMAN, 2008).

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 60% dos isolados tornaram-se resistentes (CDC, 2002). 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). Atualmente as taxas de *S. aureus* resistentes à penicilina alcançam a marca de 95% (STREIT et al., 2004).

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 infecções hospitalares (nosocomiais) ou comunitárias (LENCASTRE, 2001).

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



O aumento no número de infecções hospitalares causadas por SCN nos últimos anos e sua frequente resistência às penicilinas resistentes às penicilinases (metecilina e oxacilina), a qual indica resistência cruzada com todas as classes de betalactâmicos, têm sido fonte de estudo de muitos pesquisadores em todo o mundo (De GIUSTI et al., 1999; LYYTIKÄINEN et al., 1996).

Estudos realizados demonstraram uma agravante relacionada às infecções causadas por SCN devido à frequente ocorrência de amostras multirresistentes tanto no Brasil, onde a frequência de detecção é de 62% de amostras de SCN resistentes à oxacilina, quanto no mundo, com taxas superiores a 70% dos isolados clínicos resistentes frente a este antimicrobiano (DIEKEMA et al., 2001; FERREIRA et al., 2002; MICHELIM et al., 2005).

Além disso, observa-se um aumento no uso de glicopeptídeos para terapia empírica, profilática e até mesmo alternativa. No entanto, a seleção de resistência aos glicopeptídeos, o elevado potencial transmissivo de seus marcadores entre espécies, somado à elevada toxicidade provocada no organismo humano, têm nos mostrado a necessidade do uso restrito desses antimicrobianos (De GIUSTI et al., 1999; RYBAK, 2006).

Todas essas características promovem um impacto substancial nos aspectos clínicos e terapêuticos, afetando desfavoravelmente a morbidade e mortalidade dos pacientes e contribuindo para um tratamento prolongado e dispendioso (De GIUSTI et al., 1999; LIVERMORE, 2003).

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

#### 2.4.1 Resistência à Oxacilina

A introdução da metecilina e de outras penicilinas semissintéticas, tais como a oxacilina em 1959, representou um passo significativo na terapia antiestafilocócica (MARTINS e CUNHA, 2007). No entanto, o surgimento e a propagação mundial de amostras de *Staphylococcus aureus* resistente à metecilina (MRSA) entre o início dos

anos 60 e final dos anos 90 começaram a apresentar sérias ameaças a esta terapia, em doenças de todo o mundo (WU, DE LENCASTRE e TOMASZ, 2001).

No início, 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, nos dias atuais, não ser mais um patógeno relacionado apenas a infecções adquiridas no ambiente hospitalar. Em meados dos anos 90, surgiram os primeiros relatos de infecções por MRSA associadas à comunidade (CA-MRSA), em pessoas sem fatores de risco identificáveis como contato direto e indireto com serviços de saúde (HA-MRSA) (CHAMBERS, 2001; GORAK, YAMADA e BROWN, 1999; HEROLD et al., 1998).

A resistência de *Staphylococcus* à meticilina é um problema de proporções mundiais com estudos realizados em toda Europa, África, América e Ásia, demonstrando uma predominância de MRSA na maioria dos isolados (WITTE, 1999).

Evidencia-se também, nas últimas décadas, um aumento substancial da frequência de resistência à oxacilina em isolados de SCN com taxas acima de 70% na maioria dos isolados (DIEKEMA et al.; 2001).

A resistência à oxacilina em *Staphylococcus 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 betalactâmicos (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).

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 meticilina, denominadas complexo do gene *mec*, no qual está inserido o gene

*mecA*, juntamente com genes reguladores de sua transcrição, *mecI* e *mecR1* e complexo do gene *ccr*, 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 *SCCmec* 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, D e E e *ccr* com os tipos 1, 2, 3, 4 e 5, temos, até o momento, descritos sete tipos de elemento *SCCmec*, classificados de I a VII (HIGUCHI et al. 2008; ITO et al, 2004; MARTINS e CUNHA, 2007; OLIVEIRA et al., 2006).

Enquanto os HA-MRSA carregam *SCCmec* dos tipos I a III, os CA-MRSA estão mais associados aos tipos IV, V, VI e VII. No que diz respeito à disseminação de genes de resistência, os dos tipos I, IV, V, VI e VII conferem apenas resistência aos betalactâmicos, enquanto os tipos II e III determinam resistência a outras classes de antimicrobianos como aminoglicosídeos, tetraciclinas e até mesmo alguns metais pesados, por possuírem elementos genéticos adicionais (plasmídeos e transposons) integrados a seus cassetes (COOMBS et al., 2006; HIGUCHI et al. 2008; ITO et al., 2001; ITO et al., 2003; ITO et al., 2004; OLIVEIRA, MILHEIRIÇO e DE LENCASTRE, 2006).

Mesmo com toda essa descrição, e por estar disseminado entre várias espécies do gênero *Staphylococcus*, é importante ressaltar ainda o desconhecimento sobre a origem do *SCCmec*. Diversos estudos têm mostrado similaridade entre o gene *mecA* de MRSA com as sequências de aminoácidos de *Staphylococcus sciuri*. Um fato interessante é que este gene homólogo é ubíquo nesta espécie, mas seu fenótipo é sensível. Este e outros dados sustentam a hipótese de que o *SCCmec* é originário de espécies de SCN, possivelmente uma espécie evolucionariamente próxima do *S. sciuri*, no entanto seria prematuro afirmar que existe um consenso sobre esta origem (CHAMBERS, 1997; WU et al., 1996).

É importante afirmar que a resistência fenotípica à oxacilina é variável e depende 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 de diferentes condições ambientais (LOWY, 2003; MARANAN et al., 1997).

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

Atualmente, a detecção do gene *mec A* 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 aparelhos 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).

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 das bactérias (ASM, 2000; LEVY, 1998).

Portanto, dada à potencialidade dos RSS como agentes de disseminação de microrganismos potencialmente patogênicos para os seres humanos e outros animais, além da possível disseminação de marcadores de resistência a drogas antimicrobianas, percebe-se a importância da geração de conhecimento científico sobre o assunto, além da disponibilização de dados que permitam ações educativas e normativas, no que diz respeito ao manejo correto dos RSS.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

- Avaliar a ocorrência de *Staphylococcus* coagulase negativo no aterro sanitário da cidade de Juiz de Fora, MG na pilha de resíduos do serviço de saúde, sua susceptibilidade aos antimicrobianos e a ocorrência de marcador genético de resistência à oxacilina.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Identificar linhagens de cocos Gram positivos do gênero *Staphylococcus*, coagulase negativo, isoladas dos resíduos do serviço de saúde no aterro sanitário municipal da cidade de Juiz de Fora, MG.
- Determinar o perfil de susceptibilidade a drogas antimicrobianas de interesse microbiológico das linhagens bacterianas recuperadas e identificadas.
- Pesquisar a ocorrência do gene *mecA* nas diferentes linhagens de *Staphylococcus* coagulase negativo provenientes dos resíduos do serviço de saúde em Juiz de Fora, MG, pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR).
- Relacionar o fenótipo de resistência à oxacilina com a presença ou ausência do marcador molecular, *mecA*, nas diferentes linhagens de *Staphylococcus* coagulase negativo provenientes dos resíduos do serviço de saúde em Juiz de Fora, MG.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Amostras bacterianas

Foram analisadas neste estudo 109 linhagens de *Staphylococcus* coagulase negativo pertencentes à coleção de culturas bacterianas do Laboratório de Fisiologia e Genética Molecular Bacteriana do Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia do ICB/UFJF.

Essas linhagens foram isoladas de 13 amostras de 10mL de chorume, que segundo Sisino e Oliveira (2002) é um líquido altamente poluente e de complexa composição resultante do percolado da massa de lixo por ação da água que carrega compostos orgânicos e inorgânicos e produtos em decomposição.

As coletas foram realizadas no aterro sanitário da cidade de Juiz de Fora, MG, do Departamento Municipal de Limpeza Urbana, no período de abril de 2006 a abril de 2007, mensalmente, preferencialmente em dias quentes em que não houvessem ocorrido episódios de chuva nos dias anteriores (Figura 1). O Aterro Sanitário Salvaterra teve seu início em janeiro de 1999 (ainda como um simples vazadouro) e localiza-se nas margens da Rodovia BR-040, Km 797, em gleba de aproximadamente 40 hectares, situada a 11,20Km do centro da cidade (DEMLURB, 2009).

Após a imersão de um equipo, previamente esterilizado e transportado assepticamente, no poço de chorume originado pela degradação microbiana dos resíduos, com auxílio de uma pipeta de vidro, o material foi coletado e transferido a um tubo de ensaio, também esterilizado, e imediatamente transportado ao laboratório.

A partir das amostras de chorume, foram realizadas diluições seriadas ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ ) em solução salina (NaCl 0,85%), e 0,1mL foi retirado de cada diluição e inoculado em placas de Petri, contendo ágar Hipertônico Manitol (Difco Laboratories, Detroit, MI), para isolamento seletivo de representantes do gênero *Staphylococcus*. Colônias sugestivas representativas foram isoladas e os microrganismos avaliados quanto à sua morfologia pelo método de Gram. As amostras bacterianas foram caracterizadas presuntivamente pela habilidade de fermentação anaeróbica da glicose, produção das enzimas catalase e coagulase e teste da fermentação do manitol (MAURÍCIO, 2006; NASCIMENTO, 2007).



Fotografia 1. Coleta de amostras de chorume da pilha de resíduos de serviço de saúde (RSS) no aterro sanitário da cidade de Juiz de Fora, MG.

#### 4.2 Identificação específica das linhagens de *Staphylococcus coagulase* negativo

As amostras bacterianas foram identificadas através do sistema miniaturizado BBLCrystal™ *Gram-Positive Identification System* (BBLCrystal GP ID Kit - Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD USA), de acordo com as instruções do fabricante.

O sistema é composto por painel de 30 poços com 30 substratos desidratados, incluindo um teste controle de fluorescência, que foi preenchido com suspensões bacterianas a partir de amostras crescidas em ágar TSA (Acumedia Manufacturers, USA), de acordo com recomendações do fabricante. Após inóculo, o sistema foi fechado e incubado a 37°C por cerca de 18 a 24 horas. A leitura foi realizada analisando-se as alterações de cor ou presença ou ausência de fluorescência resultante da atividade metabólica dos microrganismos. O resultados foram convertidos em números de dez dígitos cujo perfil foi analisado de acordo com a base de dados do BBLCrystal GP ID Kit.

Para o controle de qualidade dos experimentos de identificação específica, foram utilizadas as amostras *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

### 4.3 Avaliação do perfil de susceptibilidade a drogas antimicrobianas

Inicialmente foi realizado um *screening* inicial, qualitativo, determinando o perfil de susceptibilidade à oxacilina pelo método de disco-difusão, segundo recomendações do CLSI (2007), utilizando-se discos impregnados com a droga (Laborclin Produtos para Laboratório, Paraná, Brasil).

As linhagens bacterianas foram inoculadas em ágar TSA e incubadas a 37°C, por 24 horas em estufa bacteriológica. Após crescimento bacteriano, com auxílio de uma alça de platina, foram obtidas suspensões bacterianas em solução salina estéril (NaCl 0,9%), com turbidez ajustada a 0,5 na escala McFarland ( $\sim 10^8$  UFC/mL). Com o auxílio de um *swab* estéril, foi realizado inóculo com distribuição homogênea na superfície de uma placa de ágar Mueller-Hinton (HiMedia Laboratories, Mumbai, Índia), com 2% de NaCl, de forma a obter um crescimento confluyente. Os discos foram depositados sobre o meio e a leitura dos halos de inibição foi realizada após 24 horas de incubação a 35°C, determinando-se o diâmetro do halo de inibição do crescimento bacteriano e comparando à tabela de referência (Anexo A). Para controle de qualidade, foi incluída a amostra de referência *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e os experimentos realizados em duplicata.

Posteriormente, foi realizada uma avaliação quantitativa do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos, determinando-se as concentrações inibitórias mínimas (CIMs) para penicilina, oxacilina, eritromicina, azitromicina, levofloxacina, gentamicina e vancomicina pelo método de diluição em ágar, segundo recomendações do CLSI (2007).

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 $\mu$ m) e conservadas em freezer a -20°C. Concentrações crescentes (de 0,0625 $\mu$ g/mL a 1.024,0 $\mu$ g/mL) das drogas, a partir de soluções estoque, foram adicionadas a frascos contendo 20,0mL do meio de cultura fundido (45°C), ágar Müller-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°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 foi 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 feito inoculando-se, também, amostra de referência *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, cujos perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos são conhecidos.

#### 4.4 Extração de DNA

O DNA genômico das amostras bacterianas isoladas foi extraído pelo método de digestão química em fenolclorofórmio, de acordo com metodologia já estabelecida para obtenção de DNA de alto grau de pureza com modificações (DINIZ et al., 2004).

A partir de um crescimento bacteriano de 24h em 3,0mL de caldo TSB (Acumedia Manufacturers, USA), 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 foram 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 durante 30 minutos, 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 Detecção do gene *mecA* e controle interno para o gênero *Staphylococcus*

Para a pesquisa do gene *mecA* e confirmação da identidade genérica das amostras bacterianas pela pesquisa de região específica do DNA codificador para região interna do RNA ribossomal 16S nas amostras bacterianas em estudo, foi utilizada a técnica da reação em cadeia da polimerase, de acordo com metodologias já estabelecidas (STROMMINGER et al., 2003; ZHANG et al., 2004). Foram utilizados os seguintes iniciadores de sequência específica Staph756F (5'AACTCTGTTATTAGGGAAGAACA3'), Staph750R (5'CCACCTTCCTCCGGT TTGTCACC3'), MecA1 (5'GTAGAAATGACTGAACGTCCGATAA3') e MecA2 (5'CCAATTCCACATTGTTTCGGTCTAA3'), em um volume final de reação de 25µL, contendo 0,07µM dos iniciadores Staph 756F e Staph 750R, 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, MgCl<sub>2</sub> e tampões em uma concentração ótima para eficiente amplificação do DNA. As condições de amplificação da PCR-multiplex 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.

Alternativamente, para confirmação, foram utilizados os iniciadores de sequência específica Ubiquitous STAPH-1 (5'CAGCTCGTGTGTCGTGAGATGT3'), Ubiquitous STAPH-2 (5'AATCATTTGTCCCACCTTCG3'), em um volume final de reação de 25µL contendo 2,5pmol dos iniciadores Ubiquitous STAPH-1 e Ubiquitous STAPH-2, 2µL do DNA molde e 12,5µL PCR Master Mix® (Promega Corporation, Madison, WI, USA) contendo Taq DNA polimerase, dNTPs, MgCl<sub>2</sub> e tampões em uma concentração ótima para eficiente amplificação do DNA. As condições de amplificação 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, e extensão final de 72°C, por 4min.

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 e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228.

Os amplicons obtidos em cada reação foram visualizados em gel de poliacrilamida a 6%, em TBE 1X, ou 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., Gaithersburg, MD, EUA).

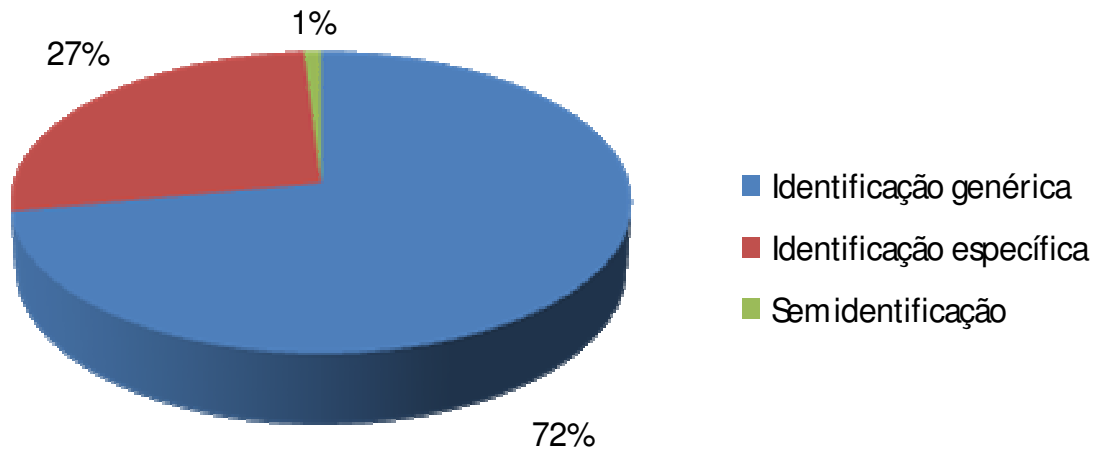
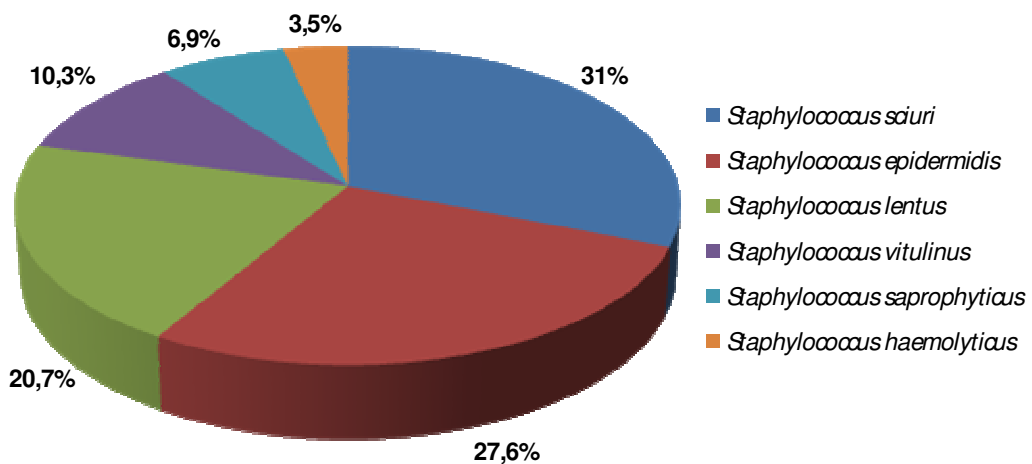
## 5 RESULTADOS

### 5.1 Identificações das linhagens bacterianas

Considerando-se as 109 linhagens bacterianas caracterizadas presuntivamente, por métodos bioquímico-fisiológicos convencionais, como *Staphylococcus* spp. coagulase negativo isoladas de amostras de chorume percolado da deposição e decomposição de resíduos do serviço de saúde, no aterro sanitário da cidade de Juiz de Fora, MG, 108 tiveram sua identidade genética confirmada pela pesquisa de região específica do DNA codificador para região interna do RNA ribossomal 16S. Observaram-se 99,08% de correlação entre as duas metodologias.

O sistema miniaturizado semiautomatizado BBLCrystal™ *Gram-Positive Identification Kit* baseado em provas bioquímico-fisiológicas permitiu a identificação específica de apenas 29 das 108 linhagens bacterianas pertencentes ao gênero *Staphylococcus* (26,85%). Assim, 72,5% dos microrganismos isolados foram identificados como *Staphylococcus* sp. (Figura 2a).

Entre as linhagens identificadas em nível de espécie, 31% (9/29) foram identificadas como *Staphylococcus sciuri*; 27,6% (8/29), como *Staphylococcus epidermidis*; 20,7% (6/29), como *Staphylococcus lentus*; 10,3% (3/29), como *Staphylococcus vitulinus*; 6,9% (2/29), como *Staphylococcus saprophyticus* e 3,5% (1/29), como *Staphylococcus haemolyticus* (Figura 2b).

**A****B**

Gráficos 1. Identificação das amostras bacterianas isoladas do chorume percolado da pilha de resíduos do serviço de saúde no aterro sanitário de Juiz de Fora, presuntamente caracterizadas como *Staphylococcus* coagulase negativo. A – Níveis de identificação considerando-se gênero e espécie; B – Distribuição das espécies considerando-se o sistema BBLCrystal™ *Gram-Positive Identification Kit*.

## 5.2 Avaliações do perfil de susceptibilidade a drogas antimicrobianas

A análise inicial do perfil de susceptibilidade à oxacilina pelo método de disco-difusão das amostras de *Staphylococcus* spp. coagulase negativo isoladas de

amostras de chorume percolado da deposição e decomposição de resíduos do serviço de saúde, no aterro sanitário da cidade de Juiz de Fora, MG, mostrou que 64,2% (70/109) das linhagens são sensíveis à droga, enquanto que 35,8% (39/109) mostraram-se resistentes (Figura 3).

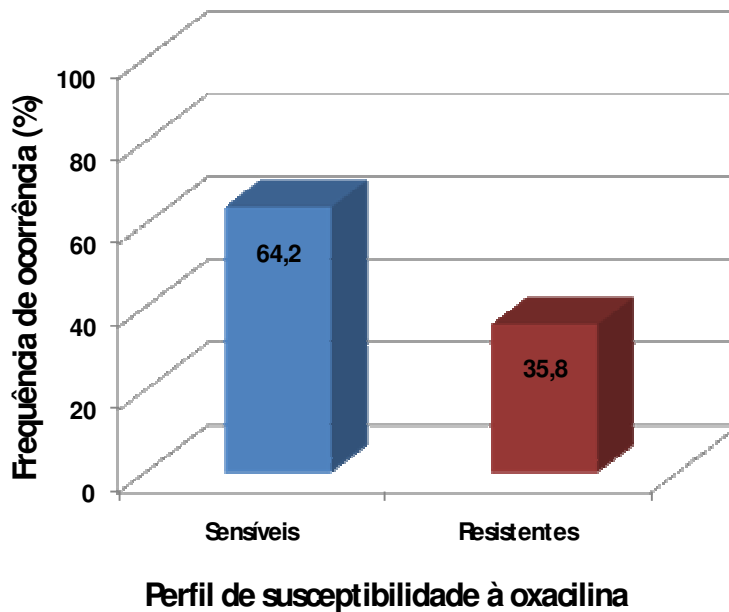


Gráfico 2. Perfil de susceptibilidade à oxacilina das amostras de *Staphylococcus coagulase* negativo, isoladas do chorume percolado da pilha de resíduos do serviço de saúde no aterro sanitário de Juiz de Fora, no período de maio de 2006 a abril de 2007, determinado pelo método de disco-difusão.

Os resultados dos testes de susceptibilidade aos antimicrobianos pela determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para as linhagens bacterianas isoladas estão apresentados em termos de CIM<sub>50</sub> (concentração inibitória mínima, na qual 50% dos isolados testados foram inibidos) e CIM<sub>90</sub> (concentração inibitória mínima, na qual 90% dos isolados testados foram inibidos), variação das CIMs e taxas de sensibilidade, resistência intermediária e resistência.

Foi observado que tanto a penicilina quanto oxacilina foram as drogas menos efetivas, ambas com taxa de resistência de 61,4%, seguidas pela eritromicina (27,3%), azitromicina (22,7%). Levofloxacina e gentamicina foram as drogas mais eficientes, embora resistência intermediária tenha sido observada a estes antimicrobianos por 1,1% e 21,6% das linhagens bacterianas respectivamente.

Todos os microrganismos avaliados foram susceptíveis à ação antimicrobiana da vancomicina (Tabela 1).

Das linhagens bacterianas avaliadas, 26,1% foram susceptíveis a todas as drogas testadas, enquanto que 11,4% foram resistentes a pelo menos um antimicrobiano. Resistência simultânea a dois antimicrobianos foi observada em 25% dos microrganismos, sendo também observado resistência a três (11,4%), quatro (15,8%), cinco drogas (9,2%) e seis drogas (1,1%) (Tabela 2).

Tabela 1. Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos das linhagens bacterianas representativas de *Staphylococcus* sp. coagulase negativo isolados de chorume produzido por resíduos de serviços de saúde do aterro sanitário da cidade de Juiz de Fora, MG.

Drogas testadas	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )			S (%)	RI (%)	R (%)
	50%	90%	Varição			
Penicilina	0,25	>1024	0,06 - >1024	38,6	-	61,4
Oxacilina	1	>1024	0,06 - >1024	38,6	-	61,4
Eritromicina	0,5	64	0,06 - >1024	60,2	12,5	27,3
Azitromicina	1	16	0,06 - 16	72,8	4,5	22,7
Levofloxacina	0,25	1	0,06 - 8	98,9	1,1	-
Gentamicina	0,25	8	0,06 - 8	78,4	21,6	-
Vancomicina	1	2	0,06 - 4	100	-	-

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

Tabela 2. Distribuição dos fenótipos de resistência a um ou mais de um antimicrobiano entre as amostras de *Staphylococcus* sp. coagulase negativo representativas isoladas de chorume produzido por resíduos de serviços de saúde do aterro sanitário da cidade de Juiz de Fora, MG.

Fenótipo de resistência	Sensibilidade a todas as drogas
ERY (n=5, 5.7%) GEN (n=4, 4.6%) AZI (n=1, 1.1%) ERY/GEN (n=1, 1.1 %) PEN/OXA (n=21, 23.9%) PEN/OXA/ERY (n=8, 9.2%) PEN/OXA/AZI (n=2, 2.2%) PEN/OXA/ERY/AZI (n=10, 11.4%) PEN/OXA/ERY/GEN (n=2, 2.2%) PEN/OXA/GEN/AZI (n=2, 2.2%) PEN/OXA/ERY/GEN/AZI (n=8, 9.2%) PEN/OXA/ERY/LEV/GEN/AZI (n=1, 1.1%)	n=23, 26.1%
ERY (eritromicina); GEN (gentamicina); AZI (azitromicina); PEN (penicilina); OXA (oxacilina); LEV (levofloxacina).	

### 5.3 Resistência à oxacilina e detecção do gene *mecA*

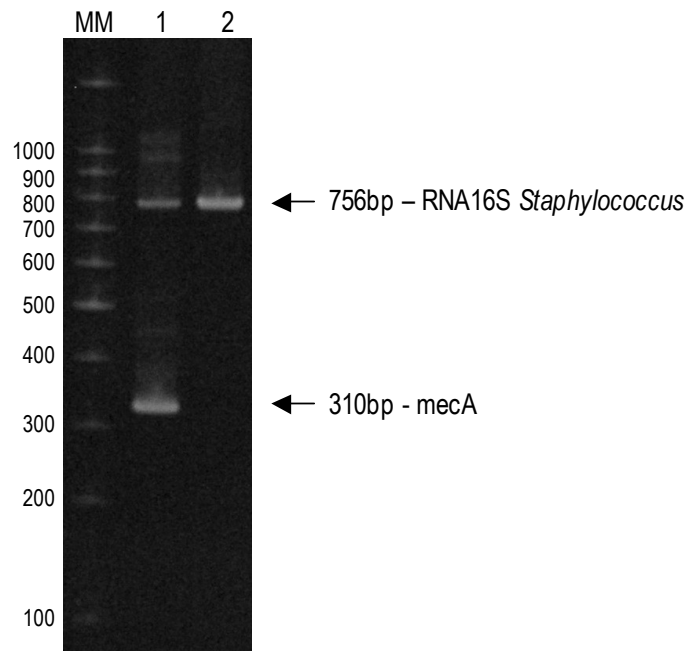
A correlação entre a susceptibilidade à oxacilina e a ocorrência do gene *mecA* foi analisada para as linhagens recuperadas, identificadas, confirmadas como pertencentes ao gênero *Staphylococcus* e submetidas à determinação da susceptibilidade às drogas antimicrobianas, pelo método de diluição em ágar (n=88) (Figura 4).

O gene *mecA* não foi detectado nas amostras bacterianas sensíveis à ação antimicrobiana da oxacilina, tampouco em todas os microrganismos isolados resistentes à sua ação antimicrobiana. Entre as linhagens resistentes à oxacilina, a ocorrência do gene *mecA* foi detectada em 25,9% das amostras, enquanto que, em 74,1%, este marcador não foi encontrado (Tabela 3).

Apesar de o gene *mecA* não ter sido detectado na maioria das amostras de *Staphylococcus* coagulase negativo resistentes à oxacilina neste estudo, comparando-se o perfil de susceptibilidade apenas das linhagens resistentes,



observou-se uma grande heterogeneidade nas concentrações inibitórias mínimas (CIM) da droga entre os microrganismos que possuem ou não o gene *mecA*.



Fotografia 2. Eletroforegrama representativo da confirmação da identidade genética de *Staphylococcus* sp. (gene 16S rRNA PCR) e detecção genética do gene *mecA* por PCR. MM – 100bp DNA ladder; Canaleta 1 – *Staphylococcus mecA* positivo; Canaleta 2 – *Staphylococcus mecA* negativo.

De maneira geral, os valores de CIM para as linhagens que não possuem o *mecA* foram significativamente menores do que os valores de CIM para as amostras que possuem o gene *mecA*, embora a variação de CIM tenha sido a mesma entre os dois grupos bacterianos (Tabela 4).

Tabela 3: Distribuição do gene *mecA* entre as linhagens de *Staphylococcus* coagulase negativo isoladas de chorume produzido por resíduos de serviços de saúde do aterro sanitário da cidade de Juiz de Fora, MG, sensíveis e resistentes à oxacilina, pelo método de diluição em ágar.

Genótipo	Fenótipo			
	OXA <sup>S</sup>		OXA <sup>R</sup>	
	n	%	n	%
<i>mecA</i> +	-	-	14	25,9
<i>mecA</i> -	34	100	40	74,1

*mecA*<sup>+</sup>: linhagens que amplificaram o gene *mecA*; *mecA*<sup>-</sup>: linhagens que não amplificaram o gene *mecA*; OXA<sup>S</sup>: linhagens sensíveis à oxacilina; OXA<sup>R</sup>: linhagens resistentes à oxacilina

Tabela 4. Perfil de susceptibilidade à oxacilina entre as linhagens de *Staphylococcus* sp. coagulase negativo isolados de chorume produzido por resíduos de serviços de saúde do aterro sanitário da cidade de Juiz de Fora, MG.

Genótipo	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )			Número de linhagens bacterianas OXA <sup>R</sup>
	50%	90%	Varição	
<i>mecA</i> +	1.024	> 1.024	0,5 - > 1.024	14
<i>mecA</i> -	2	64	0,5 - > 1.024	40

*mecA*+: linhagens que amplificaram o gene *mecA*; *mecA* - : linhagens que não amplificaram o gene *mecA*; CIM: concentração inibitória mínima; OXA<sup>R</sup>: linhagens resistentes à oxacilina

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 Identificação das linhagens bacterianas

De acordo com a literatura, dentre os danos que ocorrem em virtude do mau gerenciamento dos RSS, destacam-se a contaminação do meio ambiente; a ocorrência de acidentes de trabalho, envolvendo profissionais da saúde, da limpeza pública e catadores; e a propagação de doenças para a população em geral, por contato direto ou indireto através de vetores (BIDONE, 2001). Vários microrganismos patogênicos presentes nos RSS apresentam capacidade de persistência ambiental, entre eles *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, vírus da hepatite A e da hepatite B (SILVA et al., 2002). Além disso, estudos recentes do nosso grupo demonstraram a ocorrência de linhagens bacterianas de grande relevância clínica nos RSS, tais como *Staphylococcus* sp., bastonetes Gram-negativos (BGN) da família *Enterobacteriaceae* e BGN não fermentadores (MAURÍCIO, 2006; NASCIMENTO, 2007).

Todas as amostras de cocos Gram-positivo avaliadas neste estudo, presuntivamente identificadas como *Staphylococcus* sp. coagulase negativo, foram submetidas à identificação molecular em nível genérico pela reação em cadeia da polimerase (PCR). A técnica baseou-se na amplificação de região específica do DNA codificador para a região interna do RNA ribossomal 16S bacteriano e observaram-se 99,08% de correlação entre as duas metodologias para caracterização genérica de *Staphylococcus* spp.

Entre as linhagens de *Staphylococcus* coagulase negativo que o sistema miniaturizado BBLCrystal permitiu identificar, apesar das limitações técnicas, destacam-se as espécies *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus* e *Staphylococcus saprophyticus* que, de acordo com a literatura, estão frequentemente associadas a infecções e doenças humanas, como infecções de cateteres intravenosos, osteomielites, endocardites, infecções do trato urinário e infecções cutâneas (BANNERMAN, 2003; HIGASHIDE et al., 2008; KONEMAN, 2008; VON EIFF, PETERS e HEIFFMANN, 2002). Além destas, foram observados também representantes de outras espécies, como *Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus lentus* e *Staphylococcus vitulinus*, que estão amplamente

distribuídas na natureza, principalmente em alimentos, animais de fazendas, roedores, marsupiais e mamíferos marinhos, mas que, nos últimos anos, têm sido associadas a infecções graves, como endocardites, peritonites, choque séptico, infecção do trato urinário e infecções de ferida (KONEMAN, 2008, SHITTU et al., 2004; STEPANOVIC et al., 2002; STEPANOVIC et al., 2003).

Não se pode desprezar o potencial de contaminação ambiental que pode ser provocado pelos RSS, devido à precariedade de tratamento e disposição final que os mesmos recebem em nosso país, ainda que alguns autores considerem exagerada a preocupação com os RSS. Segundo Zanon (1990) e Rutala e Mayhall (1992), os RSS não constituem risco infeccioso para a comunidade e o meio ambiente, já que não há comprovações científicas em relação à existência denexo causal entre o contato com o resíduo e a aquisição de doenças, embora seja aceito que presença de patógenos e seus fatores de virulência associados, a dose de inoculação, a susceptibilidade do hospedeiro e as vias de entrada sejam fatores para a ocorrência de uma doença infecciosa.

Considerando todas as linhagens bacterianas isoladas, não foi possível identificar 72% no nível de espécie, pela metodologia utilizada. Atualmente, existem vários sistemas comerciais para a identificação de estafilococos coagulase negativos baseados em modificações dos testes de fermentação de carboidratos, adaptações de testes padrões de identificação bacteriológica e testes com substratos enzimáticos para identificação de microrganismos. Entre estes sistemas de identificação certificadamente eficazes para identificação de amostras de origem clínica, destaca-se o kit utilizado neste estudo, o sistema de identificação BBL CRYSTAL GRAM-POSITIVE™ (KONEMAN, 2008).

No entanto, existe uma série de restrições relatadas à sua utilização, como custo elevado, acurácia diminuída e, principalmente, banco de dados limitado a algumas espécies. Soma-se a isso o fato de que a grande maioria ainda é baseada em uma interpretação visual através de cores e fluorescências, o que a torna muito subjetiva (COUTO et al., 2001; DE PAULIS et al., 2003; RENNEBERG, RIENECK e GUTSCHIK, 1995). Desta forma, têm sido discutidos, avaliados e propostos nos últimos anos diversos métodos de identificação, fenotípicos e simplificados, baseados principalmente na acurácia dos mesmos (CUNHA, SINZATO e SILVEIRA,

2004; DE PAULIS et al., 2003; IORIO et al., 2007; MONSEN et al., 1998; MULDER, 1995).

Além disso, a baixa taxa de identificação microbiana observada neste estudo, utilizando o sistema miniaturizado semiautomatizado seria a variabilidade de expressão de características fenotípicas apresentadas pelos microrganismos em decorrência da forte pressão seletiva exercida pelo meio hostil em que essas bactérias se encontravam (aterro sanitário), como já observado por outros autores (COUTO et al., 2001). Este fenômeno, considerando-se a grande carga de xenobióticos e variação ambiental, pode estar associado a eventos de regulação da expressão gênica em decorrência da expressão de proteínas de resposta a estresse com conseqüente regulação pleiotrópica.

Ainda, há de se considerar a seleção de linhagens bacterianas com habilidades modificadas em decorrência à seleção e recombinação genética bacteriana sob forte pressão seletiva como a encontrada no aterro sanitário. Apesar de eventos associados à resposta adaptativa bacteriana sob pressão seletiva como aquela encontrada no chorume não terem sido investigados neste estudo, existem dados na literatura que comprovam tal resposta bacteriana frente às variações ambientais (DINIZ et al., 2004; dos SANTOS et al., 2007; LORIAN E GEMMELL, 1994; SANTOS et al., 2007; SILVA et al., 2007).

Por fim, sabe-se que o sistema miniaturizado comercial é desenhado para identificação de amostras clínicas, enquanto que as amostras utilizadas em nosso estudo são de origem ambiental, o que poderia explicar também a baixa frequência de identificação.

Os RSS podem apresentar grande quantidade de substâncias químicas (desinfetantes, antimicrobianos e outros medicamentos), o que acarreta também o risco químico, além do risco biológico (BIDONE, 2001). Além disso, a disposição conjunta destes resíduos contendo microrganismos e substâncias químicas podem provocar um aumento das populações bacterianas resistentes a certos antimicrobianos, que podem ser detectadas no esgoto de hospitais, segundo alguns estudos (DEPIZZOLL, 2006; KÜMMERER, 2003).

## 6.2 Avaliação do perfil de susceptibilidade a drogas antimicrobianas

Em relação ao perfil de susceptibilidade dos microrganismos isolados aos antimicrobianos testados, pelo método de diluição em ágar, observaram-se níveis de resistência significativos a drogas importantes contra *Staphylococcus* coagulase negativo, como a oxacilina, eritromicina e azitromicina, além de significativa taxa de resistência intermediária à gentamicina. Segundo o CLSI (2007), a ocorrência destas linhagens em nosso meio é importante, não apenas pelo indicativo de eventual circulação de microrganismos resistentes a antimicrobianos, como também pela possível disseminação de marcadores genéticos relacionados ao fenômeno da resistência. Estes dados representam um importante alerta em relação ao uso indiscriminado de antimicrobianos e o fenômeno da resistência bacteriana às drogas, cuja contenção é tida como um dos grandes desafios da ciência e da medicina no século XXI (LEVY, 1998; ASM 2000).

A resistência aos antimicrobianos é um fenômeno genético, relacionado à existência de genes contidos nos microrganismos, que codificam diferentes mecanismos bioquímicos e que impedem a ação das drogas. A resistência pode ser originada em mutações que ocorrem nos microrganismos durante seu processo reprodutivo e resultam de erros na cópia na sequência de bases que formam o DNA cromossômico, responsáveis pelo código genético. A outra origem da resistência é a importação dos genes causadores do fenômeno, consistindo na resistência transferível, que se faz através dos mecanismos de transdução, transformação e conjugação (TAVARES, 2000; ZAVADINACK et al., 2001).

Sabe-se que existe uma mobilidade substancial de genes de resistência aos antimicrobianos entre bactérias de mesma espécie, mas também entre bactérias filogeneticamente distintas (HEUER et al., 2002). Além disso, já foi demonstrada transferência genética entre bactérias no esgoto (MARCINEK et al., 1998).

Em nosso estudo, foram observados altos índices de resistência múltipla aos antimicrobianos nas linhagens de *Staphylococcus* sp. coagulase negativo representativas isoladas de chorume produzido por resíduos de serviços de saúde do aterro sanitário. Embora a multirresistência possa estar relacionada a drogas de mesmo grupo químico, com mecanismo de ação semelhante, nossos resultados mostram resistência múltipla a antimicrobianos de diferentes mecanismos de ação e

de resistência. Estes dados tornam-se relevantes à medida que se discutem os mecanismos transferíveis de resistência entre bactérias nos diferentes ambientes.

Assim, a detecção de multirresistência nestes microrganismos é preocupante, particularmente se a carga genética relacionada a estes fenótipos estiver disponível para transferência a outros microrganismos. Os fatores potenciais que provavelmente estão associados à pressão seletiva, envolvendo a resistência múltipla, não foram avaliados, mas um deles poderia ser o fenômeno de cosseleção, como sugerido por evidências fenotípicas encontradas por outros autores (AKWAR et al., 2008). Além disso, esta observação deve suscitar o uso racional de antimicrobianos, a fim de se evitar as pressões seletivas relacionadas ao uso abusivo e indiscriminado de antibióticos, como preconizado na literatura.

Depizzol (2006) afirma que umas das maiores preocupações com relação à resistência aos antimicrobianos é a disseminação de genes de resistência de uma espécie bacteriana para outra, especialmente nos casos de transferência de resistência entre bactérias patogênicas para as não patogênicas.

Alguns estudos têm demonstrado altas taxas de resistência à oxacilina em até 80% do isolados clínicos (MICHELIM, 2005). Além disso, a resistência à oxacilina indica resistência cruzada a todos os betalactâmicos, incluindo cefalosporinas, e está frequentemente associada com resistência a macrolídeos, aminoglicosídeos e carbapenêmicos (DE GIUSTI, 1999; KONEMAN, 2008; LYTIKÄINEN, 1996).

A resistência à eritromicina, encontrada em nosso estudo (27,3%), tem sido demonstrada em amostras de MRSA, carreando o SCCmec tipo IV, frequentemente associado à origem comunitária (BARTELS et al., 2007). Estudos recentes, analisando amostras ORSA, isoladas de bacteremias, demonstraram percentual elevado de resistência à eritromicina, clindamicina e ciprofloxacina (HOLMES E JORGENSEN, 2008). Além disso, é importante ressaltar que as significativas taxas de resistência à eritromicina, demonstradas atualmente, refletem a sua elevada utilização terapêutica, principalmente quando o uso da penicilina é contraindicado (EADY e COVE, 2003).

O uso da azitromicina em nosso estudo, embora pertencente à mesma classe da eritromicina, justifica-se pela sua ampla utilização clínica atualmente. Ambos antimicrobianos apresentaram taxas de resistência bem próximas, com 27,3% para eritromicina e 22,7% para azitromicina. Pereira e colaboradores (2009) observaram

expressivas taxas de resistência de espécies de *Staphylococcus* isolados de diferentes sítios infecciosos de animais domésticos frente a este antimicrobiano.

Em nosso estudo, levofloxacina e gentamicina foram as drogas mais eficientes, embora resistência intermediária tenha sido observada a estes antimicrobianos por 1,1% e 21,6% das linhagens bacterianas respectivamente.

De acordo com a literatura, a resistência à oxacilina está associada à resistência cruzada a aminoglicosídeos e quinolonas (FLUIT et al., 2000). Estudo analisando a resistência antimicrobiana em amostras de MRSA isoladas de diferentes infecções demonstrou resistência à levofloxacina com taxa de 16,8%. Com relação à gentamicina, o mesmo estudo apresentou efetividade dessa droga, principalmente em amostras MRSA de origem comunitária (KILIC et al., 2006).

A utilização de glicopeptídeos como a vancomicina na terapêutica de infecções por MRSA é bastante utilizada e constitui-se como uma das únicas opções de tratamento (HIRAMATSU et al., 2001; RIBAK, 2006). No entanto, a partir de sua instituição, não tardaram a aparecer as primeiras linhagens com resistência intermediária à vancomicina em diversos locais do mundo (CDC, 2002; HIRAMATSU et al., 1997, OLIVEIRA et al., 2001), e, posteriormente, as totalmente resistentes (CDC, 2002), deixando a comunidade científica em alerta quanto à possibilidade de emergência de linhagens do gênero *Staphylococcus* resistentes à vancomicina, principalmente no ambiente hospitalar. É importante observar que, em nosso estudo, todas as amostras foram sensíveis à vancomicina.

### **6.3 Resistência à oxacilina e a detecção do gene *mecA***

Entre as linhagens resistentes à oxacilina, pelo método de diluição em ágar, a ocorrência do gene *mecA* foi de 25,9% das amostras, enquanto que, em 74,1%, este marcador não foi detectado. Um dos mecanismos de resistência à oxacilina está associado à aquisição do gene *mecA*, que codifica a síntese de uma proteína PBP2a ou PBP2', que possui uma baixa afinidade não só para a oxacilina como também para os outros antimicrobianos betalactâmicos (CHAMBERS, 1993; ITO et al., 2003; SCHITO, 2006). Este gene encontra-se inserido em um elemento genético móvel, o SCC*mec* que tem importância fundamental na transmissão e na epidemiologia da resistência bacteriana (HIRAMATSU et al., 2004; ITO et al., 2001; KATAYAMA, ITO e HIRAMATSU, 2000; LOWY, 2003).



Linhagens de *Staphylococcus* coagulase negativo podem possuir plasmídeos, que podem ser transferidos entre suas espécies ou mesmo entre SCN e *S. aureus*, o que representa uma via de transmissão de determinantes de resistência antimicrobiana, principalmente aos betalactâmicos e aminoglicosídeos (HUEBNER, 1999). Além disso, estas linhagens podem tornar-se resistentes pela aquisição do SCC*mec*, cada vez mais determinantes de resistência a diversas classes de drogas devido à pressão seletiva ocasionada pelo uso contínuo e indiscriminado de diversos antimicrobianos, que podem ser encontrados no chorume produzido pela decomposição e degradação dos RSS.

A detecção do gene *mecA* por métodos moleculares é considerada o método padrão ouro para avaliação qualitativa da resistência à oxacilina (CHAMBERS, 1997). No entanto, é importante destacar que isolados *mecA*-positivos devem ser reportados como resistentes à oxacilina. Porém, isolados *mecA*-negativos devem ser reportados como sensíveis se a CIM para a oxacilina for  $\leq 2,0\mu\text{g/mL}$ , devido à ocorrência, ainda que rara, de outros mecanismos de resistência, como superprodução de betalactamases (conhecida como resistência *borderline*) e presença de PBPs modificadas. Desta forma, isolados *mecA*-negativos, mas com CIM  $\geq 4,0\mu\text{g/mL}$ , devem ser reportados como resistentes (CHAMBERS, 1997; CLSI, 2007). Estes outros mecanismos de resistência propostos podem explicar os altos níveis de resistência à oxacilina entre as amostras de *Staphylococcus* isoladas neste estudo, para as quais o marcador *mecA* não foi associado.

De acordo com a literatura, a resistência fenotípica à oxacilina é extremamente variável e, na maioria das vezes, depende da expressão do gene *mecA*. Essa variabilidade é conhecida como heterorresistência fenotípica e caracteriza-se pelo fato de que toda a população bacteriana pode carregar o gene *mecA*, porém nem todas células expressam fenotipicamente sua resistência da mesma maneira ao mesmo tempo (MARANAN et al., 1997). A observação parece não estar de acordo com nossos dados, considerando-se que a variação da CIM para oxacilina foi pequena e a maioria das linhagens foi resistente a altos níveis da droga ( $1.024\mu\text{g/mL}$  ou mais), além da origem destes microrganismos e à pressão seletiva a que eles estão expostos neste ambiente.

Entretanto, a CIM de oxacilina para as linhagens nas quais o gene *mecA* foi detectado foi maior (MIC<sub>90</sub>  $>1.024\mu\text{g/mL}$ ) do que a concentração inibitória mínima para as linhagens que não possuem o gene *mecA*. Entre essas amostras, os níveis

de resistência foram mais baixos (MIC90 = 64µg/mL), apesar da grande variação nos valores de CIM. Estes dados permitem sugerir que a expressão de PBP2a ou PBP2' pode ser um mecanismo de resistência complementar, resultando em uma estratégia adaptativa à pressão seletiva da droga mais eficiente nestes microrganismos.

A heterorresistência pode explicar também, a discrepância observada em nosso estudo em relação ao perfil de susceptibilidade à oxacilina entre os métodos de disco-difusão (qualitativo) e diluição em ágar (quantitativo). Enquanto no primeiro a taxa de resistência à oxacilina foi de 35,8%, pelo segundo método essa taxa foi de 61,4%. Possivelmente, devido a este fenômeno, testes qualitativos para determinação da susceptibilidade a oxacilina em estafilococos demonstram pouca eficácia, considerando principalmente isolados *mecA*-negativos.

Assim, segundo o CLSI (2007), quando há discordância entre os métodos de disco-difusão e diluição em ágar, é necessário realizar, previamente, o teste de triagem em ágar contendo 6µg/mL de oxacilina.

Rotineiramente, os testes de disco-difusão são os mais utilizados para detecção da resistência à oxacilina, mas vários estudos demonstraram confiabilidades variadas, provavelmente devido ao fenômeno da heterorresistência (FELTEN, et al., 2002; KOHNER et al., 1999; MÍMICA e MENDES, 2007; POTTUMARTHY, FRITSCHKE, JONES, 2005). Embora a determinação da CIM pelo método de diluição em ágar possibilite uma avaliação quantitativa da resistência, e por constituir o método considerado padrão, alguns estudos demonstram que a acurácia não é tão significativa em relação aos métodos fenotípicos qualitativos, principalmente em isolados com a presença do gene *mecA* (GRADELSKI et al., 2001; MÍMICA, 2007; SWENSON et al., 2001; VELASCO et al., 2005). Entretanto, devido à existência de outros mecanismos de resistência, esse método deve ser utilizado como confirmatório, principalmente quando o perfil de susceptibilidade é duvidoso (MÍMICA e MENDES, 2007).

#### **6.4 Considerações finais**

Segundo alguns autores, no Brasil, a subnotificação dos acidentes de trabalho é uma realidade que, infelizmente, impossibilita a detecção dos riscos potenciais a que os trabalhadores dos serviços de saúde estão expostos. O gerenciamento

adequado dos resíduos poderia contribuir significativamente para a redução da ocorrência de acidentes de trabalho, especialmente aqueles provocados por perfurocortantes e/ou exposição a agentes microbianos viáveis nos resíduos (GARCIA e ZANETTI-RAMOS, 2004).

Nossos resultados suscitam reflexões relacionadas à sobrevivência de microrganismos potencialmente patogênicos e linhagens resistentes aos antimicrobianos, carreando importantes marcadores de resistência e sua possível disseminação via RSS, contribuindo para seu trânsito intra-hospitalar.

Além disso, pelo risco de disseminação destes microrganismos para fora das barreiras de contenção do chorume percolado das pilhas de resíduos nos aterros sanitários, seja por atividade humana, animal ou mesmo relacionado a fenômenos climáticos como chuvas e enchentes, há de se considerar a potencialidade de exposição das comunidades de áreas de aterros e do meio ambiente a estes microrganismos.

Dessa forma, os profissionais de saúde necessitam rever seus conhecimentos em relação à caracterização microbiológica dos resíduos de serviços de saúde produzidos em suas atividades assistenciais, procurando identificar e se prevenir dos possíveis riscos em todas as etapas do manejo.

Assim, é necessária a elaboração de políticas não apenas de segregação, mas principalmente de destinação final dos resíduos de serviços de saúde, abrindo novas trilhas no caminho da promoção da saúde humana e ambiental.

## 7 CONCLUSÕES

- Espécies de *Staphylococcus* coagulase negativo apresentam-se como representativas da microbiota do chorume derivado da pilha de resíduos do serviço de saúde no Aterro Sanitário de Juiz de Fora, MG, e podem ser representativas das linhagens que circulam nos estabelecimentos de saúde.
- O sistema miniaturizado semiautomatizado *BBL Crystal*® não foi eficaz para a identificação de linhagens de *Staphylococcus* coagulase negativo isoladas do chorume derivado da pilha de resíduos do serviço de saúde.
- As linhagens de *Staphylococcus* coagulase negativo recuperadas de resíduos de serviços de saúde apresentam altos níveis de resistência à penicilina, oxacilina, eritromicina, azitromicina e gentamicina.
- Os resíduos de serviços de saúde apresentam linhagens de *Staphylococcus* coagulase negativo, carreando o gene *mecA*, marcador molecular que codifica a resistência à oxacilina e que pode ser disseminado pelo ambiente e transferido para outras linhagens bacterianas.
- Linhagens de *Staphylococcus* coagulase negativo, carreando o gene *mecA*, mostraram-se resistentes a níveis mais altos de oxacilina, em relação às linhagens não portadoras deste marcador genético de resistência.

## REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC 306, de 07 de dezembro de 2004. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde. **Diário Oficial da União** 2004; 10 dez.

AKIYAMA, H.; KANZAKI, H.; TADA, J. ARATA J. Coagulase-negative staphylococci isolated from various skin lesions. **J. Dermatol.**, v.25, p.563-568, 1998.

AKWAR, H.T.; POPPE, C.; WILSON, J.; REID-SMITH, R.J. DYCK, M.; WADDINGTON, J.; SHANG, D.; McEWEN, S.A. Prevalence and patterns of antimicrobial resistance of fecal *Escherichia coli* among pigs on 47 farrow-to-finish farms with different in-feed medication policies in Ontario and British Columbia. **Can. J. Vet. Res.**, v.72, n.2, p.195-201, 2008.

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.

AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY - Antimicrobial Resistance an Ecological Perspective. **Report From the American Academy of Microbiology**. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 2000.

ANGUERA, I.; DEL RIO, A.; MIRÓ, J.M.; MATÍNEZ-LACASA, X.; MARCO, F.; GUMÁ, J.R.; QUAGLIO, G.; CLARAMONTE, X.; MORENO, A.; MESTRES, C.A.; MAURI, E.; AZQUETA, M.; BENITO, N.; GARCÍA-de la MARÍA, C.; ALMELA, M.; JIMÉNEZ-EXPÓSITO, M.J.; SUED, O.; DE LAZZARI, E.; GATELL, J.M.; Hospital Clinic Endocarditis Study Group. *Staphylococcus lugdunensis* infective endocarditis: description of 10 cases and analysis of native valve, prosthetic valve, and pacemaker lead endocarditis clinical profiles. **Heart**, v.91, n.2, p.1-7, 2005.

BANNERMAN, T. L. *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and other catalase-positive cocci that grown aerobically. In: **Manual of Clinical Microbiology**, Murray, P. R.; Barron, E. J.; Tenover, F. C.; Tenover, F. C.; Tenover, F. C.; Tenover, F. C.; Tenover, F. C.; Tenover, F. C.; Tenover, F. C.; Tenover, F. C.; Tenover, F. C. (eds), 8<sup>th</sup> ed, ASM Press. Washington, DC. p.384-404, 2003.

BARG, N.L.; HARRIS, T. Toxin-mediated syndromes. In: **The Staphylococci in Human Disease**, Crossley, K.B. & Archer, G.L. (eds), Churchill Livingstone, New York, USA. p. 527-543, 1997.

BARTELS, M. D., BOYE, K., LARSEN, A. R., SKOV, R.; WESTH, H. Rapid increase of genetically diverse methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Copenhagen, Denmark. **Emerg. Infect. Dis.** 13, 1533-1540, 2007.

BIDONE, F.R.A. **Resíduos sólidos provenientes de coletas especiais: eliminação e valorização**. Porto Alegre: Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental, 2001. 218p.

BLOT, S.I., VANDEWOUDE, K.H., HOSTE, E.A., COLARDYN, F.A. Outcome and attributable mortality in critically ill patients with bacteremia involving methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Arch. Intern. Med.**, v.162, n.19, p.2229-2235, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Manual de gerenciamento de resíduos de serviços de saúde**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 182p.

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.

CALVO, J., HERNÁNDEZ, J. L., FARIÑAS, M. C., GARCÍA-PALOMO, D., AGÜERO, J. Osteomyelitis caused by *Staphylococcus schleiferi* and evidence of misidentification of this *Staphylococcus* species by an automated bacterial identification system. **J. Clin. Microbiol.**, v.38, n.10, p.3887-3889, 2000.

CARDOSO, D.D.P. *Staphylococcus aureus*. Incidência em pacientes hospitalizados e profissionais de saúde vinculados ao hospital das clínicas de Goiânia/GO. Caracterização das amostras isoladas pela fenotipagem e antibiograma. **Rev. Pat. Trop.**, v.18, n.1, p.99-158, 1998.

CASANOVA-ROMAN, M.; SANCHEZ-PORTO, A.; CASANOVA-BELLIDO, M. Urinary tract infection due to *Staphylococcus lugdunensis* in a healthy child. **Scand. J. Infect. Dis.**, v.36, n.2, p.149-150, 2004.

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

CASTRO, J.G.; DOWDY, L. Septic shock caused by *Staphylococcus lugdunensis*. **Clin. Infect. Dis.**, v.28, n.3, p.681-682, 1999.

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.

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

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

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

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.

COLLINS, C.H. Treatment and disposal of clinical and laboratory waste. **Med. Lab. Sci.**, v.48, n.4, p.324-331, 1991.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução 358, de 29 de abril de 2005. Dispõe sobre o tratamento e a destinação final dos resíduos dos serviços de saúde e dá outras providências. **Diário Oficial da União** 2005; 05 mai.

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.

COUTO, I.; PEREIRA, S.; MIRAGAIA, M.; SANCHES, I.S.; LENCASTRE, H. Identification of clinical staphylococcal isolates from humans by internal transcribed spacer PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v.39, n.9, p.3099-3103, 2001.

CUNHA, M.L.R.S.; LOPES, C.A.M.; RUGOLO, L.M.S.S.; CHALITA, V.A.S. Clinical significance of coagulase-negative staphylococci isolated from neonates. **J. Pediatr. (Rio J.)**, v.78, n.4, p.279-278, 2002.

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

DA SILVA, C.E.; HOPPE, A.E.; RAVANELLO, M.M.; MELLO, N. Medical wastes management in the south Brazil. **Waste manag.**, v.25, n.6, p.600-605, 2005.

DE GIUSTI, M.; PACIFICO, L.; TUFI, D.; PANERO, A.; BOCCIA, A.; CHIESA, C. Phenotypic detection of nosocomial *mecA*-positive coagulase-negative staphylococci from neonates. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.44, n.3, p.351-358, 1999.

DEPARTAMENTO MUNICIPAL DE LIMPEZA URBANA. Aterro Sanitário. Disponível em: <http://www.demlurb.pjf.mg.gov.br/>. Acesso em : 20/09/2008.

DE PAULIS, A.N.; PREDARI, S.C.; CHAZARRETA, C.D.; SANTOIANNI, J.E. Five-test simple scheme for species-level identification of clinically significant coagulase-negative staphylococci. **J. Clin. Microbiol.**, v.41, n.3, p.1219-1224, 2003.

DEPIZZOL, F. **Avaliação da resistência a antibióticos em isolados de *Escherichia coli* provenientes de esgoto hospitalar e sanitário**. 2006. 145f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal do Espírito Santo, 2006.

DEUS, A.B.S.; DE LUCA, S.J.; CLARKE, R.T. Índice de impacto dos resíduos sólidos urbanos na saúde pública (IIRSP): metodologia e aplicação. **Eng. Sanit. Ambient.**, v.9, n.4, p.329-334, 2004.

DIAZ, L.F.; SAVAGE, G.M.; EGGERTH, L.L. Alternatives for the treatment and disposal of healthcare wastes in developing countries. **Waste manag.**, v.25, n.6, p.626-637, 2005.

DIAZ, L.F.; EGGERTH, L.L.; ENKHTSETSEG, Sh.; SAVAGE, G.M. Characteristics of healthcare wastes. **Waste manag.**, v.28, n.7, p.1219-1226, 2008.

DIEKEMA, D.J., PFALLER, M.A., SCMITZ, F.J., SMAYEVSKY, J., BELL, J., JONES, R.N., BEACH, M., SENTRY GROUP. Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific Region for the SENTRY antimicrobial surveillance program, 1997-1999. **Clin. Infect. Dis.**, v.32 (suppl.2), p.114-132, 2001.

DINIZ, C.G.; FARIAS, L.M.; CARVALHO, M.A.R.; ROCHA, E.R.; SMITH, C.J. Differential gene expression in a *Bacteroides fragilis* metronidazole-resistant mutant. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.54, n.1, p.100-108, 2004.

dos SANTOS, K.V.; DINIZ, C.G.; COUTINHO, S.C.; APOLÔNIO, A.C.; de SOUZA-GAIA, L.G.; NICOLI, J.R.; de MACÊDO FARIAS, L.; de CARVALHO, M.A. In vitro activity of piperacillin/tazobactam and ertapenem against *Bacteroides fragilis* and *Escherichia coli* in pure and mixed cultures. **J. Med. Microbiol.**, v.56, p.798-802, 2007.

EADY, E.A.; COVE, J.H. Staphylococcal resistance revisited: community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus*-an emerging problem for the management of skin and soft tissue infections. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v.16, n.2, p.103-124, 2003.

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: 20/04/2009.

FALCONE, M., GIANNELLA, M., RAPONI, G., MANCINI, C., VENDITTI, M. Teicoplanin use and emergence of *Staphylococcus haemolyticus*: is there a link? **Clin. Microbiol. Infect.**, v.12, n.1, p.96–97, 2006.

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 ceftiofur and moxalactam, the Vitek 2 system and the MRSA-screen latex agglutination test. **J. Clin. Microbiol.**, v.40, n.8, p.2766-2771, 2002.



FERREIRA, J.A. Resíduos sólidos e lixo hospitalar: uma discussão ética. **Cad. Saúde Pública**, v.11, n.2, p.314-320, 1995.

FERREIRA, R.B.R.; NUNES, A.P.F.; KOKIS, V.M.; KREPSKY, N.; FONSECA, L. S.; BASTOS, M.C.F.; GIAMBIAGI-de MARVAL, M.; SANTOS, K.R.N. Simultaneous detection of the *mecA* and *ileS-2* genes in coagulase-negative staphylococci isolated from Brazilian Hospitals by multiplex PCR. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v.42, n.3, p.205-212, 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.

FLAHAUT, S.; VINOGRADOV, E.; KELLEY, K. A.; BRENNAN, S.; HIRAMATSU, K.; LEE, J. C. Structural and biological characterization of a capsular polysaccharide produced by *Staphylococcus haemolyticus*. **J. Bacteriol.**, v.190, n.5, p.1649-1657, 2008.

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.**, v.30, n.3, p.454-460, 2000.

FORMAGGIA, D.M.E. Resíduos de Serviços da Saúde. In: **Gerenciamento de Resíduos Sólidos de Serviços de Saúde**. CETSB, São Paulo, p. 3-13, 1995.

GARCIA, L.P.; ZANETTI-RAMOS, B.G. Gerenciamento dos resíduos de serviços de saúde: uma questão de biossegurança. **Cad. Saúde Pública**, v.20, n.3, p.744-752, 2004

GARCIA, M.C., RODRIGUEZ, M.J., BERNARDO, A., TORNADIJO, M.E., CARBALLO, J. Study of enterococci and micrococci isolated throughout manufacture and ripening of San Simon cheese. **Food Microbiol.** v.19, n.1, p.23–33, 2002.

GIANELLA, S.; ULRICH, S.; HUTTNER, B.; SPEICH, R. Conservative management of a brain abscess in a patient with *Staphylococcus lugdunensis* endocarditis. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v.25, n.7, p.476-478, 2006.

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.

GRADELSKI, E.; VALERA, L.; ALEKSUNES, L.; BONNER, D.; FUNG-TOMC, J. Correlation between genotype and phenotypic categorization of staphylococci based on methicillin susceptibility and resistance. **J. Clin. Microbiol.**, v.39, n.8, p. 2961-2963, 2001.

GRUNDMANN, H., AIRES-DE-SOUZA, M., BOYCE, J., TIEMERSMA, E. Emergence and resurgence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat. **Lancet**. 368, 874-885, 2006.

GUIRGUITZOVA, B., CHANKOVA, D., ZOZIKOV, B. Staphylococci as uropathogens—frequency of isolation in hospitalized patients and sensitivity to antimicrobial agents. **Ann. Urol. (Paris)**, v.36, n.5, p.341–347, 2002.

HADDAD, C.M.C. **Resíduos de serviços de saúde de um hospital de médio porte do município de Araraquara: subsídios para elaboração de um plano de gerenciamento**. 2006. 138f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Ambiental e Meio Ambiente). Centro Universitário de Araraquara – UNIARA, 2006.

HAUSCHILD, T., SCHWARZ, S. Differentiation of *Staphylococcus sciuri* strains isolated from free-living rodents and insectivores. **J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health**, v.50, n.5, p.241–246, 2003.

HEDIN, G., WIDERSTROM, M. Endocarditis due to *Staphylococcus sciuri*. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v.17, n.9, p.673–675, 1998.

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.

HEUER, H.; KROGERRECKLENFORT, E.; WELLINGTON, E.M.H.; EGAN, J.D.; VAN ELSAS, J.D.; VAN OVERBEEK, L.; COLLARD, J.M.; GUILLAUME, G.; KARAGOUNI, A.D.; NIKOLAKOPOULOU, T.L.; SMALLA, K. Gentamicin resistance genes in environmental bacteria: prevalence and transfer. **FEMS Microbiology Ecology**, v.42, n.2, p.289-302, 2002.

HIGASHIDE, M.; KURODA, M.; OMURA, C. T. N.; KUMANO, M.; OHKAWA, S.; ICHIMURA, S.; OHTA, T. Methicillin-resistant *Staphylococcus saprophyticus* isolates carrying staphylococcal cassette chromosome *mec* have emerged in urogenital tract infections. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.56, n.6, p.2061-2068, 2008.

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.; HANAKI, H.; INO, T.; YABUTA, K.; OGURI, T.; TENOVER, F.C. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.40, n.1, p.135-136, 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.**, v.52, n.2, p.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**, 9<sup>th</sup> ed. Willians & Wilkins, Baltimore, USA, p.532-558, 1994.

HORII, T., SUZUKI, Y., KIMURA, T., KANNO, T., MAEKAWA, M. Intravenous catheter-related septic shock caused by *Staphylococcus sciuri* and *Escherichia vulneris*. **Scand. J. Infect. Dis.**, v.33, n.12, p.930-932, 2001.

HUEBNER, J.; GOLDMANN, D. A. Coagulase negative staphylococci: role as pathogens. **Annu. Rev. Med.**, v.50, p.223-236, 1999.

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.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Pesquisa Nacional de Saneamento Básico de 2000. São Paulo. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em: 15/03/2009.

ING, H. B.; BADDOUR, L. M.; BAYER, A. S. Bacteremia and infective endocarditis pathogenesis, diagnosis and complications. In: **The Staphylococci in Human Disease**, Crossley, K.B. & Archer, G.L. (eds), Churchill Livingstone, New York, USA. p.331-355, 1997.

IORIO, N.L.P.; FERREIRA, R.B.R.; SCHUENCK, R.P.; MALVAR, K.L.; BRILHANTE, A.P.; NUNES, A.P.F.; BASTOS, C.C.R.B.; SANTOS, K.R.N. Simplified and reliable scheme for species-level identification of *Staphylococcus* clinical isolates. **J. Clin. Microbiol.**, v.45, n.8, p.2564-2569, 2007.

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.; YUZAMA, 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.

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.

JOHNSON, K.R.; BRADEN, C.R.; CAIRNS, K.L.; FIELD, K.W.; COLOMBEL, A.C.; YANG, Z.; WOODLEY, C.L.; MORLOCK, G.P.; WEBER, A.M.; BOUDREAU, A.Y.; BELL, T.A.; ONORATO I.M.; VALWAY, S.E.; STEHR-GREEN, P.A. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from medical waste. **JAMA**, v.284, n.13, p.1683-1688, 2000.

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.; STRATTON, C.W.; TANG, Y.W. Antimicrobial susceptibility patterns and staphylococcal cassette chromosome *mec* types of, as well as panton-valentine leukocidin occurrence among, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from children and adults in middle Tennessee. **J. Clin. Microbiol.**, v.44, n.12, p.4436-4440, 2006.

KLOOS, W.E., BALLARD, D.N.; WEBSTER, J.A.; HUBNER, R.J.; TOMASZ, A.; COUTO, I.; SLOAN, G.L.; DEHART, H.P.; FIEDLER, F.; SCHUBERT, K.; DE LENCASTRE, H.; SANCHES, I.S.; HEATH, H.E.; LEBLANC, P.A.; LJUNGH, A. Ribotype delineation and description of *Staphylococcus sciuri* subspecies and their potential as reservoirs of methicillin resistance and staphylolytic enzyme genes. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v.47, n.2, p.313-323, 1997.

KOHNER, P.; UHL, J.; KOLBERT, C.; PERSING, D.; COCKERILL III, F. Comparison of susceptibility testing methods with *mecA* gene analysis for determining oxacillin (methicillin) resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* spp. **J. Clin. Microbiol.**, v.37, n.2, p. 2952-2961, 1999.

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

KÜMMERER, K. Significance of antibiotics in the environment. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.52, n.1, p.5-7, 2003.

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

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

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

LORIAN, V.; GEMMELL, C.G. Effect of low antibiotic concentrations on bacteria: effects on ultrastructure, virulence, and susceptibility to immune defences. In **Antibiotics in Laboratory Medicine** (Lorian, V., Ed.), p.493–549. Williams & Wilkins, Baltimore, MD, USA, 1994.

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.

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

LYYTIKÄINEN, O.; VAARA, M.; JÄRVILUOMA, E.; ROSENQVIST, K.; TIITTANEN, L.; VALTONEN, V. Increased resistance among *Staphylococcus epidermidis* isolates in a large teaching hospital over a 12-year period. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v.15, n.2, p.133-138, 1996.

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**. 10<sup>a</sup> ed. Prentice Hall, São Paulo. 608p, 2004.

MAIDEN, M. C. Horizontal genetic exchange, evolution, and spread of antibiotic resistance in bacteria. **Clin. Infect. Dis.**, v.27 (suppl. 20), 1998.

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.

MARCINEK, H.; WIRTH, R.; MUSCHOLL-SILBERHORN, A.; GAUER, M. *Enterococcus faecalis* gene transfer under natural conditions in municipal sewage water treatment plants. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.64, n.2, p.626-632, 1998.

MARINO, C.G.G.; EL-FAR, F.; BARSANTI-WEY, S., MEDEIROS, E.A.S. Cut and puncture accidents involving health care workers exposed to biological materials. **Braz. J. Infect. Dis.**, v.5, n.5, p.235-242, 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.

MAURÍCIO, K.F.A. **Ocorrência e susceptibilidade a drogas antimicrobianas de bactérias clinicamente relevantes em resíduos do serviço de saúde no município de Juiz de Fora, MG**. 2006. 46f. Monografia (Especialização em Parasitologia, Microbiologia e Imunologia). Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, Universidade Federal de Juiz de Fora, 2006.

MICHELIM, L.; LAHUDE, M.; ARAÚJO, P.R.; GIOVANAZ, D.S.H.; MÜLLER, G.; DELAMARE, A.P.L.; COSTA, S.O.P.; ECHEVERRIGARAY, S. Pathogenicity factors and antimicrobial resistance of *Staphylococcus epidermidis* associated with nosocomial infections occurring in intensive care units. **Braz. J. Microbiol.**, v.36, p. 17-23, 2005.

MIMICA, M.J.; BEREZIN, E.N.; CARVALHO, R.L.; MIMICA, I.M.; MIMICA, L.M.; SÁFADI, M.A.; SCHNEIDER, E.; CAIAFFA-FILHO, H.H. Detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from pediatric patients: is the cefoxitin disk diffusion test accurate enough? **Braz. J. Infect. Dis.**, v.11, n.4, p.415-417, 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.

MONSEN, T.; RÖNNMARK, M.; OLOFSSON, J.; WISTRÖM, J. An inexpensive and reliable method for routine identification of staphylococcal species. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v.17, n.5., p.327-335, 1998.

MOREL, M.M.O.; BERTUSSI FILHO, L.A. Resíduos de serviços de saúde. In: Rodrigues EAC, Mendonça JS, Amarante JMB, Grinbaum RS, Richtmann R. **Infecções hospitalares: prevenção e controle**. São Paulo: Sarvier, p. 519–34, 1997.

MULDER, J.G. A simple and inexpensive method for the identification of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus hominis*. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v.14, n.12, p.1052-1056, 1995.

NASCIMENTO, T.C. **Ocorrência de bactérias clinicamente relevantes nos resíduos do serviço de saúde e urbano e seu perfil de susceptibilidade a drogas antimicrobianas, na cidade de Juiz de Fora, MG**. 2007. 57f. Monografia (Graduação em Enfermagem). Faculdade de Enfermagem, Universidade Federal de Juiz de Fora, 2007

NAZAR, M.W.; PORDEUS, I.A.; WERNECK, M.A.F. Dental waste management in municipal health clinics in Belo Horizonte, Brazil. **Rev. Panam. Salud Publica**, v.17, n.4, p.237-242, 2005.

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.; CU, L.; HIRAMATSU, K.; MAMIZUKA, E.M. Isolation in Brazil of nosocomial *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin. **Infect. Control. Hosp. Epidemiol.**, v.22, n.7, p.443-448, 2001.

OTTO, M. Virulence factors of coagulase-negative staphylococci. **Front. Biosci.**, v.1, n.9, p.841-863, 2004.

PATEL, R., PIPER, K. E., ROUSE, M. S., UHL, J. R., COCKERILL III, F. R., STECKELBERG, J. M. Frequency of Isolation of *Staphylococcus lugdunensis* among Staphylococcal Isolates Causing Endocarditis: a 20-Year Experience. **J. Clin. Microbiol.**, v.38, n.11, p.4262-4263, 2000.

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

PERDEAU-REMYNGTON, F.; STEFANIK, D.; PETERS, G.; RUCKDESCHEL, G.; HAAS, F.; WENZEL, R.; PULVERER, G. Methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus* on the hands of health care workers: a route of transmission or a source? **J. Hosp. Infect.**, v.31, p.195-203, 1995.

PEREIRA, I.A.; SOARES, L.C.; COELHO, S.M.O.; PRIBUL, B.R.; SOUZA, M.M.S. Suscetibilidade à azitromicina de isolados bacterianos de processos infecciosos em cães e gatos. **Pesq. Vet. Bras.**, v.29, n.2, p.153-156, 2009.

POTTUMARTHY, S.; FRITSCH, T.R.; JONES, R.N. Evaluation of alternative disk diffusion methods for detecting mecA-mediated oxacillin resistance in an international collection of staphylococci: validation report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v.51, n.1, p.57-62, 2005.

POURNARAS, S.; TSAKRIS, A.; MANDRAVELI, K.; FAITATZIDOU, A.; DOUBOYAS, J.; TOURKANTONIS, A. Reported needlestick injuries among health care workers in a Greek general hospital. **Occup. Med.**, v.49, n.7, p.423-426, 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.

RENNEBERG, J.; RIENECK, K.; GUTSCHIK, E. Evaluation of Staph ID 32 system and Staph-Zym system of coagulase negative staphylococci. **J. Clin. Microbiol.**, v.33, n.5, p.1150-1153, 1995.

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 FILHO, V.O. Gerenciamento de resíduos de serviços de saúde. In: FERNANDES, A.T. et al. **Infecção hospitalar e suas interfaces na área de saúde**. Ed. Atheneu, v.2, p.1156-1200, São Paulo, 2000.

RUHE, J.; MENON, D.; MUSHATT, D.; DEJACE, P.; HASBUN, R. Non-epidermidis coagulase-negative staphylococcal bacteremia: clinical predictors of true bacteremia. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v.23, n.6, p.495-498, 2004.

RUTALA, W.A.; SARUBBI JÚNIOR, F.A. Management of waste from hospitals. **Infect. Control**, v.4, n.4, p.198-204, 1983.

RUTALA, W.A.; ODETTE, R.L.; SAMSA, G.P. Management of infectious waste by US hospitals. **JAMA**, v.262, n.12, p.1635-1640, 1989.

RUTALA, W.A.; MAYHALL, C.G. Medical waste: SHEA position paper. **Infect. Control. Hosp. Epidemiol.**, v.13, n.1, p.38-48, 1992.

RUTALA, W.A. Disinfection, sterilization, and waste disposal. In: WENZEL, R.P. **Prevention and control of nosocomial infections**. 3 ed. Baltimore, Williams & Wilkins, p.539-593, 1997.

RYBAK, M.J. The pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of vancomycin. **Clin. Infect. Dis.** 42: 35-39, 2006.

SADER, H.S. Polimixinas: Menos tóxicas e mais necessárias que imaginávamos. **Prática Hospitalar**. n.46, p.216-220, 2006.

SALOMÃO, I.S.; TREVIZAN, S.D.P.; GÜNTHER, W.M.R. Segregação de resíduos de serviços de saúde em centro cirúrgico. **Eng. Sanit. Ambient.**, v.9, n.2, p.108-111, 2004.

SANCHEZ, P.S. Caracterização dos Riscos nos Resíduos de Serviços de Saúde e na Comunidade. In: **Gerenciamento de Resíduos Sólidos de Serviços de Saúde**. CETESB, São Paulo, 1995.

SANTOS, S.G.; DINIZ, C.G.; SILVA, V.L.; MARTINS, W.A.; CARA, D.C.; SOUZA, N.C.; SERUFO, J.C.; NICOLI, J.R.; CARVALHO, M.A.; FARIAS, L.M. Effects of oxidative stress on the virulence profile of *Prevotella intermedia* during experimental infection gnotobiotic mice. **J. Med. Microbiol.**, v.56, p.289-297. 2007.

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.

SCHITO, G.C. The importance of the development of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. **Clin. Microbiol. Infect.**, v.12 (suppl.1), p.3-8, 2006.

SCHNEIDER, V.E.; REGO, R.C.E.; CALDART, V.; ORLANDIN, S.M. **Manual de gerenciamento de resíduos sólidos de serviços de saúde**. 2ª ed. São Paulo: CLR Balieiro, 2001. 173p.

SCOTT, J.R. Sex and the single circle: conjugative transposition. **J. Bacteriol.**, v.174, n.19, p.6005-6010, 1992.

SEGURA-MUNOZ, S.I.S. **Impacto ambiental na área do aterro sanitário e incinerador de resíduos sólidos de Ribeirão Preto, SP: Avaliação dos níveis de metais pesado**. 2002. 131f. Tese (Doutorado em Saúde Pública). Programa de Pós-



Graduação em Enfermagem e Saúde Pública. Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto-Universidade de São Paulo, 2002.

SHAPIRO, C.N. Occupational risk of infection with hepatitis B and hepatitis C virus. **Surgical Clin. North Am.**, v.75, n.6, p.1047-1056, 1995.

SHIAO, J.S.; McLAWS, M.L.; HUANG, K.Y.; GUO, Y.L. Sharps injuries among hospital support personnel. **J. Hosp. Infect.**, v.49, n.4, p.262-267, 2001.

SHITTU, A., LIN, J., MORRISON, D., KOLAWOLE, D. Isolation and molecular characterization of multiresistant *Staphylococcus sciuri* and *Staphylococcus haemolyticus* associated with skin and soft-tissue infections. **J. Med. Microbiol.**, v.53, p.51-55, 2004.

SIERADZKI, K., VILLARI, P., TOMASZ, A. Decreased susceptibilities to teicoplanin and vancomycin among coagulase-negative methicillin-resistant clinical isolates of staphylococci. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.42, n.1, p.100-107, 1998.

SILVA, A.C.N.; BERNARDES, R.S.; MORAES, L.R.S.; REIS, J.D.P. Critérios adotados para seleção de indicadores de contaminação ambiental relacionados aos resíduos dos serviços de saúde: uma proposta de avaliação. **Cad. Saúde Pública**, v.18, p.1401-9, 2002.

SILVA, V.L.; DINIZ, C.G.; dos SANTOS, S.G; GOMES, R.M.; NICOLI, J.R.; MAGALHÃES, P.P.; MENDES, E.N.; de CARVALHO, M.A.; FARIAS, L.M. Physiological alterations of a *Fusobacterium nucleatum* strain exposed to oxidative stress. **J. Appl. Microbiol.**, v.103, n.1, p.20-26, 2007.

SISINNO, C.L.S.; OLIVEIRA, R.M.de. **Resíduos sólidos, ambiente e saúde – uma visão multidisciplinar**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2002. 142p.

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

SOUZA, E.L. **Medidas para prevenção e minimização da contaminação humana e ambiental causadas pelos resíduos de serviços de saúde gerados em estabelecimento hospitalar – estudo de caso**. 2005. 150f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde Ambiental). Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde Ambiental, Escola de Engenharia de São Carlos-Universidade de São Paulo, 2005.

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.

STEPANOVIC, S., DIMITRIJEVIC, V., VUKOVIC, D., DAKIC, I., SAVIC. B., SVABIC VLAHOVIC, M. *Staphylococcus sciuri* as a part of skin, nasal and oral flora in healthy dogs. **Vet. Microbiol.**, v.82, n.2, p.77-185, 2001.

STEPANOVIC, S., DAKIC, I., DJUKIC, S., LOZUK, B., SVABIC-VLAHOVIC, M. Surgical wound infection associated with *Staphylococcus sciuri*. **Scand. J. Infect. Dis.**, v.34, n.9, p.685–686, 2002.

STEPANOVIC, S., JEZEK, P., VUKOVIC, D., DAKIC, I., PETRAS, P. Isolation of members of the *Staphylococcus sciuri* group from urine and their relationship to urinary tract infections. **J. Clin. Microbiol.**, v.41, n.11, p.5262–5264, 2003.

STREIT, J.M., JONES, R.N., SADER, H.S., FRITSCH, 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 detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus*. **J. Clin. Microbiol.**, v.41, n.9, p.4089-4094, 2003.

SWENSON, J.M.; WILLIAMS, P.P.; KILLGORE, G.; O'HARA, C.M.; TENOVER, F.C. Performance of eight methods, including two new rapid methods, for detection of oxacillin resistance in a challenge set of *Staphylococcus aureus* organisms. **J. Clin. Microbiol.**, v.39, n.10, p.3785-3788, 2001.

TABE, Y.; NAKAMURA, A.; OGURI, T.; IGARI, J. Molecular characterization of epidemic multiresistant *Staphylococcus haemolyticus* isolates. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v.32, n.3, p.177-183, 1998.

TAKAYANAGUI, A.M.M. **Trabalhadores de saúde e meio ambiente: ação educativa do enfermeiro na conscientização para gerenciamento de resíduos sólidos**. 1993, 178 f. Tese (Doutorado em Enfermagem). Programa Interunidades de Doutorado, Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto-Universidade de São Paulo, 1993.

TAKAYANAGUI, A.M.M. Gerenciamento de resíduos de serviços de saúde. In: PHILIPPI JR., A. (Ed.). **Saneamento, Saúde e Ambiente: fundamentos para um desenvolvimento sustentável**. Barueri: Manole, 2005. cap.9, p.323-374.

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.

VELASCO, D.; DEL MAR TOMAS, M.; CARTELLE, M.; BECEIRO, A.; PEREZ, A.; MOLINA, F.; MOURE, R.; VILLANUEVA, R.; BOU, G. Evaluation of different methods for detecting methicillin (oxacillin) resistance in *Staphylococcus aureus*. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.55, n.3, p.379-382, 2005.

VON EIFF, C. V.; PETERS, G.; HEIFMANN, C. Pathogenesis of infections due the coagulase negative staphylococci. **Lancet Infect. Dis.**, v.2, p.677-685, 2002.

WALET, F.; STUIT, L.; BOULANGER, E.; ROUSSEL-DELVALLEZ, M.; DEQUIEDT, P.; COURCOL, R.J. Peritonitis due to *Staphylococcus sciuri* in a patient on

continuous ambulatory peritoneal dialysis. **Scand. J. Infect. Dis.**, v.32, n.6, p.697–698, 2000.

WEBSTER, J.A.; BANNERMAN, T.L.; HUBNER, R.J.; BALLARD, D.N.; COLE, E. M.; BRUCE, J.L.; FIEDLER, F.; SCHUBERT, K.; KLOOS, W.E. Identification of the *Staphylococcus sciuri* species group with EcoRI fragments containing rRNA sequences and description of *Staphylococcus vitulus* sp. nov. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v.44, n.3, p.454–460, 1994.

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.

WITTE, W. Antibiotic resistance in gram-positive bacteria: epidemiological aspects. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.44 (suppl.A), p.1-9, 1999.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). Health topics. Disponível em: <http://www.who.int/topics/en/>. Acesso em: 23/05/2009.

WU, S.; PISCITELLI, C.; DE LENCASTRE, H.; TOMAS Z,A. Tracking the evolutionary origin of the methicillin resistance gene: cloning and sequencing of a homologue of *mecA* from a methicillin susceptible strain of *Staphylococcus sciuri*. **Microb. Drug Resist.**, v. 2, n.4, p.435-441, 1996.

WU, S.W.; DE LENCASTRE, H.; TOMASZ, A. Recruitment of the *mecA* gene homologue of *Staphylococcus sciuri* into a resistance determinant and expression of the resistant phenotype in *Staphylococcus aureus*. **J. Bact.**, v.183, n.8, p.2417-2424, 2001.

YONEZAWA, M.; TAKAHATA, M.; BANZAWA-FUTAKUCHI, N.; MATSUBARA, N.; WATANABE, Y.; NARITA, H.; MATSUNAGA, T.; IGARASHI, H.; KAWAHARA, M.; ONODERA, S. DNA gyrase *gyrA* mutations in quinolone-resistant clinical isolates of *Staphylococcus haemolyticus*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.40, n.4, p.1065-1066, 1996.

ZANON, U. Riscos infecciosos imputados ao lixo hospitalar: realidade epidemiológica ou ficção sanitária? **Rev. Soc. Bras. Med.Trop.**, v.23, n.3, p.163-70, 1990.

ZANON, U.; EIGENHEER, E. **O que fazer com os resíduos hospitalares: proposta para classificação, embalagem, coleta e destinação final**. Rio de Janeiro, Centro de Informações sobre Resíduos Sólidos/Universidade Federal Fluminense, 1991.

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. Detection 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 detection 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.

**APENDICE A** – Artigo publicado em periódico nacional

Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical – ISSN 0037-8682

Título: Ocorrência de bactérias clinicamente relevantes nos resíduos de serviços de saúde em um aterro sanitário brasileiro e perfil de susceptibilidade a antimicrobianos

## Ocorrência de bactérias clinicamente relevantes nos resíduos de serviços de saúde em um aterro sanitário brasileiro e perfil de susceptibilidade a antimicrobianos

Occurrence of clinically relevant bacteria in health service waste in a Brazilian sanitary landfill and antimicrobial susceptibility profile

Thiago César Nascimento<sup>1</sup>, Werley de Almeida Januzzi<sup>1</sup>, Mariléia Leone<sup>2</sup>, Vânia Lúcia da Silva<sup>1</sup> e Cláudio Galuppo Diniz<sup>1</sup>

### RESUMO

Os resíduos de serviços de saúde suscitam polêmica quanto a importância para a saúde humana, animal e ambiental. Avaliou-se a ocorrência de bactérias clinicamente relevantes na pilha de resíduos de serviços de saúde em um aterro sanitário e seu perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos. Alíquotas de chorume foram processadas para isolamento seletivo de *Staphylococcus* sp, bastonetes Gram negativos da família *Enterobacteriaceae* e não fermentadores. Resistência bacteriana a todos os antimicrobianos testados foi observada em todos os grupos microbianos, além de resistência a mais de uma droga. Os resultados permitem sugerir que bactérias viáveis nos resíduos de serviços de saúde representam riscos à saúde humana e animal. Além disso, a ocorrência de linhagens multirresistentes sustenta a hipótese dos resíduos de serviços de saúde atuarem como reservatórios de marcadores de resistência, com impacto ambiental. A falta de legislação regional de segregação, tratamento e destino de resíduos podem expor diferentes populações a riscos de transmissão de doenças infecciosas associadas a microrganismos multirresistentes.

**Palavras-chaves:** Resíduo de serviço de saúde. *Staphylococcus* sp. *Enterobacteriaceae*. Bastonetes Gram negativos não-fermentadores. Resistência antimicrobiana.

### ABSTRACT

Health service waste gives rise to controversy regarding its importance for human, animal and environmental health. Occurrences of clinically relevant bacteria in piles of health service waste in a sanitary landfill and their antimicrobial susceptibility profile were evaluated. Aliquots of leachate were processed for selective isolation of *Staphylococcus* sp, Gram-negative rods of the *Enterobacteriaceae* family and non-fermenters. Bacterial resistance to all the antimicrobials tested was observed in all microbial groups, including resistance to more than one drug. The results make it possible to suggest that viable bacteria in health service waste represent risks to human and animal health. Furthermore, occurrences of multiresistant strains support the hypothesis that health service waste acts as a reservoir for resistance markers, with an environmental impact. The lack of regional legislation concerning segregation, treatment and final disposal of waste may expose different populations to risks of transmission of infectious diseases associated with multiresistant microorganisms.

**Key-words:** Health service waste. *Staphylococcus* sp. *Enterobacteriaceae*. Non-fermenting Gram-negative rods. Antimicrobial resistance.

Entre os diferentes tipos de resíduos gerados pelo homem, os produzidos nos serviços de saúde têm merecido maior atenção nos últimos anos, principalmente devido às suas frações infectantes. Devido à grande variedade de fontes geradoras de resíduos, a

legislação vigente classifica os mesmos segundo sua origem. Esta legislação, entretanto, é de competência regional, e variações na classificação dos resíduos podem existir. Como legislação federal norteadora, no Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) classifica os resíduos quanto a sua origem em: domiciliar, comercial, varrição e feiras livres, serviços de saúde, portos, aeroportos e terminais rodoviários e ferroviários, industriais, agrícolas e resíduos de construção civil<sup>12</sup>.

De maneira expressiva, no Brasil, mais de 30 mil unidades de saúde produzem resíduos de serviços de saúde (RSS), e, na maioria das cidades, a questão do manejo não está resolvida. Além disso, algumas unidades de saúde desconhecem a quantidade e a composição dos resíduos que produzem<sup>5</sup>.

É grande e polêmica a discussão sobre a importância e o significado dos RSS no potencial de risco para a saúde humana

1. Laboratório de Fisiologia e Genética Molecular Bacteriana, Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG. 2. Departamento de Enfermagem Materno-Infantil e Saúde Pública, Faculdade de Enfermagem, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG.  
Apoio Financeiro: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)  
Endereço para correspondência: Prof. Cláudio Galuppo Diniz. Laboratório de Fisiologia e Genética Molecular Bacteriana/Dep<sup>o</sup> de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia/ICB/UFJF, Campus Universitário s/n<sup>o</sup>, Martelos, 36036-900 Juiz de Fora, MG.  
Telefax: 55 32 3229-3213  
e-mail: claudio.diniz@ufjf.edu.br  
Recebido para publicação em 25/03/2009  
Aceito em 11/08/2009

e ambiental. Vários autores afirmam que não existem fatos que comprovem que o resíduo hospitalar seja mais contaminado que o resíduo doméstico e que possa causar doença no ambiente hospitalar ou na comunidade<sup>14 15 19</sup>. As exceções unânimes são os resíduos perfurocortantes e as culturas microbiológicas. O risco de contaminação pelo manuseio desses resíduos é alto, tanto no momento da geração, do acondicionamento e do descarte, quanto durante a coleta externa e a disposição final, devido às suas características físicas e ao seu potencial de contaminação através de microrganismos retidos, requerendo normas seguras de manuseio e acondicionamento<sup>15</sup>.

Vários microrganismos podem ser encontrados nos RSS e, quando não são patógenos obrigatórios, apresentam grande potencial patogênico, considerando-se, sobretudo, a susceptibilidade dos possíveis hospedeiros (humanos ou não) que entrem, eventualmente, em contato com eles. Destacam-se bactérias da microbiota anfibiótica, tais como: *Enterococcus* sp, *Klebsiella* sp, *Salmonella* sp, *Shigella* sp, *Vibrio cholerae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus* spp e *Staphylococcus aureus*. Além destes, outros microrganismos como *Neisseria gonorrhoeae*, *Bacillus anthracis*; vírus do herpes; vírus da imunodeficiência humana; vírus das hepatites A, B e C; *Candida albicans* e outros fungos também podem ser encontrados. Há de se considerar, ainda, a ocorrência de helmintos e outros parasitas nos RSS<sup>2</sup>.

Desta forma, considerando a potencialidade dos RSS como agentes de disseminação de microrganismos potencialmente patogênicos para os seres humanos e outros animais, além de veículo para disseminação de marcadores de resistência a drogas antimicrobianas, avaliou-se a ocorrência de bactérias clinicamente relevantes nesses resíduos, como representantes da família *Enterobacteriaceae*, bastonetes Gram negativos não fermentadores (BGNNF), cocos Gram positivo do gênero *Staphylococcus*, e o seu perfil de susceptibilidade a drogas antimicrobianas de interesse clínico-microbiológico.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Isolamento e identificação de amostras bacterianas nos resíduos do serviço de saúde.** Aliquotas de 10ml de chorume percolado foram obtidas da pilha de resíduos do serviço de saúde, no aterro sanitário do Departamento Municipal de Limpeza Urbana (DEMLURB), entre novembro de 2006 e abril de 2007, em Juiz de Fora, MG. Os materiais foram imediatamente transportados ao Laboratório de Fisiologia e Genética Molecular Bacteriana do ICB/UFJF. Amostras bacterianas foram isoladas após cultura nos seguintes meios seletivos: ágar bile verde brilhante (Difco Laboratories, Detroit, MI), para isolamento de representantes da família *Enterobacteriaceae* e de BGNNF entéricos; e ágar hipertônico manitol (Difco Laboratories) para isolamento de linhagens representativas de *Staphylococcus*.

As amostras representativas isoladas da família *Enterobacteriaceae* e do grupo dos BGNNF foram identificadas presuntivamente por métodos bioquímico-fisiológicos convencionais, como já estabelecido para identificação destas espécies<sup>7</sup>. Os testes incluíram avaliação da morfologia celular pela

coloração de Gram, fermentação dos carboidratos glicose, lactose e sacarose, produção de indol, fenilalanina, ureia, H<sub>2</sub>S, lisina e motilidade, citrato de Simmons, lisina descarboxilase e citocromo-oxidase. As linhagens de *Staphylococcus* foram identificadas presuntivamente pela habilidade de fermentação anaeróbica da glicose, produção das enzimas catalase e coagulase e teste da fermentação do manitol, de acordo com a literatura<sup>10 11</sup>.

**Avaliação do perfil de susceptibilidade a drogas antimicrobianas.** A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada pelo método de diluição em ágar, segundo recomendações do *Clinical Laboratory Standards Institute*<sup>5</sup>. Concentrações crescentes (de 0,0625µg/ml a 1.024,0µg/ml) das drogas, a partir de soluções estoque, foram adicionadas a frascos contendo meio ágar Mueller Hinton fundido (HiMedia Laboratories, Mumbai, Índia) e vertido em placas estéreis. As drogas antimicrobianas foram selecionadas com base em sua relevância clínica: ampicilina, gentamicina, cloranfenicol e a associação ampicilina/sulbactam (para *Enterobacteriaceae*), ceftazidima, ciprofloxacina, gentamicina e cloranfenicol (para BGNNF); rifamicina, penicilina, oxacilina, ciprofloxacina e eritromicina (para *Staphylococcus*). Linhagens de referência, cujos perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos são conhecidos, foram incluídas, como controle de qualidade: *Staphylococcus aureus* 29213 e *Escherichia coli* ATCC 25922.

## RESULTADOS

No período, foram coletadas sete amostras de chorume percolado da pilha de RSS no aterro sanitário de Juiz de Fora/MG. Foram isoladas 73 amostras de *Staphylococcus* coagulase negativo, 72 amostras de bastonetes Gram negativos da família *Enterobacteriaceae* e 36 amostras bastonetes Gram negativos não fermentadores (BGNNF). Entre os Gram negativos da família *Enterobacteriaceae*, 58,3% (42/72) foram presuntivamente identificados como *Citrobacter* sp; 8,3% (6/72) como *Providencia* sp; 9,7% (7/72) como *Klebsiella* sp; 8,3% (6/72) como *Proteus* sp; 5,6% (4/72) como *Escherichia coli*; 2,8% (2/72) como *Hafnia* sp; 2,8% (2/72) como *Morganella* sp. Foram identificadas, também, uma amostra de *Salmonella* sp (1,4%), uma *Shigella* sp (1,4%) e uma *Serratia* sp (1,4%). Entre os BGNNF, 61,1% (22/36) foram identificados presuntivamente como *Acinetobacter* sp e 38,9% (14/36) como *Pseudomonas* sp.

Os resultados dos testes de susceptibilidade aos antimicrobianos são mostrados na **Tabela 1** e estão apresentados em termos de CIM<sub>50</sub> (concentração inibitória mínima, na qual 50% dos isolados testados foram inibidos) e CIM<sub>90</sub> (concentração inibitória mínima, na qual 90% dos isolados testados foram inibidos), além da variação das CIMs.

Considerando-se os *Staphylococcus* coagulase negativo, eritromicina foi a droga menos efetiva, com taxa de resistência de 57%, seguida pela penicilina (56%), oxacilina (53%) e rifamicina (47%). Ciprofloxacina foi o antimicrobiano mais efetivo, embora 25% das linhagens tenham apresentado resistência intermediária. Em relação aos bastonetes Gram negativos da

família *Enterobacteriaceae*, a ampicilina foi o antimicrobiano menos efetivo, com taxa de resistência de 83%, seguido da associação ampicilina-sulbactam (75,6%), gentamicina (39%) e cloranfenicol (36,6%). Avaliando-se os BGNNE, cloranfenicol foi o antimicrobiano menos efetivo, com taxa de resistência de 88,9%, seguido da ceftazidima (61,1%). As menores taxas de

resistência aos antimicrobianos foram observadas para as drogas gentamicina e ciprofloxacina (22,2%).

A **Tabela 2** mostra a distribuição dos padrões de susceptibilidade às drogas, considerando resistência a um ou mais agentes antimicrobianos. Entre as 68 linhagens de *Staphylococcus*, 12 (17,6%) foram susceptíveis a todas as drogas

TABELA 1

Concentração inibitória mínima (CIM) de antimicrobianos para linhagens bacterianas representativas de *Staphylococcus* sp coagulase negativo, bastonetes Gram negativos (BGN) da família *Enterobacteriaceae* e BGN não fermentadores isolados de chorume produzido por resíduos de serviços de saúde do aterro sanitário da Cidade de Juiz de Fora, MG.

Número de linhagens representativas e antimicrobianos testados	Concentração inibitória mínima (µg/ml)		
	50%	90%	variação
<i>Staphylococcus</i> coagulase negativo (n° = 68)			
rifamicina	0,5	16,0	0,06 - 16,0
oxacilina	2,0	>1.024,0	0,06 - > 1.024,0
eritromicina	32,0	64,0	0,06 - 512,0
penicilina	2,0	>1.024,0	0,06 - > 1.024,0
ciprofloxacina	0,25	2,0	0,06 - 2,0
BGN família <i>Enterobacteriaceae</i> (n° = 41)			
ampicilina	256,0	1.024,0	0,25 - > 1.024,0
ampicilina/sulbactam	64,0	256,0	0,12 - > 1.024,0
gentamicina	8,0	64,0	0,25 - 256,0
cloranfenicol	16,0	64,0	8,0 - 128,0
BGN não-fermentadores (n° = 18)			
ceftazidima	128,0	1.024,0	2,0 - > 1.024,0
ciprofloxacina	0,5	8,0	0,25 - 32,0
gentamicina	4,0	32,0	1,0 - 256,0
cloranfenicol	64,0	64,0	16,0 - 64,0

BGN: Bastonetes Gram negativos

TABELA 2

Distribuição dos padrões de susceptibilidade a drogas, considerando resistência a um ou mais agentes antimicrobianos entre as amostras bacterianas representativas isoladas de chorume produzido por resíduos de serviços de saúde do aterro sanitário da Cidade de Juiz de Fora, MG.

Linhagens representativas (n°)	Fenótipo de resistência			Susceptibilidade a todas as drogas
	Droga	n°	%	
<i>Staphylococcus</i> sp coagulase negativo (n° = 68)	ERY	18	26,5	n°=12; 17,6%
	PEN	1	1,5	
	ERY/PEN	1	1,5	
	OXA/PEN	2	2,9	
	ERY/RIF/OXA/PEN	17	25,0	
	ERY/RIF/OXA/PEN/CIP	17	25,0	
BGN família <i>Enterobacteriaceae</i> (n° = 41)	AMP/GEN	1	2,4	n°=4; 9,8%
	AMP/CHL	1	2,4	
	AMP/AMS	3	7,3	
	AMP/GEN/CHL	2	4,9	
	AMP/AMS/CHL	6	14,7	
	AMP/AMS/GEN	3	7,3	
	AMP/AMS/GEN/CHL	21	51,2	
BGN não-fermentadores (n° = 18)	CHL	4	22,2	n°=0; 0,0%
	CHL/GEN	1	5,6	
	CHL/CAZ	3	1,7	
	CHL/CAZ/CIP	6	33,3	
	CHL/CAZ/GEN	2	11,1	
	CHL/CAZ/GEN/CIP	2	11,1	

BGN: bastonete Gram negativos, ERY: eritromicina, PEN: penicilina, OXA: oxacilina, RIF: rifamicina, CIP: ciprofloxacina, AMP: ampicilina, GEN: gentamicina, CHL: cloranfenicol, AMS: ampicilina-sulbactam, CAZ: ceftazidima.



testadas, enquanto 19 (28%) foram resistentes a pelo menos uma droga testada. Resistência simultânea a dois antimicrobianos foi observada, sendo uma linhagem resistente à eritromicina/penicilina e duas linhagens resistentes à oxacilina/penicilina; 17 linhagens foram resistentes a quatro drogas antimicrobianas (eritromicina/rifamicina/oxacilina/penicilina); e 17 linhagens foram resistentes a estas mesmas quatro drogas, além de apresentarem resistência intermediária à ciprofloxacina.

Entre as 41 linhagens de *Enterobacteriaceae*, quatro (9,8%) foram sensíveis a todos os antimicrobianos, enquanto cinco linhagens apresentaram resistência simultânea a duas drogas (ampicilina/gentamicina, ampicilina/cloranfenicol ou ampicilina/ampicilina-sulbactam); 11 linhagens apresentaram resistência a três drogas (ampicilina/gentamicina/cloranfenicol ou ampicilina/gentamicina/ampicilina-sulbactam ou ainda ampicilina/cloranfenicol/ampicilina-sulbactam); 21 linhagens apresentaram resistência simultânea a quatro drogas (ampicilina/gentamicina/cloranfenicol/ampicilina-sulbactam).

Considerando os BGNNE, quatro (22,2%) linhagens apresentaram resistência a no mínimo uma droga testada; quatro linhagens apresentaram resistência simultânea a duas drogas (cloranfenicol/gentamicina ou cloranfenicol/ceftazidima); oito linhagens apresentaram resistência a três drogas (cloranfenicol/ceftazidima/ciprofloxacina ou cloranfenicol/ceftazidima/gentamicina); e duas linhagens apresentaram resistência a quatro drogas (cloranfenicol/ceftazidima/ciprofloxacina/gentamicina).

## DISCUSSÃO

A avaliação microbiológica do chorume produzido a partir da pilha de resíduos do serviço de saúde no Aterro Sanitário da Cidade de Juiz de Fora/MG mostrou que estes resíduos, quando descartados sem tratamento prévio, permitem a manutenção de diferentes espécies bacterianas viáveis com percentuais elevados de linhagens resistentes a diferentes drogas antimicrobianas de uso clínico tanto hospitalar quanto comunitário.

A resistência aos antimicrobianos é um fenômeno genético, relacionado à existência de genes contidos nos microrganismos, que codificam diferentes mecanismos bioquímicos e que impedem a ação das drogas<sup>18,20</sup>. A contenção deste fenômeno em nosso meio 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 das bactérias<sup>18</sup>.

Neste estudo, observou-se a ocorrência de linhagens bacterianas de grande relevância clínica, tais como *Staphylococcus* coagulase negativo, bastonetes Gram negativos não-fermentadores e espécies da família *Enterobacteriaceae*, resistentes a importantes drogas betalactâmicas, como a penicilina e a ampicilina. Pela análise do perfil de susceptibilidade aos betalactâmicos associados a inibidores de betalactamases, observa-se que a maioria das linhagens resistentes

aos primeiros provavelmente é produtora de betalactamases, o que representa um grande problema na nossa realidade hoje. Além disso, a resistência simultânea de algumas linhagens aos betalactâmicos associados a inibidores de betalactamases permite sugerir que haja resistência por outros mecanismos<sup>6</sup>. Observou-se também resistência às cefalosporinas, como a ceftazidima, em linhagens de bastonetes Gram negativos não-fermentadores.

Além disso, observou-se um importante índice de resistência a drogas importantes contra *Staphylococcus* coagulase negativo, como a oxacilina. A ocorrência destas linhagens no nosso meio é importante, não apenas pelo indicativo de resistência cruzada, como também de disseminação de marcadores de resistência<sup>3</sup>.

No Brasil, a disposição final da maior parte dos RSS é inapropriada. A política de segregação municipal destes resíduos baseia-se, sobretudo, no seu descarte em lixões, embora uma pequena parcela receba tratamento adequado e destino final em aterro sanitário<sup>16,17</sup>. Os impactos provocados pelos resíduos sólidos municipais podem estender-se para a população em geral, direta ou indiretamente, por meio da poluição e contaminação dos corpos hídricos e dos lençóis subterrâneos, dependendo do uso da água e da absorção de material tóxico ou contaminado<sup>9</sup>.

Nossos resultados, ainda que preliminares, reforçam as reflexões relacionadas ao papel destes resíduos como reservatórios de patógenos microbianos putativos, além de linhagens resistentes aos antimicrobianos. Embora acredite-se que outros tipos de resíduos associados às atividades humanas possam representar riscos também potenciais, nossos resultados permitem sugerir que a carga de antimicrobianos usada nos serviços de saúde possa contribuir para a seleção de marcadores de resistência com grande impacto, neste caso, para os diferentes ecossistemas. Além disso, a falta de legislação regional cientificamente fundamentada de segregação, tratamento e destino de resíduos pode expor profissionais e indivíduos das comunidades de áreas de aterros a riscos de transmissão de doenças infecciosas associadas a bactérias multirresistentes.

## AGRADECIMENTOS

Os autores são gratos ao Departamento Municipal de Limpeza Urbana do município de Juiz de Fora e ao Programa de Pós-Graduação em Saúde (Saúde Brasileira) da Universidade Federal de Juiz de Fora.

## REFERÊNCIAS

1. American Society for Microbiology. Antimicrobial Resistance an Ecological Perspective. Report From the American Academy of Microbiology. American Society for Microbiology, Washington, DC, 2000.
2. Bidone FRA. Resíduos sólidos provenientes de coletas especiais: eliminação e valorização. Abes, Rio de Janeiro, 2001.
3. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. In: Abstract of the 15<sup>th</sup> Informational Supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute document. M100-S17 (ISBN 1-56238-625-5), Wayne, Pennsylvania, USA, 2007.
4. Deus ABS, De Luca SJ, Clarke RT. Índice de impacto dos resíduos sólidos urbanos na saúde pública (IIRSP): metodologia e aplicação. Revista Engenharia Sanitária e Ambiental 9: 329-334, 2004.

5. Ferreira JA. Resíduos sólidos e lixo hospitalar: uma discussão ética. *Cadernos de Saúde Pública* 11: 314-320, 1995.
6. Fisher JF, Meroueh SO, Mobashery S. Bacterial resistance to beta-lactam antibiotics: compelling opportunism, compelling opportunity. *Chemical Reviews* 105:395-424, 2005.
7. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. *Diagnóstico Microbiológico. Texto e Atlas Colorido*. 6ª edição, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2008.
8. Levy SB. The challenge of antibiotic resistance. *Scientific American* 278: 32-39, 1998.
9. Machado C, Prata F DA. *Gestão de Resíduos Sólidos Urbanos em Niterói. In: Anais do 20º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, Rio de Janeiro, Cd-rom. III, 1999.*
10. Madigan MT, Martinko JM, Parker J. *Microbiologia de BROCK*. 10ª edição. Prentice Hall, São Paulo, 2004.
11. Mc Faddin JE. *Biochemical tests for identification of medical bacteria*. Williams & Wilkins Company, Baltimore, 1977.
12. Ministério da Saúde. *Manual de gerenciamento de resíduos de serviços de saúde. Série A - Normas e Manuais Técnicos*. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, 2006.
13. Nazar MW, Pordeus IA, Werneck MAE. Dental waste management in municipal health clinics in Belo Horizonte, Brazil. *Revista Panamericana de Salud Publica* 17: 237-242, 2005.
14. Rutala WA, Odette RL, Samsa GP. Management of infectious waste by us hospitals. *The Journal of the American Medical Association* 262: 1635-1640, 1989.
15. Rutala WA, Sarubbi Jr FA. Management of waste from hospitals. *Infection Control* 4: 198-204, 1983.
16. Segura-Munoz SIS. *Impacto ambiental na área do aterro sanitário e incinerador de resíduos sólidos de Ribeirão Preto, SP. Avaliação dos níveis de metais pesado*. Tese de Doutorado, Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto – EERP, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2002.
17. Souza EL. *Medidas para prevenção e minimização da contaminação humana e ambiental causadas pelos resíduos de serviços de saúde gerados em estabelecimento hospitalar – estudo de caso*. Tese de Doutorado, Centro de Recursos Hídricos e Ecologia Aplicada – CRHEA, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2005.
18. Tavares W. Bactérias Gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 33: 281-301, 2000.
19. Zanon U. Riscos infecciosos imputados ao lixo hospitalar: realidade epidemiológica ou ficção sanitária? *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 23: 163-170, 1990.
20. Zavadinack M, Herreiro F, Bandeira COP, Ito Y, Giorlin E, Saqueti EE, Ansilero IJ, Gonçalves L, Siqueira VLD. *Staphylococcus aureus: incidência e resistência antimicrobiana em abscessos cutâneos de origem comunitária*. *Acta Scientiarum* 23: 709-712, 2001.

**APENDICE B** – Artigo a ser submetido a periódico internacional

Infection Control and Hospital Epidemiology – ISSN 0899-823X

Título: Susceptibility profiles to antimicrobials and occurrence of the *mecA* gene in coagulase negative *Staphylococcus* strains recovered from health-care waste.

Susceptibility profiles to antimicrobials and occurrence of the *mecA* gene in coagulase negative *Staphylococcus* strains recovered from residues collected in health-care waste.

**Thiago C. Nascimento, MSc; Vânia L. Silva, PhD; Cláudio G. Diniz, PhD**

From the Department of Parasitology, Microbiology and Immunology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil.

Address correspondence to Cláudio Galuppo Diniz, 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](mailto:claudio.diniz@ufjf.edu.br)

## ABSTRACT

**OBJECTIVE:** To evaluate the susceptibility profile to antimicrobials of clinical and microbiological interest and the occurrence of the *mecA* gene, in strains of coagulase negative *Staphylococcus* (CoNS) strains recovered from the liquid seeping from city sanitary landfill.

**SETTINGS:** City sanitary landfill managed by the Municipal Department of Urban Cleaning of Juiz de Fora, in Brazil.

**METHODS:** All strains were submitted to generic identification by PCR amplification of the specific DNA region codifying for the 16S internal ribosomal RNA according to established methodology and specific identification utilized the miniaturized BBL Crystal<sup>TM</sup> Gram positive Identification System. Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) of antimicrobials were determined by the agar dilution method according to guidelines of the CLSI and to investigate the *mecA* gene by established methods.

**RESULTS:** Of the 109 bacterial, 108 were generically identified by PCR amplification of the DNA region codifying for the 16S ribosomal intern RNA. The semi-automatic miniaturized system BBL Crystal<sup>TM</sup> Gram Positive Identification kit allowed the specific identification of only 26.6% of the *Staphylococcus* strains. The other strains were identified as *Staphylococcus* spp. (73.4%). Considering the minimal inhibitory concentrations of the antimicrobials, penicillin and oxacillin drugs were the less effective drugs (61.4% resistance) followed by erythromycin and azithromycin (27.3 and 22.7% resistance, respectively). The most effective antimicrobials were gentamicin and levofloxacin, for which only intermediate resistance was observed (21.6 and 1.1% respectively). All samples were susceptible to vancomycin. Considering the resistant strains, 14 (25,9%) showed to harbour *mecA* gene and in 40 (74,1%) were resistant to oxacillin by other mechanisms.

CONCLUSIONS: The 109 CNS strains analyzed showed significant resistance to the antimicrobials tested, occurrence of multi drug resistance and presence of *mecA* gene. The results in this study raise issues related to the survival of potentially pathogenic and drug-resistant microorganisms, carriers of important resistance markers possible disseminated via HSRs and contributing to intra-hospital transit.

## INTRODUCTION

Health-care waste are an outstanding category among the total general residues produced in the community. Their potential infective agents in addition to physical and chemical characteristics are a matter of great concern. The literature reports damages resulting of bad health-care waste management as environmental contamination, work accidents involving health professionals, public cleaning personnel or garbage collectors and dissemination of diseases in the general population by direct contact or indirectly through vectors.<sup>1</sup>

In this risk scenario, involving specific health-care waste components it is necessary to consider the survival of pathogens associated, for example, to contaminated biological material, which may be a vehicle of disease-causing microorganism dissemination when improperly manipulated or treated.

There is no question that the importance and significance of health-care waste to the real potential risk to human and environmental health is a polemic and highly discussed theme. However, one of the great problems to be addressed is the occurrence of potentially pathogenic organisms, favored by selective pressure of antibiotics, other medicines and chemical products. These organisms, probably resistant to antimicrobials, are a potential source of contamination of hospital materials, may induce difficult to treat infections besides contaminating the hospital sewer systems.<sup>2,3</sup>

This study investigated the occurrence of CoNS in the percolating liquid from a sanitary landfill in the city of Juiz de Fora, Estate of Minas Gerais, Brazil, considering that information on the different types of residues from health establishments and the real risk associated to drug resistance is lacking. The isolated strains were characterized by

susceptibility to antimicrobials of clinical- microbiological interest and by the presence of the *mecA* gene.



## METHODS

### **Bacterial samples**

109 CoNS strains were presumptively identified in isolates of 13 samples (10mL each) of percolating liquid collected from May, 2006 to April, 2007, from the deposition and decomposition of HRS in the city sanitary landfill managed by the Municipal Department of Urban Cleaning of the above mentioned city . All strains were submitted to generic identification by PCR amplification of the specific DNA region codifying for the 16S internal ribosomal RNA according to established methodology.<sup>4,5</sup> Pairs of initiating strands used were Staph756F (5'AACTCTGTTATTAGGGAAGAACA3'), Staph 750R (5'CCACCTTCCTCCGGTTTGTCAACC3'), Staph-1 (5'CAGCTCGTGTTCGTGAGATGT3') and Staph-2 (5'AATCATTTGTCCCACCTTCG3'). PCR reactions were conducted in a automated thermocycler (Techne® TC-412 Thermal Cycler, Southam Warwickshire, UK). Positive controls were samples of *Staphylococcus aureus* ATCC 33591, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 and *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228.

Specific identification utilized the miniaturized BBL Crystal™ Gram positive Identification System (BBL Crystal GP ID Kit, Becton, Dickinson Co. Sparks, MD, USA). Briefly, aliquot bacterial suspensions of samples grown in TSA agar (Acumedia Manufacturers, USA) were inoculated into the system, afterwards closed and incubated at 37°C for 18-24 hs. Color alterations , presence or absence of fluorescence resulting from microorganism metabolic activities were analyzed according to the data base of the BBLCrystal GP ID Kit. Samples of *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25 923 were identification controls.

### **Susceptibility profile against antimicrobial drugs**

Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) of antimicrobials were determined by the agar dilution method according to guidelines of the CLSI.<sup>6</sup> The drugs selected by clinical and microbiological relevance were penicillin, oxacillin, erythromycin, azithromycin, levofloxacin, gentamicin and vancomycin. The known profile of antimicrobial susceptibility of the reference strain *Staphylococcus aureus* ATCC29213 was used as a quality control of the method.

To investigate the *mecA* gene by established methods (4) the specific initiating probes were MecA1 (5'GTAGAAATGACTGAACGTCCGATAA3') and MecA2 (5'CCAATTCCACATTGTTTCGGTCTAA3').

PCR reactions were made in duplicate in an automated thermocycler ( Techne ® TC-412 Thermal Cycler, Southam Warwickshire). Positive and negative controls for the *mecA* gene were samples of ,respectively, *Staphylococcus aureus* ATCC 33591 and *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 and *Staphylococcus epidermidis* ATCC12228.

## RESULTS

Of the 109 bacterial strains isolated from percolating liquid at the sanitary landfill of Juiz de Fora, MG, 108 were generically identified by PCR amplification of the DNA region codifying for the 16S ribosomal intern RNA with a 99.8% correlation between methodologies.

The semi-automatic miniaturized system BBL Crystal™ Gram Positive Identification kit allowed the specific identification of only 26.85% of the *Staphylococcus* strains and of these 31% were identified as *Staphylococcus sciuri*, 27.6% as *Staphylococcus epidermidis*, 20.7% as *Staphylococcus lentus*, 10.3% as *Staphylococcus vitulinus*, 6.9% as *Staphylococcus saprophyticus* and 3.5% as *Staphylococcus haemolyticus*. The system was not able to specifically identify 72.5% of the isolated microorganisms, which were designated as *Staphylococcus* sp.

Table 1 shows results of susceptibility tests against antimicrobials as MICs, specifically MIC<sub>50</sub>, minimal concentrations inhibiting 50% of the isolates; MIC<sub>90</sub>, minimal concentrations inhibiting 90% of the isolates and also MIC variations. Penicillin and oxacillin were the less effective drugs, both with a resistance index of 61.4%, followed by erythromycin (27.3%), azithromycin (22.7%). In contrast, levofloxacin and gentamicin were the most promising antimicrobials although median resistance was detected in 1.1% and 21.6%, respectively, of the strains tested. All microorganisms were susceptible to vancomycin (Table 1).

As a whole, 26.1% of the strains tested were susceptible to all drugs in the experiment, while 11.4% resisted to at least one antimicrobial. Simultaneous resistance to 2 antimicrobials was shown by 25% of the microorganisms, to 3 by 11.4%, to 4 by 15.8%, to 5 by 9.2% and to 6 by 1.1% (Table 2).

The correlation between oxacillin susceptibility and occurrence of the *mecA* gene was analyzed for all strains identified as *Staphylococcus* and submitted to susceptibility tests. Bacteria susceptible to the drug did not harbor the *mecA* gene. However, of the strains resistant to oxacillin, 25.9% had the gene marker (Table 3).

Gene *mecA* was not detected in most coagulase negative *Staphylococcus* strains resistant to oxacillin. In addition, comparing susceptibilities of only the resistant strains to the drug no normal pattern was observed but they did show high MIC heterogeneity independent of the occurrence or not of the *mecA* gene. In general the MIC values of *mecA*-free strains were significantly smaller than the ones having the gene, although MIC variation was similar for the *mecA*-positive and *mecA* negative bacterial groups (Table 4)

## DISCUSSION

Representative strains of CoNS, isolated from liquid percolating in sanitary landfills containing health-care waste, were *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, and *Staphylococcus saprophyticus*. These strains are frequently associated to human disease and infections such as infections in intravenous catheters, osteomyelitis, endocarditis and renal and skin infections.<sup>7-9</sup> Other species also present, *Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus lentus* and *Staphylococcus vitulinus* are widely distributed in nature, mainly in food, farm animals, rodents, marsupials and water mammals but recently have been associated to more severe infections like endocarditis, peritonitis ,septic shock and infections of the urinary tract and open wounds.<sup>10-12</sup>

The low microbial identification index by the semi-automatic miniaturized system(72.5%) could be due to variations in the phenotypic expressions shown by microorganisms induced by high selective pressure of the hostile environment in sanitary landfills, which may favor selection and genetic recombination, as observed by other authors.<sup>13</sup> Considering the great load of xenobiotics and environmental variation, the phenomenon could be associated to events in the regulation of genetic expression of proteins in response to stress resulting in pleiotropic regulation. Events associated to the bacterial adaptive response under selective pressure, like that encountered in landfill seeping liquids, were not investigated in this study but, literature data does show such bacterial responses against environmental variations.<sup>14-17</sup>

Susceptibility profiles of microorganisms against the antimicrobials in the experiment showed significant levels of resistance to important drugs like oxacillin, penicillin, erythromycin, azithromycin in addition to a significant index of intermediary resistance to gentamicin. According to CLSI<sup>6</sup> the occurrence of these strains in our environment is

significant not only as an indication that resistant microorganisms are circulating but also for the dissemination of genetic markers of resistance phenomena. The data are a major alert against the indiscriminate use of antimicrobials and a call to awareness to drug resistance, one of the great challenges of science and medicine in the 21<sup>st</sup> century.<sup>18,19</sup>

Recent studies have shown that samples isolated from bacteremia and resistant to oxacillin had a high percent of resistance also to erythromycin, clindamicin and ciprofloxacin.<sup>20</sup> It is important to emphasize that the resistant indexes to erythromycin reflect its intense therapeutic use specially when penicillin is contra indicated.<sup>21</sup> In this study, levofloxacin and gentamicin were the most effective although intermediate resistance was observed to these drugs. Literature reports indicate that oxacillin resistance is associated to crossed resistance to aminoglycosides and quinolones.<sup>22</sup> Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated in different infections showed a 16.8% resistance to levofloxacin in a study where community originated MRSA's were effectively treated by gentamicin.<sup>23</sup>

This report shows high indexes of multiresistance in *Staphylococcus* strains to drugs of different mechanisms of action. Although this behavior is sometimes related to chemically similar drugs with the same mechanism of action this is not the case but, it is relevant to discussions of transferable mechanisms of resistance between exogenous and endogenous bacteria in several environments .

Gene *mecA* occurred in only 25.9% of oxacillin-resistant strains. One of the mechanisms of resistance to this drug is associated to *mecA* acquisition, a gene, which codifies the synthesis of proteins PBP2a or PBP2' having low affinity to other  $\beta$ -lactamic antimicrobials besides oxacillin.<sup>24-26</sup> The gene is inserted in a mobile genetic element, *SCCmec*, of fundamental importance in the transmission and epidemiology of bacterial resistance.<sup>27-29</sup>

Detection of *mecA* by molecular methods is considered a gold standard in the evaluation of oxacillin resistance.<sup>30</sup> It should be noted that although *mecA* –positive strains are reported as oxacillin resistant, *mecA* –negative ones with a MIC of  $\leq 2.0 \mu\text{g/mL}$  to the drug should also be reported as sensitive due to the occurrence, although rare, of other mechanisms of resistance such as overproduction of  $\beta$ -lactamases (borderline resistance) an presence of modified PBPs. Thus *mecA*-negatives with a oxacillin MIC  $\geq 4.0 \mu\text{g/mL}$  should be considered resistant.<sup>6,30</sup> These other mechanisms of resistance could explain the high levels of resistance to oxacillin in the *Staphylococcus* strains isolated in this study which were *mecA* negative.

The literature considers that phenotypical resistance to oxacillin is highly variable and in most cases it depends on *mecA* expression. By this variability, known as phenotypic heteroresistance all cells may carry the *mecA* gene but not all express phenotypic resistance in the same way and at the same time.<sup>31</sup> The results in this study do not confirm this observation, if one considers the MIC variations for oxacillin were small and most strains were resistant to high drug levels (1024 $\mu\text{g/mL}$  or more), besides the origin of the microorganisms and the selective pressure suffered in this environment.

However, oxacillin MICs in strains harboring *mecA* were higher (MIC<sub>90</sub> > 1024 $\mu\text{g/mL}$ ) than the ones for *mecA*-free strains, which were lower (MIC<sub>90</sub> 64 $\mu\text{g/mL}$ ) but highly variable. The data suggest that PBP2a or PBP2' expression maybe a complementary resistance mechanism, resulting in an adaptive strategy to the drug selective pressure, which is more efficient in these strains of microorganisms.

The results and conclusions in this report raise issues related to the survival of organisms potentially pathogenic and of strains resistant to antimicrobials, thus carrying important resistance markers disseminated via health-care waste into intra-hospital transit.

Communities in areas close to landfills and others may be under risk if the microorganisms cross the contention barriers to the spread of liquid seeping from sanitary landfills caused by human or animal activities or even by climate phenomena as torrential rains and floods .



## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to FAPEMIG and to the Health Post Graduation Program of the Federal University of Juiz de Fora, for financial support.

### **Conflict of interest statement**

None declared

### **Financial support**

This work was supported by grants from PpgS/UFJF and FAPEMIG.

## REFERENCES

1. Garcia LP, Zanetti-Ramos BG. Health services waste management: a biosafety issue. *Cad Saude Pública* 2004;20:744-752.
2. Kümmerer K. Significance of antibiotics in the environment. *J Antimicrob Chemother* 2003;52:5-7.
3. Nascimento TC, Januzzi WA, Leonel M, Silva VL, Diniz CG. Occurrence of clinically relevant bacteria in health service waste in a Brazilian sanitary landfill and antimicrobial susceptibility profile. *Rev Soc Bras Med Trop* 2009;42:415-419.
4. Strommenger B, Kettlitz C, Werner G, Witte W. Multiplex PCR assay simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2003;41:4089-4094.
5. Zhang K, Sparling J, Chow BL, Elsayed S, Hussain Z, Church DL, Gregson DB, Louie T, Conly JM. New quadriplex PCR assay for detection of methicillin and mupirocin resistance and simultaneous discrimination of *Staphylococcus aureus* from coagulase negative staphylococci. *J Clin Microbiol* 2004;42:4947-4955.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth Informational Supplement. CLSI document M100-S17. Wayne, Pennsylvania, 2007.
7. Bannerman TL. *Staphylococcus, Micrococcus, and other catalase-positive cocci that grown aerobically*. In: Murray, PR, Barron EJ, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, eds. *Manual of Clinical Microbiology*, 8th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2003:384-404.
8. Higashide M, Kuroda M, Omura CTN, Kumano M, Ohkawa S, Ichimura, S, Ohta T. Methicillin-resistant *Staphylococcus saprophyticus* isolates carrying staphylococcal

- cassette chromosome *mec* have emerged in urogenital tract infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;56:2061-2068.
9. Von Eiff CV, Peters G, Heifmann C. Pathogenesis of infections due the coagulase negative staphylococci. *Lancet Infect Dis* 2002;2:677-685.
  10. Shittu A, Lin J, Morrison D, Kolawole D. Isolation and molecular characterization of multiresistant *Staphylococcus sciuri* and *Staphylococcus haemolyticus* associated with skin and soft-tissue infections. *J Med Microbiol* 2004;53:51-55.
  11. Stepanovic S, Dakic I, Djukic S, Lozuk B, Svabic-Vlahovic M. Surgical wound infection associated with *Staphylococcus sciuri*. *Scand J Infect Dis* 2002;34:685-686.
  12. Stepanovic S, Jezek P, Vukovic D, Dakic I, Petras P. Isolation of members of the *Staphylococcus sciuri* group from urine and their relationship to urinary tract infections. *J Clin Microbiol* 2003;41:5262-5264.
  13. Couto I, Pereira S, Miragaia M, Sanches IS, Lencastre H. Identification of clinical staphylococcal isolates from humans by internal transcribed spacer PCR. *J Clin Microbiol* 2001;39:3099-3103.
  14. Diniz CG, Farias LM, Carvalho MAR, Rocha ER, Smith CJ. Differential gene expression in a *Bacteroides fragilis* metronidazole-resistant mutant. *J Antimicrob Chemother* 2004;54:100-108.
  15. Lorian V, Gemmell CG. Effect of low antibiotic concentrations on bacteria: effects on ultrastructure, virulence, and susceptibility to immune defences. In: Lorian V, ed. *Antibiotics in Laboratory Medicine Baltimore*, 4th ed. Philadelphia: Williams & Wilkins; 1994:493-549.
  16. Santos SG, Diniz CG, Silva VL, Martins WA, Cara DC, Souza NC, Serufo JC, Nicoli JR, Carvalho MA, Farias LM. Effects of oxidative stress on the virulence profile of *Prevotella*

- intermedia* during experimental infection gnotobiotic mice. *J Med Microbiol* 2007;56:289-297.
17. Silva VL, Diniz CG, dos Santos SG, Gomes RM, Nicoli JR, Magalhães PP, Mendes EN, de Carvalho MA, Farias LM. Physiological alterations of a *Fusobacterium nucleatum* strain exposed to oxidative stress. *J Appl Microbiol* 2007;105:20-26.
  18. Levy SB. The challenge of antibiotic resistance. *Scientific American* 1998;278:32-39.
  19. American Society for Microbiology - Antimicrobial Resistance an Ecological Perspective. Report From the American Academy of Microbiology. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 2000.
  20. Holmes RL, 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* 2008;52:757-760.
  21. Eady EA, Cove JH. Staphylococcal resistance revisited: community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus*-an emerging problem for the management of skin and soft tissue infections. *Curr Opin Infect Dis* 2003;16:103-124.
  22. Fluit AC, Jones ME, Schmitz FJ, 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* 2000;30:454-460.
  23. Kilic A, Li H, Stratton CW, Tang YW. Antimicrobial susceptibility patterns and staphylococcal cassette chromosome mec types of, as well as panton-valentine leukocidin occurrence among, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from children and adults in middle Tennessee. *J Clin Microbiol* 2006;44:4436-4440.
  24. Chambers HF. Detection of methicillin-resistant staphylococci. *Infect Dis Clin North Am* 1993; 7:425-433.

25. 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.
26. Schito GC. The importance of the development of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect* 2006;12:3-8.
27. Hiramatsu K, Cui L, Kuroda M, Ito T. The emergence and evolution of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* 2001;9:486-493.
28. 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* 2000;44:1549-1555.
29. Lowy FD. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest* 2003;111:1265-1273.
30. Chambers HF. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin Microb Rev* 1997;10:781-791.
31. Maranan MC, Moreira B, Boyle-Vavra S, Daum RS. Antimicrobial resistance in Staphylococci: epidemiology, molecular mechanisms and clinical relevance. *Infect Dis Clinics North Am* 1997;11:813-841.

Table 1. Susceptibility profiles to antimicrobials of bacterial strains, representative of coagulase negative *Staphylococcus* sp, isolated from liquid seeping in sanitary landfills of the city of Juiz de Fora, Estate of Minas Gerais.

Drugs tested	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )			Susceptibility (%)	Intermediate Resistance (%)	Resistance (%)
	50%	90%	Variation			
Penicillin	0,25	>1024	0,06 - >1024	38,6	-	61,4
Oxacillin	1	>1024	0,06 - >1024	38,6	-	61,4
Erythromycin	0,5	64	0,06 - >1024	60,2	12,5	27,3
Azithromycin	1	16	0,06 - 16	72,8	4,5	22,7
Levofloxacin	0,25	1	0,06 - 8	98,9	1,1	-
Gentamicin	0,25	8	0,06 - 8	78,4	21,6	-
Vancomycin	1	2	0,06 - 4	100	-	-

Table 2. Resistance phenotype distribution to one or more antimicrobials of representative coagulase negative *Staphylococcus* sp isolated from liquid seeping in sanitary landfills of the city of Juiz de Fora, Estate of Minas Gerais

Resistance phenotype	Sensibility to all drugs
ERY (5.7%)	
GEN (4.6%)	26.1%
AZI (1.1%)	
ERY/GEN (1.1 %)	
PEN/OXA (23.9%)	
PEN/OXA/ERY (9.2%)	
PEN/OXA/AZI (2.2%)	
PEN/OXA/ERY/AZI (11.4%)	
PEN/OXA/ERY/GEN (2.2%)	
PEN/OXA/GEN/AZI (2.2%)	
PEN/OXA/ERY/GEN/AZI (9.2%)	
PEN/OXA/ERY/LEV/GEN/AZI (1.1%)	

ERY (erythromycin); GEN (gentamicin); AZI (azithromycin); PEN (penicillin); OXA (oxacillin);  
LEV (levofloxacin)

Table 3. Distribution of *mecA* gene among strains of coagulase negative *Staphylococcus* isolated from the liquid seeping in sanitary landfills of the city of Juiz de Fora, Estate of Minas Gerais.

Genotype	Phenotype			
	OXA <sup>S</sup>		OXA <sup>R</sup>	
	n	%	n	%
<i>mecA</i> +	-	-	14	25,9
<i>mecA</i> -	34	100	40	74,1

OXA<sup>S</sup>: strains sensitive to oxacillin; OXA<sup>R</sup>: strains resistant to oxacillin

Table 4. Susceptibility profile to oxacillin among coagulase negative *Staphylococcus* isolated from liquid seeping from sanitary landfills in the city of Juiz de Fora, Estate of Minas Gerais.

Genotype	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )			Number of bacterial strains OXA <sup>R</sup>
	50%	90%	Variation	
<i>mecA</i> +	1024	> 1024	0,5 - > 1024	14
<i>mecA</i> -	2	64	0,5 - > 1024	40

OXA<sup>R</sup>: strains resistant to oxacillin



**APENDICE C – Trabalho apresentado em evento**

International Federation  
of Infection Control

SOCIEDAD CHILENA DE  
CONTROL DE INFECCIONES Y  
EPIDEMIOLOGIA HOSPITALARIA



9<sup>th</sup> Congress of the International Federation of Infection Control  
7<sup>th</sup> Pan-American Infection Control Congress  
14<sup>th</sup> Chilean Hospital Infection Congress

**ABSTRACTS BOOK**

Santiago, Chile

October 14 – 17, 2008

Poster 38

➤ **OXACILLIN RESISTANT COAGULASE-NEGATIVE STAPHYLOCOCCI HARBOURING MECA GENE ISOLATED FROM HEALTH-CARE WASTE IN A BRAZILIAN SANITARY LANDFILL.**

*Nascimento TC, Januzzi WA, Silva VL, Diniz CG. Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora/MG, Brazil*

Coagulase-negative *Staphylococcus* (CoNS) are considered potential pathogens related to nosocomial and opportunistic infections. Due to the wide spread use of antimicrobials, oxacillin resistance levels among CoNS are of concern, especially considering nosocomial strains. In this regard, there is the need of consistent policies and planning of waste management. Although federal regulations exist in Brazil, regional rules are practiced, which includes sanitary landfill disposal of health-care waste. This work was focused on to evaluate the oxacillin resistance and *mecA* gene among 85 CoNS isolated from health-care waste in a Brazilian sanitary landfill. Drug susceptibility patterns were evaluated by the agar dilution method, as recommended by CLSI and the *mecA* gene was detected by PCR. Overall, 40.0% of the tested strains were susceptible and 60.0% were oxacillin-resistant. Considering the resistant strains, 56.8% showed to harbour *mecA* gene and in 43.2% this resistant marker was not detected. The data shows that incorrect or inefficient management of health-care waste may contribute to the environmental persistency and spread of clinically important microorganisms, which represents a public health concern. Health-care waste might be considered reservoirs of putative pathogens which harbour antimicrobial resistance determinants, once these strains may be representative of the nosocomial microbiota. There is a need of discussions to review and elaborate efficient and consensual rules to maximize the use of public health financial resources.

**APENDICE D – Trabalho apresentado em evento**

---

*Volume 12 • Supplement 3 • November 2008*

---



**THE BRAZILIAN JOURNAL OF  
INFECTIOUS DISEASES**

---

**An Official Publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**

*EDITOR*  
Anastácio Q. Sousa

**XI CONGRESSO BRASILEIRO DE CONTROLE DE INFECÇÃO  
E EPIDEMIOLOGIA HOSPITALAR**  
20 a 23 de Novembro de 2008  
Centro de Convenções Sulamérica  
*Rio de Janeiro, RJ, Brasil*

PUBLISHED BY CONTEXTO

November 2008  
*Printed in Brazil*

## TEMA LIVRE 497

**GERENCIAMENTO DOS RESÍDUOS DO SERVIÇO DE SAÚDE E DISSEMINAÇÃO DE LINHAGENS DE STAPHYLOCOCCUS COAGULASE NEGATIVO RESISTENTES À OXACILINA PORTADORAS DO GENE MECA**

THIAGO CESAR NASCIMENTO, WERLEY DE ALMEIDA JANUZZI, MARILEIA LEONEL, VANIA LUCIA DA SILVA, CLAUDIO GALUPPO DINIZ

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA, JUIZ DE FORA, BRASIL

Considerando-se os resíduos produzidos pelos seres humanos, destacam-se os resíduos dos serviços de saúde (RSS), cuja importância justifica-se pelas suas frações infectantes. A escassez de recursos para o setor de saúde e a dificuldade de implementação de sistemas de manejo somado ao descaso com o gerenciamento dos RSS exigem das comunidades científica e política, repensar essa questão. Desta forma, considerando a potencialidade dos RSS como agentes de disseminação de microrganismos potencialmente patogênicos e de marcadores de resistência a drogas antimicrobianas, dado o crescente fenômeno da resistência, nossos objetivos foram avaliar a ocorrência de *Staphylococcus coagulase negativo* nos RSS, isoladas de amostras de chorume, coletadas no aterro sanitário da cidade de Juiz de Fora, MG e sua susceptibilidade a oxacilina relacionada com a presença ou ausência do marcador molecular, *mecA*. Foram testadas 84 linhagens de *Staphylococcus coagulase negativo* e a susceptibilidade a oxacilina foi avaliada pelo método de diluição em agar, de acordo com as recomendações do CLSI e o gene *mecA* foi detectado pela técnica da PCR. Das 84 linhagens bacterianas representativas, 33 (39,3%) foram sensíveis a oxacilina, enquanto que 51 (60,7%) foram resistentes. Com relação à detecção do gene *mecA*, das 51 linhagens oxacilina-resistentes, 29 (56,8%) amplificaram o gene específico, enquanto que 22 (43,2%) mostraram-se resistentes à oxacilina por outros mecanismos. Nossos resultados permitem sugerir que os RSS podem funcionar como reservatórios de patógenos putativos, que carregam genes de resistência a drogas antimicrobianas. Embora outros microrganismos potencialmente patogênicos possam ocorrer no RSS, a pesquisa de *Staphylococcus coagulase negativo* justifica-se pela relevância clínica destas bactérias no serviço de saúde nos dias de hoje. Estes microrganismos podem ser representativos das linhagens que circulam neste serviço, o que faz necessário a elaboração de políticas não só de segregação, mas também de destinação final de resíduos de serviço de saúde, na nossa sociedade. **Apoio:** FAPEMIG e UFJF.

**APENDICE E –Trabalho aprovado para apresentação em evento**

25º Congresso Brasileiro de Microbiologia

ResumoID: 465-1

**MINI-COMUNICAÇÃO****AREA: Microbiologia Clínica ( Divisão A )****SUB-AREA: A01.1 - Testes de sensibilidade a antimicrobianos (bactérias)****Identificação e perfil de susceptibilidade de espécies de *Staphylococcus* coagulase negativo recuperadas de resíduos de serviços de saúde****Autores** NASCIMENTO, T.C.; SILVA, V.L.; DINIZ, C.G.**Instituição** 1. UFJF; Departº de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia/ICB; Campus Universitário s/nº, Martelos. 36036-900. Juiz de Fora, MG**Resumo:**

Acredita-se que os resíduos de serviços de saúde (RSS) possam atuar como veículos de disseminação de microrganismos potencialmente patogênicos e de marcadores de resistência a drogas antimicrobianas. Assim, considerando-se os riscos para saúde humana e ambiental associados ao fenômeno da resistência microbiana a drogas, nossos objetivos foram identificar linhagens de *Staphylococcus* coagulase negativo (SCN) isoladas do chorume percolado dos RSS no aterro sanitário de Juiz de Fora, MG e determinar o seu perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de interesse clínico-microbiológico. Linhagens bacterianas presuntivamente caracterizadas como SCN (n=109), foram identificadas utilizando-se sistema comercial semiautomatizado e o seu perfil de susceptibilidade a antimicrobianos determinado pela técnica de diluição em ágar, de acordo com as recomendações do CLSI. Apenas 26,6% das amostras de SCN foram identificadas pelo sistema comercial, distribuídas em *S. sciuri* (31%), *S. epidermidis* (27,6%), *S. lentus* (20,7%), *S. vitulinus* (10,3%) *S. saprophyticus* (6,9%), *S. haemolyticus* (3,5%). As outras linhagens foram identificadas como *Staphylococcus* sp (73,4%). Entre os antimicrobianos avaliados, a penicilina e a oxacilina foram as drogas menos efetivas (61,4% de resistência), seguidas pela eritromicina e azitromicina (27,3 e 22,7% de resistência, respectivamente). Os antimicrobianos mais eficazes foram a gentamicina e levofloxacina, para os quais apenas resistência intermediária foi observada (21,6 e 1,1%, respectivamente). Todas as amostras foram susceptíveis à vancomicina. A observação de espécies bacterianas de distribuição ambiental frequentemente associadas a doenças nosocomiais e eventualmente comunitárias, altamente resistentes a antimicrobianos de grande relevância clínica, reforça as hipóteses sobre os riscos associados ao RSS em atuar como reservatório de patógenos e de marcadores de resistência a drogas. Nossos resultados suscitam reflexões relacionadas à segregação e destinação final destes resíduos e seus riscos para comunidades de áreas de aterros, além de trabalhadores de estabelecimentos de saúde, em função de sua atividade profissional. Além disso, percebe-se a necessidade de discussão ampla sobre o uso racional de antibióticos e a contenção do fenômeno de resistência. Apoio: FAPEMIG, UFJF/Programa de pós-graduação em Saúde.

**Palavras-chaves:** Identificação específica, Resíduos de serviços de saúde, Resistência antimicrobiana, *Staphylococcus* coagulase negativo

**ANEXO A – Zone diameter interpretive standards and equivalent Minimal Inhibitory Concentration (MIC) breakpoints for *Staphylococcus* spp.**

Table 2C  
*Staphylococcus* spp.  
M2-Disk Diffusion

Table 2C. (Continued)

46

Clinical and Laboratory Standards Institute. All rights reserved.

Test/Report Group	Antimicrobial Agent	Disk Content	Zone Diameter, Nearest Whole mm			Equivalent MIC Breakpoints (µg/mL)		Comments	
			R	I	S	R	S		
<b>PENICILLINS (Continued)</b>									
A	Oxacillin	30 µg cefoxitin	≤ 21	-	≥ 22	≥ 4 (oxacillin)	≤ 2	<p>For <i>S. aureus</i> and <i>S. lugdunensis</i></p> <p>For <i>S. aureus</i></p> <p>(9) For <i>S. aureus</i>, the cefoxitin disk test is comparable to the oxacillin disk test for prediction of <i>mecA</i>-mediated resistance to oxacillin; however, the cefoxitin disk test is easier to read and thus is the preferred method. For <i>S. lugdunensis</i>, only the cefoxitin disk test should be used. In this case, cefoxitin is used as a surrogate to report oxacillin. Based on the cefoxitin result, report oxacillin as susceptible or resistant.</p> <p>(10) If oxacillin intermediate results are obtained for <i>S. aureus</i>, perform testing for <i>mecA</i> or PBP 2a, the cefoxitin disk test, an oxacillin MIC test, or the oxacillin-salt agar screening test. Report the result of the alternative test rather than the intermediate result.</p> <p>For coagulase-negative staphylococci except <i>S. lugdunensis</i></p> <p>For coagulase-negative staphylococci except <i>S. lugdunensis</i></p> <p>(11) The cefoxitin disk test is the preferred method for testing coagulase-negative staphylococci. Although oxacillin interpretive criteria for coagulase-negative staphylococci correlate with the presence or absence of the gene encoding methicillin/oxacillin resistance (<i>mecA</i>) in <i>S. epidermidis</i>, these interpretive criteria may overcall resistance for other coagulase-negative staphylococci (e.g., <i>S. saprophyticus</i>). The cefoxitin disk test has higher specificity and equal sensitivity to the oxacillin disk test for coagulase-negative staphylococci. In this case, cefoxitin is used as a surrogate to report oxacillin. Based on the cefoxitin result, report oxacillin as susceptible or resistant.</p> <p>(12) 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, and flucloxacillin. Oxacillin is more resistant to degradation in storage and is more likely to detect heteroresistant staphylococcal strains. Cloxacillin disks should not be used, because they may not detect oxacillin-resistant <i>S. aureus</i>. Cefoxitin may be tested instead of oxacillin. See comments (9), (10), (11), and (13).</p> <p>(13) For all staphylococci, read the oxacillin disk for light growth within the zone of inhibition using transmitted light (plate held up to light); any discernable growth within the zone of inhibition is indicative of oxacillin resistance. Read the cefoxitin disk using reflected light.</p>	
		1 µg oxacillin	≤ 10	11-12	≥ 13	≥ 4	≤ 2		
			30 µg cefoxitin	≤ 24	-	≥ 25	≥ 0.5 (oxacillin)		≤ 0.25
			1 µg oxacillin	≤ 17	-	≥ 18	≥ 0.5		≤ 0.25

January 2007

Vol. 27 No. 1

## ANEXO B – MIC interpretive standards ( $\mu\text{g/mL}$ ) for *Staphylococcus* spp.

Table 2C. (Continued)

Test/Report Group	Antimicrobial Agent	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ ) Interpretive Standard			Comments
		S	I	R	
<p>PENICILLINS</p> <p>(7) Penicillin-susceptible staphylococci are also susceptible to other penicillins, <math>\beta</math>-lactam/<math>\beta</math>-lactamase inhibitor combinations, cepheims, and carbapenems approved for use by the FDA for staphylococcal infections. Penicillin-resistant, oxacillin-susceptible strains are resistant to penicillinase-labile penicillins but susceptible to other penicillinase-stable penicillins, <math>\beta</math>-lactam/<math>\beta</math>-lactamase inhibitor combinations, relevant cepheims, and carbapenems. Oxacillin-resistant staphylococci are resistant to all currently available <math>\beta</math>-lactam antibiotics. Thus, susceptibility or resistance to a wide array of <math>\beta</math>-lactam antibiotics may be deduced from testing only penicillin and oxacillin. Routine testing of other penicillins, <math>\beta</math>-lactam/<math>\beta</math>-lactamase inhibitor combinations, cepheims, and carbapenems is not advised.</p> <p>See comment (3).</p>					
A	Penicillin	$\leq 0.12$	-	$\geq 0.25$	(8) Resistant strains of <i>S. aureus</i> produce $\beta$ -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-labile penicillins, such as ampicillin, amoxicillin, azlocillin, carbenicillin, mezlocillin, piperacillin, and ticarcillin. A penicillin MIC of $\leq 0.03$ $\mu\text{g/mL}$ usually implies lack of $\beta$ -lactamase production, and MICs of $\geq 0.25$ $\mu\text{g/mL}$ should be considered resistant; staphylococci with penicillin MICs between 0.06 to 0.12 $\mu\text{g/mL}$ may or may not produce $\beta$ -lactamase, and an induced $\beta$ -lactamase test can clarify these MICs (see M7-A7, Section 14.2). A positive $\beta$ -lactamase test predicts resistance to penicillin, ampicillin, amoxicillin, carbenicillin, ticarcillin, mezlocillin, and piperacillin. For oxacillin-resistant staphylococci, report as resistant or do not report.
A	Oxacillin	$\leq 2$ $\leq 0.25$	-	$\geq 4$ $\geq 0.5$	For <i>S. aureus</i> and <i>S. lugdunensis</i> . For coagulase-negative staphylococci, except <i>S. lugdunensis</i> .  (9) Of the penicillinase-stable penicillins, oxacillin may be tested, and results can be applied to the other penicillinase-stable penicillins, cloxacillin, dicloxacillin, and flucloxacillin. Testing of oxacillin is preferred, since it is more resistant to degradation in storage, and because it is more likely to detect heteroresistant strains. (See the table at the end of this table for the oxacillin agar screen test for <i>S. aureus</i> .)  (10) Interpretive criteria for coagulase-negative staphylococci correlate with the presence or absence of the gene encoding methicillin resistance ( <i>mecA</i> ) for <i>S. epidermidis</i> . These interpretive criteria may overcall resistance for other coagulase-negative staphylococci (e.g., <i>S. saprophyticus</i> ). For serious infections with coagulase-negative staphylococci other than <i>S. epidermidis</i> , testing for <i>mecA</i> or the protein expressed by <i>mecA</i> , the penicillin binding protein 2a (PBP 2a, "also known as" PBP 2'), may be appropriate for strains for which the oxacillin MICs are 0.5 to 2 $\mu\text{g/mL}$ .  (11) The results of disk diffusion tests using a 30- $\mu\text{g}$ cefoxitin disk and alternate breakpoints (see box at the end of this table) can be used to predict <i>mecA</i> -mediated resistance in staphylococci. Compared to MIC tests, the cefoxitin disk test is equivalent in sensitivity and specificity for <i>S. aureus</i> . For coagulase-negative staphylococci, the cefoxitin disk test, when compared to oxacillin MIC tests, has equal sensitivity but higher specificity (i.e., the cefoxitin disk test is more accurate than the oxacillin MIC test for identifying oxacillin-susceptible strains).  (12) Class representative for ampicillin and amoxicillin. (13) For oxacillin-resistant staphylococci, report as resistant or do not report.
O	Ampicillin	$\leq 0.25$	-	$\geq 0.5$	(12) Class representative for ampicillin and amoxicillin.
O	Methicillin	$\leq 8$	-	$\geq 16$	(13) For oxacillin-resistant staphylococci, report as resistant or do not report.
O	Nafcillin	$\leq 2$	-	$\geq 4$	(14) For use with <i>S. aureus</i> only. (15) For use with <i>S. aureus</i> only.

Table 2C. (Continued)

Test/Report Group	Antimicrobial Agent	MIC (µg/mL) Interpretive Standard			Comments
		S	I	R	
<b>β-LACTAM/β-LACTAMASE INHIBITOR COMBINATIONS</b>					
(16) For oxacillin-resistant staphylococci, report as resistant or do not report.					
O	Amoxicillin-clavulanic acid	≤ 4/2	-	≥ 8/4	
O	Ampicillin-sulbactam	≤ 8/4	16/8	≥ 32/16	
O	Piperacillin-tazobactam	≤ 8/4	-	≥ 16/4	
O	Ticarcillin-clavulanic acid	≤ 8/2	-	≥ 16/2	
<b>CEPHEMS (PARENTERAL) (Including cephalosporins I, II, III, and IV. Please refer to Glossary I.)</b>					
See comment (7). (17) For oxacillin-resistant staphylococci, report as resistant or do not report.					
O	Cefamandole	≤ 8	16	≥ 32	
O	Cefazolin	≤ 8	16	≥ 32	
O	Cefepime	≤ 8	16	≥ 32	
O	Cefmetazole	≤ 16	32	≥ 64	
O	Cefonicid	≤ 8	16	≥ 32	
O	Cefoperazone	≤ 16	32	≥ 64	
O	Cefotaxime	≤ 8	16-32	≥ 64	
O	Cefotetan	≤ 16	32	≥ 64	
O	Cefoxitin	≤ 8	16	≥ 32	See comment (11)
O	Ceftazidime	≤ 8	16	≥ 32	
O	Ceftizoxime	≤ 8	16-32	≥ 64	
O	Ceftriaxone	≤ 8	16-32	≥ 64	
O	Cefuroxime sodium (parenteral)	≤ 8	16	≥ 32	
O	Cephalothin	≤ 8	16	≥ 32	
O	Moxalactam	≤ 8	16-32	≥ 64	
<b>CEPHEMS (ORAL)</b>					
(18) For oxacillin-resistant staphylococci, report as resistant or do not report.					
O	Cefaclor	≤ 8	16	≥ 32	
O	Cefdinir	≤ 1	2	≥ 4	
O	Cefpodoxime	≤ 2	4	≥ 8	
O	Cefprozil	≤ 8	16	≥ 32	
O	Cefuroxime axetil (oral)	≤ 4	8-16	≥ 32	
O	Loracarbef	≤ 8	16	≥ 32	
<b>CARBAPENEMS</b>					
See comment (7). (19) For oxacillin-resistant staphylococci, report as resistant or do not report.					
O	Ertapenem	≤ 2	4	≥ 8	
O	Imipenem	≤ 4	8	≥ 16	
O	Meropenem	≤ 4	8	≥ 16	



**Table 2C. (Continued)**

Test/Report Group	Antimicrobial Agent	MIC (µg/mL) Interpretive Standard			Comments
		S	I	R	
<b>GLYCOPEPTIDES</b>					
B	Vancomycin	≤ 2	4-8	≥ 16	For <i>S. aureus</i> .  (20) Vancomycin-resistant <i>S. aureus</i> (VRSA) strains (MICs ≥ 16 µg/mL) are reliably detected by the broth microdilution reference method. When using other MIC methods that have not been validated to detect VRSA, BHI vancomycin agar screen plates containing 6 µg/mL of vancomycin, such as those used for detection of vancomycin-resistant enterococci, should be inoculated to enhance the sensitivity of detecting vancomycin-resistant strains. (21) Send any staphylococci determined to have an elevated MIC for vancomycin (MIC ≥ 4 µg/mL) to a reference laboratory.
Inv.	Teicoplanin	≤ 4 ≤ 8	8-16 16	≥ 32 ≥ 32	For coagulase-negative staphylococci.
<b>LIPOPEPTIDES</b>					
B	Daptomycin	≤ 1	-	-	See comment (6).
<b>AMINOGLYCOSIDES</b>					
C	Gentamicin	≤ 4	8	≥ 16	
O	Amikacin	≤ 16	32	≥ 64	
O	Kanamycin	≤ 16	32	≥ 64	
O	Netilmicin	≤ 8	16	≥ 32	
O	Tobramycin	≤ 4	8	≥ 16	
<b>MACROLIDES</b>					
B	Azithromycin or clarithromycin or erythromycin	≤ 2 ≤ 2 ≤ 0.5	4 4 1-4	≥ 8 ≥ 8 ≥ 8	(22) Not routinely tested and reported against organisms isolated from the urinary tract.
O	Dirithromycin	≤ 2	4	≥ 8	
<b>KETOLIDES</b>					
B	Telithromycin	≤ 1	2	≥ 4	
<b>TETRACYCLINES</b>					
C	Tetracycline	≤ 4	8	≥ 16	(23) 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 or minocycline or both.
O	Doxycycline	≤ 4	8	≥ 16	
O	Minocycline	≤ 4	8	≥ 16	
<b>FLUOROQUINOLONES</b>					
C	Ciprofloxacin or gatifloxacin or levofloxacin or ofloxacin	≤ 1 ≤ 0.5 ≤ 1 ≤ 1	2 1 2 2	≥ 4 ≥ 2 ≥ 4 ≥ 4	(24) <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	Moxifloxacin	≤ 0.5	1	≥ 2	
C		≤ 1	2	≥ 4	
C		≤ 1	2	≥ 4	
C		≤ 0.5	1	≥ 2	

Table 2C  
*Staphylococcus* spp.  
M7-MIC