AVALIAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DO PERFIL DE RESISTÊNCIA DE AMOSTRAS DE *Staphylococcus aureus* ISOLADAS DE CULTURAS CLÍNICAS E DE VIGILÂNCIA DE UM HOSPITAL DE ENSINO BRASILEIRO

Lívia Cafundó Almeida[1], Marcus Vinicius Pimenta-Rodrigues[2], Daniela Vanessa Moris[1], Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza[3], Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha[4]

[1]Faculdade de Medicina de Presidente Prudente - FMPP, Departamento de Microbiologia e Imunologia, [2]Curso de Mestrado em Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional – MMADRE da Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE, Presidente Prudente, SP; [3]Instituto de Biociências de Botucatu – IBB, [4]Faculdade de Medicina de Botucatu – FMB da UNESP, Botucatu, SP. Apoio: FAPESP e CNPq.

RESUMO

Staphylococcus aureus pode causar uma variedade de infecções, principalmente nosocomiais. A sua importância reside na combinação da virulência, caráter invasivo e resistência aos antibióticos constituindo desafios terapêuticos. Este estudo objetivou avaliar fenotipica e genotipicamente o perfil de resistência de amostras de *S. aureus* isoladas de pacientes hospitalizados em um hospital de ensino brasileiro. Foram avaliadas 1078 amostras obtidas de culturas de vigilância e de amostras clínicas de *S. aureus* de pacientes internados. Para avaliação do perfil fenotípico de resistência foi utilizado o método de disco-difusão conforme os critérios do CLSI, 2011. Para a determinação genotípica de resistência foi avaliada a presença do gene *mecA* pela Reação de Polimerase em Cadeia – PCR. Das 1078 amostras testadas fenotipicamente, foi observado que 75,1% das amostras eram *Staphylococcus aureus* resistente a Meticilina (MRSA), sendo que destes, 98,4% apresentaram resistência a oxacilina e 100%, a cefoxitina. Para a determinação genotípica foi realizada a técnica de PCR para amplificação do gene *mecA.* Das 443 amostras testadas para o gene *mecA* foram positivas 336 amostras (75,8%). Destas amostras, 85,7% apresentaram fenótipo de resistência a oxacilina e 88,4% a cefoxitina. Devido ao alto índice de MRSA, conclui-se a necessidade de investimento em pesquisas, racionalização do uso de antimicrobianos e criação de laboratórios de referência para verificação de resistência aos antimicrobianos.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus,* resistência, *Meca,* MRSA.

EVALUATION OF THE PHENOTYPIC AND GENOTYPIC RESISTANCE PROFILE OF SAMPLES OF *Staphylococcus aureus* ISOLATED FROM CLINICAL AND SURVEILLANCE CULTURES IN A BRAZILIAN TEACHING HOSPITAL.

ABSTRACT

Staphylococcus aureus can cause a variety of infections, especially nosocomial. Its importance lies in the combination of virulence, invasiveness and antibiotic resistance constituting therapeutic challenges. This study aimed to assess the genotype and phenotypic resistance profiles of samples of *S. aureus* isolated from hospitalized patients in a Brazilian teaching hospital. We evaluated 1078 samples obtained from surveillance cultures and clinical *S. aureus* in hospitalized patients. To assess the phenotypic resistance profile was used disk diffusion method according to CLSI criteria, 2011. For the determination of genotypic resistance was the presence of the *mecA* gene by polymerase chain reaction - PCR. Of the 1078 samples tested phenotypically, it was observed that 75.1% of the samples were Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), and of these, 98.4% were resistant to oxacillin and 100%, cefoxitin. To determine genotype was performed for the PCR amplification of the *mecA* gene. Of the 443 samples tested for the *mecA* 336 samples were positive (75.8%). Of these samples, 85.7% showed resistance phenotype oxacillin and cefoxitin 88.4%. Due to the high rate of MRSA, concludes the need for investment in research, rational use of antimicrobials and creation of reference laboratories for verification of antimicrobial resistance.

Keywords: *Staphylococcus aureus,* resistance, *mecA,* MRSA.

INTRODUÇÃO

Staphylococcus aureus pode causar uma grande variedade de infecções, muitas delas adquiridas no hospital. A grande transmissibilidade, o seu elevado potencial patogênico e a possibilidade de resistência a múltiplos antimicrobianos, são itens relevantes que contribuem para infecções estafilocóccicas em hospitais e outros serviços de saúde. Boa parte da população humana é portadora desta bactéria sendo que a maioria não apresenta quaisquer sintomas de infecção. Nesses, os principais nichos são a mucosa nasal e o períneo. A esse padrão de carreamento, no qual se observa reprodução bacteriana sem interação imunológica ou doença clínica, dá-se o nome de "colonização". Tanto o indivíduo colonizado quanto aqueles que apresentam infecção podem transmitir eficazmente o *S. aureus* através de contato direto ou indireto. A "transmissão cruzada" apresenta dinâmica aumentada no ambiente hospitalar e esse fato tem como significativa contribuição: a gravidade inerente dos indivíduos internados, os procedimentos invasivos realizados no hospital, o uso de antimicrobianos e a ocorrência denominada "understaffing", ou seja, um baixo número de profissionais prestando assistência a uma grande quantidade de pacientes (MUTO et al., 2003).

A importância dos *S. aureus* como patógenos reside na combinação da virulência mediada por suas toxinas, seu caráter invasivo e seu perfil de resistência aos antibióticos (LE LOIR et al., 2003).

Um marco importante na terapia estafilocócica foi o surgimento de *Staphylococcus aureus* resistentes a Meticilina (*Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus,* MRSA), tendo emergido nas últimas décadas, como o patógeno Gram-positivo predominante em infecções hospitalares. Estima-se que ele esteja envolvido em mais de 50% das infecções estafilocócicas adquiridas em serviços de saúde (BARRET, 2005; DERENSKI, 2005; FINCH, 2006). Os MRSA são resistentes a todos os betalactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos), pois expressam um receptor de baixa afinidade para esses antibióticos. Esses antibióticos se ligam a enzimas bacterianas constitutivas que participam da síntese da parede celular, as proteínas ligadoras de Penicilina (*Penicillin-Binding Protein,* PBP), impedindo seu funcionamento correto. O MRSA tem a capacidade de sintetizar uma variante da PBP2, a PBP2a, mantendo a sua função fisiológica porém, com baixa afinidade pelos betalactâmicos (ITO et al., 2003; McCULLOCH, 2006).

O gene que codifica a proteína PBP2a, o gene *mecA*, juntamente com seus genes reguladores, encontra-se em um elemento genético móvel, o cassete cromossômico estafilocócico *mec* (*SSCmec*) (ENRIGTH et al., 2002).

O tratamento de infecções por MRSA torna-se complicado devido ao número limitado de opções terapêuticas seguras. A opção terapêutica de escolha deve considerar o perfil de sensibilidade a antibióticos de cada isolado, sendo que de forma geral, um glicopeptídeo é uma boa opção especialmente contra isolados que carregam o *SCCmec* tipo III, sendo este o tipo que confere um fenótipo mais multiresistente (HANSSEN; SOLLID; 2006).

Assim, o objetivo deste projeto foi avaliar fenotipica e genotipicamente o perfil de resistência de amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de culturas clínicas e de vigilância de um hospital de ensino brasileiro.

MÉTODOS

Local de estudo

A pesquisa foi realizada após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Campus Botucatu.

O Hospital Estadual Bauru (HEB) é um hospital de ensino administrado pela Faculdade de Medicina de Botucatu / Universidade Estadual Paulista (FMB UNESP). A Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) do HEB realiza vigilância ativa das infecções hospitalares em todas as unidades do hospital. Ela também monitora as taxas de incidência de microrganismos multirresistentes. Essa atividade se dá de duas formas: pela avaliação sistemática dos resultados de culturas clínicas das enfermarias e UTIs e pela coleta semanal de culturas de vigilância em UTIs e na unidade de queimados. As culturas de vigilância para identificação de MRSA são obtidas por *swabs* de nasofaringe e/ou de área queimada nos pacientes internados há mais de 48 horas e/ou transferidos de outros hospitais. As culturas de vigilância para identificação de MRSA foram obtidas por *swabs* de nasofaringe e/ou de área queimada são obtidas à admissão e depois semanalmente nas UTIs e no setor de atendimento de queimados.

Amostras

Foram isoladas e identificadas como *Staphylococcus aureus* 1078 amostras coletadas de 363 pacientes internados no Hospital Estadual Bauru (HEB) no período de Outubro de 2006 a Março de 2009, isoladas de culturas de vigilância, swabs de queimaduras, secreções, hemoculturas e outros materiais clínicos (ponta de cateter, fragmento de músculo, bolha, etc). Todas as amostras foram identificadas e testadas quanto à sensibilidade a Oxacilina e Cefoxitina, e também testadas quanto a sensibilidade frente a vancomicina, eritromicina e gentamicina. Já a genotipagem foi realizada com 443 amostras segundo os seguintes critérios para seleção: com a 1° amostra de cada paciente e em alguns casos quando houve hemocultura e cultura de vigilância dentro do mesmo período, com amostras de um mesmo paciente coletadas em grande espaço de tempo, com culturas de vigilância e outro material clínico relevante para o mesmo paciente. As amostras isoladas foram categorizadas como cultura de vigilância (swab nasal e axilar), swab de queimadura, secreções (secreção uretral e de incisão cirúrgica), hemoculturas e outros materiais clínicos (ponta de cateter, bolha, fragmento de músculo, pele, cultura de tecido cirúrgico e tecido subcutâneo).

Avaliação fenotipica do perfil de resistência das amostras de *Staphylococcus aureus*

A determinação fenotípica do perfil de resistência foi realizada para os 1078 isolados obtidos através da técnica de difusão da droga em ágar a partir de discos impregnados conforme critérios recomendados pelo Clinical Laboratory Standards Institute – CLSI (2008). As drogas utilizadas foram: oxacilina (1,0 μg), cefoxitina (30,0 μg), vancomicina (30,0 μg), eritromicina (15,0 μg) e gentamicina (10,0 μg). A interpretação foi realizada segundo as normas estabelecidas pelo CLSI (2008).

Avaliação genotípica do perfil de resistência das amostras de *Staphylococcus aureus*

Para a determinação genotípica foi realizada a técnica de PCR para amplificação do gene *mecA*. As amostras positivas para o gene *MecA.*

Como controle positivo para detecção do gene *mecA* foi utilizada a cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 33591 e como controle negativo a cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Análise estatística

Para comparação entre as variáveis categóricas foram realizados testes não-paramétricos para proporção: Chi-quadrado e Teste Exato de Fischer (quando recomendável). Foi utilizado parâmetro de significância de 0,05 para inclusão e remoção de variáveis nos

modelos. O mesmo parâmetro foi aplicado para definição final de significância.

RESULTADOS

Amostras

Foram estudadas 1078 amostras positivas para *S. aureus* isoladas de culturas de vigilância, swabs de queimaduras, secreções, hemoculturas e outros materiais clínicos (ponta de cateter, fragmento de músculo, bolha, etc) de 363 pacientes internados no Hospital Estadual Bauru (HEB) da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) da Universidade Estadual Paulista (UNESP) (Tabela 1). O isolamento das linhagens foi realizado conforme as normas descritas por KONEMAN et al (1997).

Tabela 1. Características das amostras de *Staphylococcus aureus* estudadas no presente relatório.

	Análise fenotípica					Análise genotípica
Material	**2006**	**2007**	**2008**	**2009**	**Total**	**Total**
Hemocultura	0	9	49	8	66	48
Cultura vigilância*	48	140	557	83	828	250
Swab queimadura	7	33	93	0	133	96
Secreções	4	6	12	6	28	30
Outros materiais clínicos	5	7	10	1	23	19
Total	**64**	**195**	**721**	**98**	**1078**	**443**
Pacientes*	50	128	163	22	363	-

* Número de pacientes com culturas positivas para *S. aureus*, alguns pacientes tem culturas positivas em anos diferentes. *swab nasal, orofaringe e axilar de cultura de vigilância.

Avaliação fenotípica do perfil de resistência das amostras de *Staphylococcus aureus*

As 1078 amostras de *Staphylococcus aureus* provenientes de pacientes internados no Hospital Estadual Bauru foram estudadas utilizando o método de disco-difusão com disco de oxacilina (1,0 μg), cefoxitina (30,0 μg), vancomicina (30,0 μg), eritromicina (15,0 μg) e gentamicina (10,0 μg). Conforme os critérios do CLSI (2008) as amostras que apresentaram o diâmetro do halo de inibição menor ou igual a 10 mm para o disco de oxacilina (1,0 μg) foram consideradas resistentes, as que apresentaram o diâmetro do halo de inibição entre 11 mm e 12 mm foram consideradas intermediárias e halo maior ou igual a 13 mm foram consideradas sensíveis. Para o disco de cefoxitina (30,0 μg) as amostras com o diâmetro do halo menor ou igual a 21 mm foram consideradas resistentes, e sensíveis as que apresentaram o diâmetro do halo de inibição maior ou igual a 22 mm.

Foram detectadas 810 amostras de *Staphylococcus aureus* Resistentes a Meticilina – MRSA (75,10%) pelo método de disco difusão, sendo que 797 destas amostras (98,40%) apresentaram resistência detectada com disco de oxacilina (1,0 μg), enquanto que na utilização do método de difusão com o disco de cefoxitina (30,0 μg) a resistência foi detectada em 810 amostras (Tabela 2).

Tabela 2. Determinação de resistência à oxacilina em amostras de *S. aureus* pela técnica de difusão da droga em ágar com disco de oxacilina (1,0 μg) e cefoxitina (30,0 μg).

	Resistente		Sensível		Intermediário	
	N	%	N	%	N	%
Oxacilina	797	98,40	280	25,90	01	0,09
Cefoxitina	810	100,00	268	24,90	-	-

Para os demais antibióticos testados 835 amostras (77,40%) apresentaram resistência a pela menos 1 antibiótico (Cefoxitina – CFO – 30,0 μg, Oxacilina – OXA – 1,0 μg, Vancomicina – VAN – 30,0 μg, Gentamicina – GEN – 10,0 μg, Eritromicina – ERI – 15,0 μg), todas as amostras testadas foram sensíveis a vancomicina, sendo que 195 amostras (18,10%) foram resistentes somente a eritromicina e 505 amostras (46,80%) foram resistentes aos discos de eritromicina e gentamicina concomitantemente.

Das 810 amostras com fenótipo MRSA, 16,20% também apresentaram fenótipo de resistência somente para eritromicina e das 110 amostras com fenótipo MSSA, 12,70% das amostras apresentaram esse mesmo fenótipo. Foi observado também que 4,30% das amostras com fenótipo MRSA apresentaram perfil intermediário de resistência frente ao disco de eritromicina. O fenótipo de resistência simultânea para gentamicina e eritromicina foi observado em 64,20% das amostras com fenótipo MRSA e em apenas 2,20% das amostras com fenótipo MSSA (Tabela 3). Nenhuma das amostras incluídas no presente estudo foi resistente somente ao disco de gentamicina.

Tabela 3. Perfil fenotípico de resistência das amostras com fenótipo MRSA e MSSA frente aos antibióticos testados.

	ERI Resistente %(n)	**ERI e GEN Sensível %(n)**	**ERI Intermediário %(n)**	**ERI + GEN Resistentes %(n)**
Fenótipo MRSA n=810	16,20 (131)	15,30 (124)	4,30 (035)	64,20 (520)
Fenótipo MSSA n=268	12,70 (034)	83,20 (223)	1,80 (005)	2,20 (006)

GEN: Gentamicina – 10,0 μg, ERI: Eritromicina – 15,0μg

Avaliação genotípica do perfil de resistência das amostras de *Staphylococcus aureus*

Para a seleção das amostras submetidas à extração do ácido nucléico e posterior análise genotípica foram utilizadas os seguintes critérios: com a 1° amostra de cada paciente e em alguns casos quando houve hemocultura e cultura de vigilância dentro do mesmo período, amostras de um mesmo paciente coletadas em grande espaço de tempo, cultura de vigilância e outro material clínico relevante do mesmo paciente, totalizando 443 amostras.

A avaliação genotípica do perfil de resistência foi realizada através da amplificação do gene *mecA* pela técnica de PCR onde foi observado que das 443 amostras testadas foi detectado o gene *mecA* em 336 amostras (75,80%) (Figura 1).



Figura 1. Eletroforese em Gel de Agarose para pesquisa do gene da *mecA* (533pb) pela técnica de PCR. L: Ladder 100pb; C-: Controle Negativo Cepa ATCC 25923; C+: Controle Positivo Cepa ATCC 33591; N: Controle da reação (H_2O); Amostras Positivas: 7, 12, 13, 14 e 24.

Das 336 amostras *mecA* positivas 288 (85,70%) e 297 (88,40%) apresentaram fenótipo de resistência a oxacilina e cefoxitina, respectivamente, uma amostra (0,30%) apresentou fenótipo intermediário a oxacilina, 47 amostras (14,0%) apresentaram fenótipo de sensibilidade frente ao disco de oxacilina e 39 amostras (11,60%) frente ao disco de cefoxitina (Tabela 4).

Tabela 4. Presença ou ausência do gene *mecA* em cepas testadas pela técnica de disco difusão com disco de oxacilina e cefoxitina.

PCR	Teste Fenotípico				
	Oxacilina (1,0 µg)			Cefoxitina (30,0 µg)	
	S	R	I	S	R
mecA + (N=336)	47	288	1	39	297
mecA - (N=107)	107	0	0	107	0
Total (N=443)	154	288	1	146	297

S: sensível; I: intermediário; R: resistente

Analisando a sensibilidade e especificidade dos métodos fenotípicos e genotípicos na determinação da resistência a oxacilina nas amostras de *S. aureus* estudadas, observou-se que, utilizando a determinação da presença do gene *mecA* como padrão ouro, a técnica de disco difusão com discos de oxacilina (1,0 µg) e cefoxitina (30,0µg) apresentou 86,00% e 88,40% de sensibilidade, respectivamente e 100,0% de especificidade (Tabela 5).

Tabela 5. Determinação da sensibilidade e especificidade dos métodos fenotípicos e genotípicos na determinação de resistência a oxacilina nas amostras de *S. aureus*.

Teste Fenotípico	*mecA*		Sensibilidade	Especificidade
	Positivo (N=336)	Negativo (N=107)	%	%
Disco Oxacilina (1µg)	289*	107	86,00	100,00
Disco Cefoxitina (30µg)	297	107	88,40	100,00

* A única amostra que apresentou resultado intermediário ao disco de oxacilina foi considerada resistente.

Das 336 amostras MRSA confirmadas pela presença do gene *mec*A, 35 (10,40%) foram isoladas de hemoculturas, 28 (8,30%) isoladas de secreções, 73 (21,70%) de swabs de queimadura, 182 (54,10%) de culturas de vigilância e 18 (5,30%) de outros materiais clínicos (Figura 2).

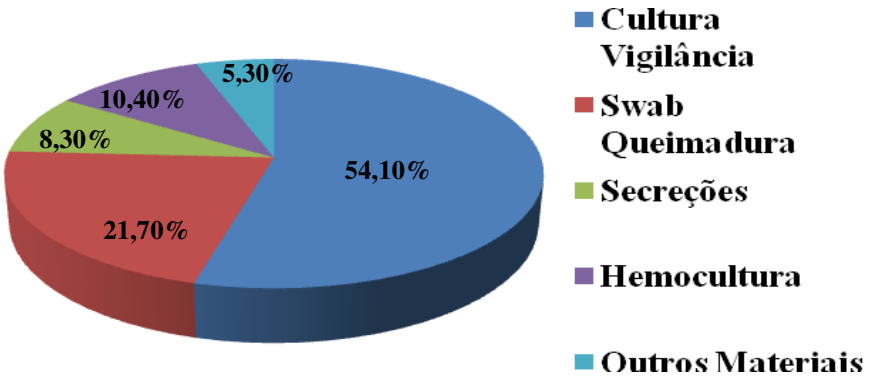

Figura 2. Distribuição de amostras MRSA em relação ao material clínico.

Das 336 amostras MRSA detectadas pela presença do gene *mecA*, 85 amostras (25,30%) não apresentaram resistência fenotípica detectada pela técnica de disco difusão aos antibióticos testados, por outro lado 251 amostras (74,70%) apresentaram resistência a pela menos um dos antibióticos testados, sendo que dessas, 57 amostras (22,70%) foram resistentes somente a eritromicina, 17 amostras (6,80%) apresentaram perfil intermediário de resistência para eritromicina e 182 amostras (72,50%) apresentaram resistência múltipla (gentamicina e eritromicina) (Figura 4). Das 107 amostras negativas para a presença do gene *mecA* (*Staphylococcus aureus* Sensível a Meticilina – MSSA), 14 amostras (13,10%) apresentaram resistência somente a eritromicina, 2 amostra (1,80%) apresentou fenótipo intermediário de resistência para eritromicina e 3 amostras (2,80%) apresentaram resistência a eritromicina e gentamicina (resistência múltipla). Nenhuma das amostras MRSA ou MSSA apresentou resistencia a Vancomicina (Figura 3)

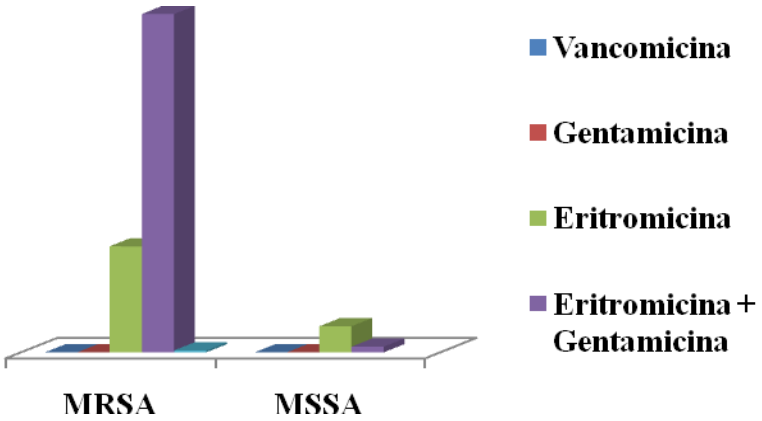

Figura 3. Perfil de resistência das amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas.
Número de amostras avaliadas pela presença do gene *mec*A testadas pela técnica de PCR

DISCUSSÃO

Staphylococcus aureus é uma das principais causas de infecções hospitalares e na comunidade, e tem sido associado com taxas de mortalidade variando de 15,0% para 60,0% (COSGROVE et al., 2003). Propagação clonal de cepas MRSA multirresistentes tem sido relatada entre hospitais geograficamente separados, e mesmo entre países diferentes, sendo que vários desses clones MRSA pandêmicos já foram identificados. No entanto, apesar do grande conhecimento sobre a disseminação clonal de MRSA, sabe-se pouco sobre a epidemiologia molecular das cepas de *Staphylococcus aureus* Sensíveis a Meticilina – MSSA (CHAVES et al., 2005).

No presente trabalho foram analisadas 1078 culturas positivas para *S. aureus* de hemoculturas, culturas de vigilância, swabs de queimaduras, secreções e outros materiais clínicos. Essas amostras foram testadas fenotipicamente segundo recomendação do CLSI (2008) pela técnica de disco difusão com os discos de oxacilina e de cefoxitina para caracterização de *Staphylococcus aureus Resistente* a Meticilina – MRSA, sendo observado que dessas amostras, 73,90% apresentaram resistência frente ao disco de Oxacilina, enquanto que 75,10% foram resistentes frente ao disco de Cefoxitina. Esses resultados podem ser corroborados por Velasco et al. (2005) que avaliaram técnicas fenotípicas de detecção de MRSA utilizando isolados clínicos, e relataram que a utilização da técnica de disco difusão com disco de cefoxitina apresentou melhor resultado na detecção de MRSA quando comparado com o disco de oxacilina, mostrando 100,0% de sensibilidade e 98,0% de especificidade. Resultados similares foram encontrados por Cauwelier et al. (2004) em que a técnica de disco difusão com disco de cefoxitina para detecção de MRSA apresentou melhores resultados em relação ao disco de oxacilina.

Segundo Chambers (1997), a resistência a meticilina tem como característica distinta seu caráter heterogêneo, com variações dos seus níveis de resistência dependendo da forma de cultivo ou do antibiótico betalactâmico escolhido. A maioria das células em cepas heterogêneas é mais sensível a baixas concentrações de antibióticos betalactâmicos com poucas células capazes de crescer em concentrações superiores do antibiótico. A grande maioria dos isolados clínicos exibe esse padrão heterogêneo de

resistência sob condições de crescimento de rotina. A expressão fenotípica codificada pelo gene *mecA* é afetada por vários fatores, incluindo pH, temperatura e osmolaridade (MARTY et al., 1987). Esses fatos podem justificar os achados do presente trabalho onde na detecção genotípica de MRSA pela presença do gene *mecA* foram detectados 47 amostras que carreavam o gene *mecA* mas fenótipo de sensibilidade frente ao disco de oxacilina, enquanto 39 amostras apresentaram fenótipo de sensibilidade aos discos de cefoxitina e oxacilina concomitantemente, mostrando sensibilidade de 88,40% e 86,0% com discos de cefoxitina e oxacilina, respectivamente e 100,0% de especificidade.

As amostras também foram avaliadas fenotipicamente quanto a perfil de resistência frente aos discos vancomicina, eritromicina e gentamicina, com todas as 1078 amostras testadas sensíveis a vancomicina. Para os demais antibióticos testados 15,30% apresentaram resistência somente a eritromicina e 48,80% a eritromicina e gentamicina simultaneamente. Dados similares foram obtidos em estudo realizado por Petrelli et al. (2008) analisando um grupo de cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de ponta de cateter em pacientes que apresentavam sinais clínicos de bacteremia e hemoculturas positivas, com 50,0% dos isolados resistentes a Eritromicina e 37,80% resistentes a Gentamicina.

Van Dijk et al. (2002) em estudo sobre a genotipagem de 226 isolados clínicos MSSA não observaram altas taxas de resistência frente à gentamicina, mas perceberam percentuais de resistência de 72,0, 11,0 e 7,0% para penicilina, eritromicina e clindamicina, respectivamente. Esses dados corroboram os resultados encontrados nesse trabalho onde dos 107 isolados MSSA (*mecA* negativo) 13,10% apresentaram percentuais de resistência somente para eritromicina e 2,80% para a eritromicina e gentamicina simultaneamente.

Em adição, das 66 amostras provenientes de hemoculturas testadas fenotipicamente quanto ao seu perfil de resistência, 12,20% foram resistentes somente a eritromicina e 37,90%foram resistentes a eritromicina e gentamicina concomitantemente e das 828 amostras provenientes de swabs nasais, 20,40% foram resistentes somente a eritromicina e 48,40% foram resistentes a eritromicina e gentamicina simultaneamente. Peck et al. (2009) em estudo caracterizando *S. aureus* isolados de hemoculturas e *swabs* nasais em um hospital coreano relataram que nos isolados de hemocultura mais de 80,0% apresentaram resistência a eritromicina e gentamicina e que em isolados de swab nasal os percentuais de resistência foram de 46,30% e 18,90%, para eritromicina e gentamicina, respectivamente.

CONCLUSÃO

O *S. aureus* pode desenvolver resistência aos betalactâmicos por: hiperprodução de Beta lactamases; Beta lactamase específica à meticilina (meticilinase) ou por alteração da proteína ligante da penicilina (PBP) codificada pelo gene mecA.

Baseado nas análises dos resultados observados no presente trabalho foi possível observar que das amostras avaliadas fenotipicamente, 75,10% eram MRSA. Estas bactérias apresentaram elevada resistência aos antibióticos sendo que se destacaram oxacilina (98,40%) e cefoxitina (100,0%).

Para determinação genotípica das 443 amostras testadas detectamos o gene *mecA* em 336 amostras (75,80%). A expressão fenotípica codificada pelo gene *mecA* é afetada por vários fatores, incluindo pH, temperatura e osmolaridade. Todas as bactérias foram sensíveis a Vancomicina.

Assim, o tratamento de infecções por MRSA torna-se complicado devido ao número limitado de opções terapêuticas seguras. O alto índice de MRSA nos leva a concluir a necessidade de investimentos em pesquisas visando ao conhecimento dos profissionais da saúde e população a fim de que tomem medidas profiláticas.

Ressalta-se como profilaxia: lavagem das mãos, racionalização do uso de antimicrobianos, desenvolvimento de um banco de dados nacional confiável e criação de laboratórios de referência para verificação da resistência e melhoria técnica dos laboratórios.

Compete aos médicos e enfermeiros instruírem os seus pacientes para que cumpram o tratamento do antibiótico receitado. A educação comunitária é essencial a fim de que a população entenda as consequências da automedicação, dosagens incorretas e interrupção do tratamento.

É necessário que haja técnicas para monitorar, detectar e tratar adequadamente pacientes com MRSA, a análise microbiológica e o uso prudente de antibióticos constituem uma barreira contra a disseminação destes microrganismos que, ao contrário, poderiam adquirir resistência a outros antibióticos elevando o seu potencial patogênico.

REFERÊNCIAS

Barret JF. MRSA – what is it, and how do we deal with the problem? Expert Opinion Therapy Targets. 2005; 9: 253-265. DOI: http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1517/14728222.9.2.253%20

Cauwelier B, Gordts B, Descheemaeckeer P. Evaluation of a disk diffusion method with cefoxitin (30 μg) for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus.* European Journal Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2004; 23: 389-392. DOI: http://dx.doi.org/10.1007/s10096-004-1130-8

Chambers HF. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. Clinical Microbiology Review. 1997;10: 781-91. http://cmr.asm.org/content/10/4/781.full.pdf+html

Chaves F, Garcia-Martinez J, Miguel S, Sanz F, Otero JR. Epidemiology and clonality of methicillin-resistant and susceptible *Staphylococcus aureus* causing bacteremia in a tertiary-care hospital in Spain. Infection Control Hospital Epidemiology. 2005; 26(2): 150-156. DOI: http://dx.doi.org/10.1086/502519

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI approved standard M100-S15. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2008.

Cosgrove S.E, Sakoulas G, Perencevich EN, Scwaber MJ, Karchmer AW, Carmeli Y. Comparison of mortality associated with Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta analysis. Clinical Infectious Diseases. 2003; 36(1): 53-9. DOI: http://dx.doi.org/10.1086/345476

Derenski, S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an evolutionary, epidemiologic, and therapeutic odyssey. Clinical Infectious Diseases 2005; 40: 562-573. DOI: http://dx.doi.org/10.1086/427701

Enrigth MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H, Spratt BG. The evolutionary history of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA). Proceedings of the National Academy of Sciences. 2002; 99(11): 7687-7692. DOI:http://dx.doi.org/10.1073%2Fpnas.122108599

Finch R. Gram-positive infections: lessons learnt and novel solutions. Clinical Microbial Infection. 2006; 12(81): 3-8. DOI: http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.01624.x

Hanssen A, Sollid JUE. *SCCmec* in staphylococci: genes on the move. FEMS Immunology and Medical Microbiology. 2006; 46: 8-20. DOI: http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-695X.2005.00009.x

Ito T, Okuma K, Ma XX, Yuzawa H, Hiramatsu K. Insights on antibiotic resistance of staphylococcus aureus from its whole genome: genomic island SCC. Drug Resistance Update. 2003; 6: 41-52. DOI: http://dx.doi.org/S1368-7646(03)00003-7

Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn JR, Washington WC, Color atlas and textbook of diagnostic

microbiology. 5th ed. Philadelphia: Lippincott; 1997.

Le Loir I, Baron F, Gautier M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. Genetetic Molecular Research. 2003; 2: 63-76. http://www.funpecrp.com.br/gmr/year2003/vol1-2/sim0009_full_text.htm

Marty V, Madiraju VS, Brunner DP, Wilkinson BJ. Effects of temperature, NaCl, and methicillin on penicillin-binding proteins, growth, peptidoglican synthesis, and autolysis in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrobial Agents Chemotherapy 1987; 31: 1727-1733. DOI: http://dx.doi.org/0066-4804/87/111727

McCulloch JA. Avaliação da funcionalidade do locus *acessory gene regulator* (*agr*) em cepas de *Staphylococcus aureus* brasileiras com suscetibilidade reduzida aos glicopeptídeos [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP; 2006.

Muto CA, Jernigan JA, Ostrowsky BE, Richet HM, Jarvis WR, Boyce JM, et al. SHEA guideline for preventing nosocomial transmission of multidrug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* and Enterococcus. Infection Control Hospital Epidemiology. 2003; 24(5): 362-386. DOI: http://dx.doi.org/10.1086/502213

Peck KR, Baek JY, Song J, Ko KS. Comparison of genotypes and enterotoxina genes between *Staphylococcus aureus* isoales from blood and nasal colonizers in a Korean hospital. Journal Korean Medical Sciences. 2009; 24(4): 5858-591. DOI:http://dx.doi.org/10.3346%2Fjkms.2009.24.4.585

Petrelli D, Repetto A, D'ercole S, Rombini S, Ripa S, Prenna M. et al. Analysis os Methicillin-Susceptible and Methicillin-Resistant biofilm-forming *Staphylococcus aureus* from catheter infections isolated in a large Italian hospital. Journal Medical Microbiology. 2008; 57: 364-372. DOI: http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.47621-0

Reinert C, Caracterização do cassete cromossômico estafilocócico (SCCmec) de cepas endêmicas nosocomiais de *S. aureus* resistentes a meticilina e vancomicina. [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP; 2004.

Van Dijk Y, Wielders CLC, Fluit AC, Paawn A, Diepersloot RJA, Mascini EMG. Genotyping of clinical Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus isolates in a Dutch teaching hospital. Journal Clinical Microbiology. 2002; 40(2): 663-665. DOI: http://dx.doi.org/10.1128%2FJCM.40.2.663-665.2002

Velasco D, Tomas MT, Cartelle M, Beceiro A, Perez A, Molina F, et al. Evaluation of different methods for detecting methicillin (oxacillin) resistance in *Staphylococcus aureus*. Journal Antimicrobiol Chemotherapy. 2005; 55: 379-382. DOI: http://dx.doi.org/10.1093/jac/dki017