







UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Susceptibilidade a antimicrobianos em isolados clínicos  
de *Staphylococcus aureus* portadores dos genes *mecA* e  
*lukFS-PV* na região Norte de Portugal

Dissertação submetida à Universidade da Beira Interior para  
obtenção do grau de Mestre em Bioquímica

Nuno José Alves Silva

Agosto 2009



**Instituição de acolhimento:**

Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto

**Orientador:**

Doutor Rúben Fernandes

Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto

Departamento de Química e das Biomoléculas

Vila Nova de Gaia

**Co-Orientadora:**

Doutora Cândida Tomaz

Universidade da Beira Interior

Departamento de Química

Covilhã



*Aos meus pais e amigos...*







# Índice

Abstract .....	XIX
Resumo .....	XXI
Objectivo.....	XXIII
Hipótese.....	XXV
Abreviaturas.....	XXVII
Abreviaturas dos agentes antimicrobianos .....	XXIX

## CAPÍTULO 1:

<b>1. Introdução .....</b>	<b>5</b>
1.1. Interação antimicrobiano-bactéria.....	7
1.1.1. Mecanismo de acção dos antimicrobianos.....	7
1.1.2. Mecanismos de resistência aos antimicrobianos .....	7
1.2. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	9
1.2.1. Evolução da estirpe.....	9
1.2.2. Factores de virulência e patogénese .....	11
1.3. <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à Penicilina .....	14
1.4. <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à Meticilina.....	16
1.4.1. Emergência de <i>Staphylococcus aureus</i> resitente à Vancomicina .....	19
1.4.2. <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à Meticilina comunitários (CA-MRSA) e hospitalares (HA-MRSA).....	21
1.5. Leucocidina <i>Panton–Valentine</i> .....	24
1.6. Epidemiologia.....	26
1.6.1. Europa .....	26
1.6.2. Portugal.....	29
1.6.3. Transmissão .....	30
1.6.4. Prevenção .....	31

## CAPÍTULO 2:

<b>2. Materiais e métodos .....</b>	<b>39</b>
2.1. Técnicas de genética molecular: .....	39
2.1.1.Extracção de DNA .....	40
2.1.2. Amplificação de genes por mPCR .....	41

2.1.3. Revelação dos produtos de PCR por electroforese .....	41
2.1.4. Tampões e soluções .....	42
2.2. Método de susceptibilidade aos antimicrobianos: Método de difusão de disco Kirby-Bauer .....	45
2.2.1. Antimicrobianos .....	45
2.2.2. Meios de cultura .....	47
2.3. Tratamento estatístico .....	48

### **CAPÍTULO 3:**

<b>3. Resultados .....</b>	<b>55</b>
3.1. Caracterização genética .....	55
3.1.1. Caracterização por unidade hospitalar .....	56
3.1.2. Caracterização por sexo do paciente .....	57
3.2. Susceptibilidade a antimicrobianos .....	58
3.2.1. MSSA/MRSA .....	59
3.2.2. PVL-/PVL+ .....	69

### **CAPÍTULO 4:**

<b>4. Discussão .....</b>	<b>85</b>
4.1. Caracterização genética .....	85
4.2. Susceptibilidade a antimicrobianos .....	86
4.2.1. MSSA/MRSA .....	87
4.2.2. PVL-/PVL+ .....	91

### **CAPÍTULO 5:**

<b>5. Conclusão .....</b>	<b>99</b>
---------------------------	-----------

<b>6. Bibliografia .....</b>	<b>105</b>
------------------------------	------------

# Índice de tabelas

Tabela 1. Factores de virulência seleccionados do <i>S. aureus</i> , (adaptado de Gordon & Lowy, 2008). .....	11
Tabela 2. Classificação dos tipos de SCCmec, (adaptado de Maltezou & Giamarellou, 2006 e Lencastre, Oliveira, & Tomasz, 2007). .....	18
Tabela 3. Características que distinguem as HA-MRSA e CA-MRSA, (adaptado de Levenhagen, 2008 e Matouskova & Janout, 2008). .....	22
Tabela 4. Resultados para os isolados MRSA e VRSA entre os anos de 2000 e 2008 (Dados do relatório do EARSS de 2007). .....	29
Tabela 5. Composição das soluções I e II para a extracção de DNA. ....	40
Tabela 6. Primers e condições de PCR utilizadas (36). .....	41
Tabela 7. Componentes com a respectiva concentração utilizados para a reacção de PCR (37). .....	41
Tabela 8. Resumo das classes dos agentes antimicrobianos utilizados, bem como das quantidades presentes em cada disco usado para o teste de susceptibilidade (47). .....	46
Tabela 9. Percentagem da frequência dos genes <i>mecA</i> e <i>lukFS-PV</i> nas regiões de Barcelos e Matosinhos. ....	56
Tabela 10. Percentagens de isolados MSSA e MRSA resistentes aos agentes antimicrobianos da classe das Penicilinas. ....	60
Tabela 11. Percentagens de isolados MSSA e MRSA resistentes aos agentes antimicrobianos da classe das Cefalosporinas, Cefamicinas e Carbapenemos. ....	61
Tabela 12. Percentagens de isolados MSSA e MRSA resistentes aos agentes antimicrobianos da classe dos Glicopéptidos. ....	62
Tabela 13. Percentagens de isolados MSSA e MRSA resistentes aos agentes antimicrobianos da classe dos Aminoglicosídeos, Macrolídeos, Tetraciclina e Oxazolidinonas. ....	64
Tabela 14. Percentagens de isolados MSSA e MRSA resistentes aos agentes antimicrobianos da classe das Quinolonas e Ansamícinas. ....	65

Tabela 15. Percentagens de isolados MSSA e MRSA resistentes aos agentes antimicrobianos da classe dos Nitrofuranos e Sulfonamidas. ....	67
Tabela 16. Percentagens de isolados MSSA e MRSA resistentes ao agente antimicrobiano da classe das Lincosamidas e resistência induzida desta pela eritromicina. ....	68
Tabela 17. Percentagens de isolados PVL- e PVL+ resistentes aos agentes antimicrobianos da classe das Penicilinas.....	70
Tabela 18. Percentagens de isolados PVL- e PVL+ resistentes aos agentes antimicrobianos das classes das Cefamicinas e Carbapenemos e Glicopéptidos. ....	71
Tabela 19. Percentagens de isolados PVL- e PVL+ resistentes aos agentes antimicrobianos da classe dos Glicopéptidos. ....	73
Tabela 20. Percentagens de isolados PVL- e PVL+ resistentes aos agentes antimicrobianos das classes dos Aminoglicosídeos, Macrolídeos, Tetraciclina e Oxazolidinonas. ....	74
Tabela 21. Percentagens de isolados PVL- e PVL+ resistentes aos agentes antimicrobianos das classes das Quinolonas e Ansamicinas.....	75
Tabela 22. Percentagens de isolados PVL- e PVL+ resistentes aos agentes antimicrobianos das classes dos Nitrofuranos e Sulfonamidas.....	77
Tabela 23. Percentagens de isolados PVL- e PVL+ resistentes ao agente antimicrobiano da classe das Lincosamidas e resistência induzida desta pela Eritromicina. ....	78
Tabela 24. Grau de frequência de isolados resistentes relativamente à classe de agentes antimicrobianos utilizada.....	86
Tabela 25. Consumo de 2007, em volume, de antimicrobianos, por substância activa, em Ambulatório, no âmbito do Mercado Total. Dados gentilmente fornecidos pela INFARMED. ...	90

# Índice de figuras

Figura 1. Mecanismos de acção dos antimicrobianos e mecanismos de resistência aos mesmos, (adaptado de Fernandes, 2008). .....	8
Figura 2. Factores patogénicos do <i>S. aureus</i> . TSST-1, toxina 1 da síndrome do choque tóxico (adaptado de Gordon & Lowy, 2008). .....	12
Figura 3. Operação <i>blaR1-blal-blaZ</i> do <i>S. aureus</i> e a via de tradução de sinal para expressão da $\beta$ -lactamase BlaZ em <i>S. aureus</i> , (adaptado de Walsh, 2003 e Bryskier, 1999). .....	14
Figura 4. Operação <i>mecR1-mecI-mecA</i> do <i>S. aureus</i> e a via de tradução de sinal para expressão da PBP2a que confere resistência à Meticilina em <i>S. aureus</i> , (adaptado de Walsh, 2003). .....	17
Figura 5. Organização genética dos tipos de SCCmec de I a VI, (adaptado de Lencastre, Oliveira, & Tomasz, 2007). .....	18
Figura 6. Cluster do gene <i>vanA</i> que confere a resistência à vancomicina, (adaptado de Hughes, 2003). .....	20
Figura 7. Modelo para a emergência dos CA-MRSA com PVL, (adaptado de Boyle-Vavra & Daum, 2007 e Levenhagen, 2008). .....	23
Figura 8. A - Modelo da necrose tecidual mediada pela PVL. B - Mecanismo proposto por Boyle-Vavra & Daum; 2007, pelo qual a PVL pode induzir a apoptose dos PMNs, (adaptado de Boyle-Vavra & Daum, 2007). .....	25
Figura 9. Prevalência de isolados de <i>S. aureus</i> resistentes à Meticilina a nível Europeu em 2007 (Dados do relatório do EARSS de 2007). .....	27
Figura 10. Prevalência de isolados de <i>S. aureus</i> resistentes à Vancomicina a nível europeu em 2007 (Dados do relatório do EARSS de 2007). .....	28
Figura 11. Representação gráfica da percentagem de predominância de MRSA e VRSA em Portugal ao longo dos últimos anos. (Dados do relatório do EARSS de 2007). .....	30
Figura 12. Localização das unidades hospitalares de onde foram recolhidas os isolados clínicos em estudo. ....	39
Figura 13. Gel de agarose gel a 0,7 % revelado com Brometo de etídio. Marcador: DNA Marker Lambda Hind III / phiX174 Hae III. ....	55
Figura 14. Percentagem da frequência dos genes <i>mecA</i> e <i>lukFS-PV</i> na amostra. ....	56

Figura 15. Percentagem de frequência dos genes <i>mecA</i> e <i>lukFS-PV</i> relativamente ao sexo dos pacientes.....	57
Figura 16. Placas de Petri utilizadas para o teste de susceptibilidade a antimicrobianos onde se pode observar A- uma total resistência do isolado aos antimicrobianos utilizados; B- susceptibilidade do isolado aos antimicrobianos utilizados; C- susceptibilidade e resistência do isolado, dependendo dos antimicrobianos utilizados; D- susceptibilidade e resistência do isolado, dependendo dos antimicrobianos utilizados.....	59
Figura 17. Percentagens de isolados MSSA e MRSA resistentes aos agentes antimicrobianos da classe das Penicilinas.....	60
Figura 18. Percentagens de isolados MSSA e MRSA resistentes aos agentes antimicrobianos da classe das Cefalosporinas, Cefamicinas e Carbapenemos. ....	62
Figura 19. Percentagens de isolados MSSA e MRSA resistentes aos agentes antimicrobianos da classe dos Glicopéptidos. ....	63
Figura 20. Percentagens de isolados MSSA e MRSA resistentes aos agentes antimicrobianos da classe dos Aminoglicosídeos, Macrolídeos, Tetraciclina e Oxazolidinonas.....	64
Figura 21. Percentagens de isolados MSSA e MRSA resistentes aos agentes antimicrobianos da classe das Quinolonas e Ansamínicos. ....	66
Figura 22. Percentagens de isolados MSSA e MRSA resistentes aos agentes antimicrobianos da classe dos Nitrofuranos e Sulfonamidas .....	67
Figura 23. Percentagens de isolados MSSA e MRSA resistentes ao agente antimicrobiano da classe das Lincosamidas e indução da resistência pela Eritromicina.....	68
Figura 24. A- Caso em que se observa indução da resistência da Clindamicina pela Eritromicina; B- Caso em que não se observa indução da resistência da Clindamicina pela Eritromicina; À direita situa-se o antimicrobiano Clindamicina e à esquerda o antimicrobiano Eritromicina....	69
Figura 25. Percentagens de isolados PVL- e PVL+ resistentes aos agentes antimicrobianos da classe das Penicilinas.....	70
Figura 26. Percentagens de isolados PVL- e PVL+ resistentes aos agentes antimicrobianos das classes das Cefalosporinas, Cefamicinas e Carbapenemos.....	72
Figura 27. Percentagens de isolados PVL- e PVL+ resistentes aos agentes antimicrobianos dos Glicopéptidos. ....	73

Figura 28. Percentagens de isolados PVL- e PVL+ resistentes aos agentes antimicrobianos das classes dos Aminoglicosídeos, Macrolídeos, Tetraciclina e Oxazolidinonas.. .....	74
Figura 29. Percentagens de isolados PVL- e PVL+ resistentes aos agentes antimicrobianos das classes das Quinolonas e Ansamínicos.....	76
Figura 30. Percentagens de isolados PVL- e PVL+ resistentes aos agentes antimicrobianos das classes dos Nitrofuranos e Sulfonamidas.....	77
Figura 31. Percentagens de isolados PVL- e PVL+ resistentes ao agente antimicrobiano da classe das Lincosamidas e resistência induzida desta pela Eritromicina .....	78



# Abstract

---

The emergence of resistance to antibiotics used in clinical practice is something that concerns scientific community. Every day is documented new resistance and new strains are discovered possessing resistance genes previously unknown. One of the most worrying issue is the case of Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). The MRSA is worldwide distributed and is, characteristically, highly resistant to various antibiotics. Additionally, this infectious agent has the ability to bear several virulence genes. Thus, the decrease in immunological defence of the host caused by the virulence factors, together with reduced susceptibility to chemotherapeutic agents, makes the virulence genes carrier MRSA an infectious agent much feared.

In this context, the purpose of the present study was to determine the frequency of MRSA isolates in two hospitals in Northern Portugal during the period of 6 months. Therefore it was used a *Multiplex Polymerase Chain Reaction* (mPCR) method for the simultaneous detection of the gene that confers resistance to Methicillin, the *mecA* gene, and the genes that are responsible for the virulence factor *Panton-Valentine Leukocidin*, *lukF-PVL* and *lukS-PVL* (*lukFS-PVL*). The cluster *lukFS-PVL* was amplified in a single mPCR product. It was also performed a comparative study of susceptibility to several antibiotics of different classes, among the isolates not possessing the *mecA* gene and those that possess the *mecA* gene and between the isolates not possessing the *lukFS-PVL* gene and those that possess it. The antimicrobial susceptibility testing was performed by the disc diffusion Kirby-Bauer method according to the North American *Clinical Laboratory Standards Institute*.

The results obtained indicated a frequency of approximately 50% of MRSA and a frequency of 9% of isolates carrying the *lukFS-PVL* gene. Regarding the susceptibility patterns of isolates under study it was concluded that for most antimicrobial agents used MRSA strains reveal to be resistant to more antimicrobials than the isolates that lack *mecA* gene. Nevertheless, low frequencies of resistance or complete susceptibility to some antimicrobials were also observed. These findings do not have one easy justification. In fact, the explanation is complex and multifactorial. It may be involved biochemical and molecular mechanisms as a result of the presence of other genes in the neighbourhood of *mecA*, whose transcription, recombination and transfer may occur simultaneously to this gene. Could also be indicated some clinical reasons. For example, it may be pointed the high pharmacological pressure caused by the use of several drugs often complicated with its misuse.

Resistance to antimicrobial agents has several implications such as costs at hospitals and failure to treat infections caused by resistant microorganisms. Thus, it is crucial to continue and enhance efforts to prevent transmission of MRSA with strategies for nosocomial infection control, to develop drug policies, to introduce health education and promotion actions in the community. Finally it is also urgent to focus on epidemiological monitoring studies and on research and development of new therapeutic molecules that can slow the spread of these pathogens around the world.

# Resumo

---

O aparecimento de resistência a antimicrobianos utilizados na prática clínica é algo que preocupa a comunidade científica em geral. Diariamente são documentadas novas resistências e são descobertas novas estirpes possuidoras de genes de resistência anteriormente desconhecidos. Um dos casos mais preocupantes é o caso do *Staphylococcus aureus* resistente à Meticilina (MRSA). O MRSA, além de apresentar uma distribuição muito ampla a nível mundial possui, caracteristicamente, uma elevada resistência a diversos antimicrobianos. Adicionalmente, este agente infeccioso tem a possibilidade de ser portador de diversos genes de virulência. Assim, a diminuição das defesas imunológicas do hospedeiro causada pelos factores de virulência, juntamente com a reduzida susceptibilidade aos agentes quimioterapêuticos, torna o MRSA portador de genes de virulência um agente infeccioso muito temido.

Neste contexto, no presente estudo procedeu-se à determinação da frequência de MRSA em isolados de duas unidades hospitalares do Norte de Portugal durante o período de 6 meses. Para tal, através da técnica *Multiplex Polymerase Chain Reaction* (mPCR) procedeu-se à detecção simultânea do gene que confere a resistência à Meticilina, o *mecA*, e dos genes que são responsáveis pelo factor de virulência *Panton-Valentine Leukocidin*, *lukF-PVL* e *lukS-PVL* (*lukFS-PVL*). O cluster *lukFS-PVL* foi amplificado num único produto de mPCR. Procedeu-se também ao estudo comparativo da susceptibilidade a vários antimicrobianos, de diferentes classes, entre os isolados não possuidores do gene *mecA* e os isolados possuidores do gene *mecA* e entre os isolados não possuidores do gene *lukFS-PVL* e os isolados possuidores do gene *lukFS-PVL*. Para tal, foi utilizado o método de difusão de disco Kirby-Bauer, comparando-se a frequência de isolados resistentes entre os vários isolados em estudo.

Foram obtidos resultados que indicam uma frequência de aproximadamente 50% de isolados MRSA e uma frequência de 9% de isolados portadores do gene *lukFS-PVL*, na amostra. Relativamente aos perfis de susceptibilidade dos isolados em estudo, concluiu-se que para a maioria dos antimicrobianos utilizados os isolados portadores do gene *mecA* apresentavam mais resistências que os isolados não portadores do gene *mecA*. Esta situação não terá, certamente, uma única e fácil justificação. De facto, a explicação será complexa e multifactorial. Poderão estar envolvidos mecanismos bioquímicos e moleculares relativos a outros genes na vizinhança dos *mecA* cujas transcrição, recombinação e transferência poderão ocorrer simultaneamente. Poderão ser apontadas, também, razões de ordem clínica como, por

exemplo, a grande pressão terapêutica com diversos fármacos que muitas vezes é complicada com a má utilização destes. No entanto, foram também observadas frequências de resistência baixas ou praticamente nulas para alguns antimicrobianos.

A resistência a antimicrobianos tem várias implicações como, por exemplo, os custos a nível hospitalar e a incapacidade de tratar as infecções causadas pelos microrganismos resistentes. Assim, é necessário continuar e melhorar o esforço na prevenção da transmissão do MRSA com estratégias de controlo da infecção hospitalar, de políticas do medicamento, de educação para a saúde das populações e apostar em estudos de controlo epidemiológico e na investigação e desenvolvimento de novas moléculas terapêuticas de modo a abrandar a tendência de propagação destes microrganismos patogénicos por todo o mundo.

# Objectivo

---

O presente estudo teve como objectivo a caracterização genética e a avaliação da susceptibilidade a vários antimicrobianos pertencentes a diferentes classes de isolados de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). Esses isolados foram provenientes de duas unidades hospitalares da região Norte de Portugal. Para a caracterização genética utilizou-se a técnica da reacção da polimerase em cadeia com múltiplos primers ou mPCR (do Inglês *Multiplex Polymerase Chain Reaction*) com o objectivo de amplificar os genes *mecA* e *lukFS-PV*. Para a avaliação da susceptibilidade aos vários antimicrobianos utilizou-se o método de difusão de disco Kirby-Bauer. Posteriormente, procedeu-se à análise estatística da média das frequências entre os isolados resistentes não portadores nem do gene *mecA*, nem *lukFS-PVL* e os isolados resistentes portadores do gene *mecA* (Capítulo 3.2.1.) ou *lukFS-PV* (Capítulo 3.2.2.).



# Hipótese

---

A hipótese a ser testada no presente estudo é que a frequência de isolados MRSA ou não portadores do gene *lukFS-PV* (PVL-) resistentes a cada um dos antimicrobianos utilizados, é maior que a frequência dos isolados *Staphylococcus aureus* sensíveis à Meticilina (MSSA) ou portadores do gene *lukFS-PV* (PVL+) resistentes relativamente a cada um desses agentes antimicrobianos.



# Abreviaturas

---

- ACME- elemento móvel do catabolismo da arginina
- CA-MRSA - *Community-acquired Staphylococcus aureus* resistente à Meticilina
- CHIPS- proteína inibitória de quimiotaxia dos *Staphylococcus*
- CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*
- dNTPs- Desoxirribonucleotídeos fosfatados
- Eap- Proteína de aderência extracelular
- EARSS - Sistema Europeu de Vigilância à Resistência Antimicrobiana
- EDTA- Ácido etilenodiaminotetra-acético.
- EtBr - Brometo de etídio
- FDA - *Food and Drug Administration*
- HA-MRSA - *Hospital-acquired Staphylococcus aureus* resistente à Meticilina
- HPH - Hospital Pedro Hispano
- HSMH - Hospital de Santa Maria Maior
- MDR - Resistência a vários antimicrobianos
- mPCR - *Multiplex Polymerase Chain Reaction*
- MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente à Meticilina
- MSCRAMMs- componentes microbianos de superfície reconhecedores de matrizes moleculares adesivas
- MSSA - *Staphylococcus aureus* sensível à Meticilina
- NaOH - Hidróxido de sódio
- PBP – Proteína de ligação à penicilina
- PMN - Células polimorfonucleares
- PRSA - *Staphylococcus aureus* resistente à Penicilina
- PVL- - Isolados não portadores do gene *lukFS-PV*
- PVL+ - Isolados portadores do gene *lukFS-PV*
- PVL- Leucocidina *Panton- Valentine*
- S. aureus* - *Staphylococcus aureus*
- SCCmec - *Staphylococcal Cassette Chromosome mec*
- SDS - Dodecil sulfato de sódio
- SVC - colónia de *Staphylococcus aureus* variável
- TAE - TRIS-Ácido acético-EDTA

TBE - TRIS-Ácido bórico-EDTA

TE – TRIS.EDTA

TRIS- *Tris*(hidroximetil)aminometano

TSA - *Tryptic soy agar*

TSB - *Tryptic soy broth*

TSST-1 - toxina 1 da síndrome do choque tóxico

VISA - *Staphylococcus aureus* com susceptibilidade intermédia à Vancomicina

VRSA - *Staphylococcus aureus* resistente à Vancomicina

# Abreviaturas dos agentes antimicrobianos

---

AMC- Amoxicilina/Ácido clavulânico  
AMP- Ampicilina  
AMS- Ampicilina/Sulbactamo  
AZM- Azitromicina  
CEC- Cefaclor  
CIP- Ciprofloxacina  
CLR- Claritromicina  
CN- Gentamicina  
CRO- Ceftriaxona  
CTX- Cefotaxima  
CXM- Cefuroxima  
DA- Clindamicina  
E- Eritromicina  
F- Nitrofurantoina  
FOX- Cefoxitina  
IPM- Imipenem  
LEV- Levofloxacina  
LZD- Linezolid  
MXF- Moxifloxacina  
NOR- Norfloxacina  
OX- Oxacilina  
P- Benzilpenicilina/Penicilina G  
RD- Rifampicina  
SXT- Trimetoprim/Sulfametoxazole  
TCT- Tetraciclina  
TEC- Teicoplanina  
TOB- Tobramicina  
VA- Vancomicina







**CAPÍTULO** 

---

**Introdução**



## **CAPÍTULO 1:**

<b>1. Introdução .....</b>	<b>5</b>
1.1. Interação antimicrobiano-bactéria.....	7
1.1.1. Mecanismo de acção dos antimicrobianos.....	7
1.1.2. Mecanismos de resistência aos antimicrobianos .....	7
1.2. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	9
1.2.1. Evolução da estirpe.....	9
1.2.2. Factores de virulência e patogénese .....	11
1.3. <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à Penicilina .....	14
1.4. <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à Meticilina.....	16
1.4.1. Emergência de <i>Staphylococcus aureus</i> resitente à Vancomicina .....	19
1.4.2. <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à Meticilina comunitários (CA-MRSA) e hospitalares (HA-MRSA).....	21
1.5. Leucocidina <i>Panton–Valentine</i> .....	24
1.6. Epidemiologia.....	26
1.6.1. Europa .....	26
1.6.2. Portugal.....	29
1.6.3. Transmissão .....	30
1.6.4. Prevenção .....	31



# 1. Introdução

---

Como que se de uma regra se tratasse, sempre que um novo agente antimicrobiano é introduzido na prática clínica, primeiro observa-se a cura, seguida de reacções que não se esperavam obter, e por fim o aparecimento de estirpes resistentes ao novo agente antimicrobiano (1).

O objectivo da terapia antimicrobiana é o de conseguir a erradicação de microrganismos infecciosos de um modo seguro para os pacientes, tentando ao mesmo tempo minimizar o aparecimento e propagação de resistência aos agentes antimicrobianos utilizados (1). No entanto, nem sempre esta situação ocorre, desde a introdução de agentes antimicrobianos no arsenal terapêutico contra as doenças infecciosas, os microrganismos têm desenvolvido meios de defesa que os protegem contra estes agentes antimicrobianos. O desenvolvimento da resistência aos agentes antimicrobianos, em doses terapêuticas, depende da complexidade química e do material genético do microrganismo. Quando a resistência tem um fundo genético, este mecanismo de defesa encontra-se codificado num gene que pode ser plasmídico ou cromossómico (1; 2).

É neste contexto que surge a epidemiologia molecular da resistência aos antimicrobianos. Uma ciência que constitui um campo de estudo híbrido que integra várias valências como a medicina clínica, epidemiologia, microbiologia, genética molecular, biologia populacional, matemática, bioinformática, bioquímica entre outras, que utilizam vários métodos envolvidos na compreensão da génese e propagação das doenças, bem como na identificação dos agentes causadores dessas mesmas doenças (3).



## **1.1. Interação antimicrobiano-bactéria**

### **1.1.1. Mecanismo de ação dos antimicrobianos**

Os mecanismos de ação dos antimicrobianos podem ser agrupados em classes de acordo com os seus alvos na superfície da célula bacteriana ou no seu interior (Figura 1). Os principais grupos de alvos são: a) Biossíntese da parede celular bacteriana, bloqueada pelos  $\beta$ -lactâmicos (Penicilinas, Cefalosporinas, Cefamicinas e Carbapenemos) e Glicopéptidos que inibem fases necessárias para a ligação cruzada do peptidoglicano; b) Ribossomas, bloqueados na subunidade 30S pelos Aminoglicosídeos e Tetraciclina e na subunidade 50S pelos Macrólidos e Lincosamidas ou em ambas pelas Oxazolidinonas; c) DNA, em que a sua síntese é inibida pelas Quinolonas através da sua ligação a enzimas como a DNA girase e Topoisomerase IV, ou a sua transcrição a RNA pelas Ansamícinas através da ligação do antimicrobiano à RNA polimerase; d) Via do folato, essencial para fornecer os monómeros necessários à síntese de DNA, inibida pelas Sulfonamidas; e) Ciclo de Krebs, inibido pelos Nitrofuranos através de uma tripla ação inibitória na acetilcoenzima A, ácido cítrico e ácido oxaloacético (1; 2).

### **1.1.2. Mecanismos de resistência aos antimicrobianos**

Todas as características da bactéria, incluindo a resistência aos antimicrobianos, são determinadas pelo seu genoma, caracterizado pelo cromossoma ou nucleóide, pelos plasmídeos e pelos fagos lisogénicos. A resistência pode ser natural (intrínseca) ou adquirida (extrínseca) (1).

A resistência intrínseca é a resistência natural que a célula bacteriana tem para alguns antimicrobianos. Por exemplo, os *Mycoplasma* spp. não possuem parede celular, logo são naturalmente resistentes aos  $\beta$ -lactâmicos. Os mecanismos através dos quais as células bacterianas poderão ser naturalmente resistentes podem ser divididos em diferentes grupos (Figura 1): a) destruição ou inativação dos antimicrobianos por enzimas; b) alteração do alvo do antimicrobiano; c) redução da permeabilidade da superfície celular ou bloqueio do mecanismo pelo qual o antimicrobiano entra na célula; d) remoção do antimicrobiano da célula por um mecanismo de efluxo; e) síntese de um substituinte para o passo metabólico inibido pelo antimicrobiano (1; 2; 4).

A resistência extrínseca, para além dos mecanismos referidos anteriormente, também inclui: a) mutação e selecção (evolução vertical) e b) transferência e retenção de fragmentos de material genético entre diferentes espécies ou estirpes (evolução horizontal) (1; 2; 4).

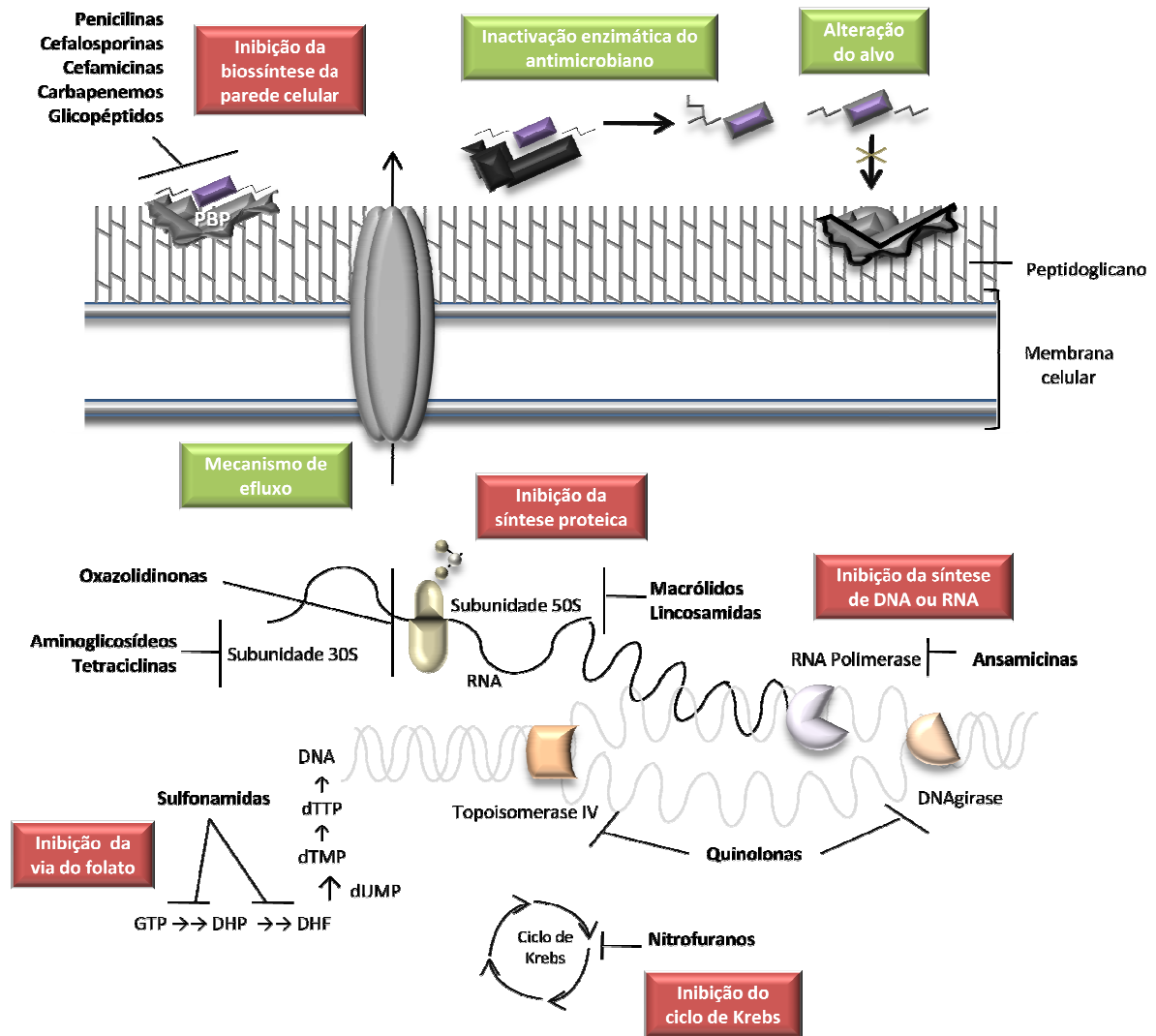


Figura 1. Mecanismos de acção dos antimicrobianos e mecanismos de resistência aos mesmos, (adaptado de Fernandes, 2008).

## **1.2. *Staphylococcus aureus***

O *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) é um tipo de bactéria transportada na pele e nariz (membranas mucosas) de pessoas e animais saudáveis, onde a constante humidade, temperatura, e vários nutrientes são fornecidos pelo hospedeiro. Devido ao seu estilo de vida parasitário, várias vias metabólicas de síntese de vitaminas estão suprimidas nesta estirpe. Cerca de um terço dos seres humanos encontra-se colonizado com *S. aureus* no nariz, no entanto, este não provoca infecção. A colonização assintomática por *S. aureus* é muito mais frequente que a infecção. Todavia, quando este consegue entrar no interior do corpo humano pode despoletar um mecanismo infeccioso, em que os locais de colonização servem como um reservatório para o alastramento deste agente (3; 5).

### **1.2.1. Evolução da estirpe**

O *S. aureus* possui três características que o tornam díspar entre a maioria dos outros microrganismos. Ele pode expressar uma grande variedade de factores de virulência, tem a capacidade de desenvolver e expandir resistência a um grande espectro de drogas antimicrobianas, e encontra-se proeminentemente em distintos ambientes, tais como hospitalar e comunitário (6).

Nada documenta melhor a extraordinária capacidade adaptativa do *S. aureus* do que a sua resposta à introdução dos agentes antimicrobianos na prática clínica. A grande mortalidade causada pelo *S. aureus* foi travada com a ajuda da Penicilina por volta dos anos 40. No entanto, este abrandamento da mortalidade foi de pouca duração pois, rapidamente surgiu a estirpe resistente à Penicilina (PRSA) que produzia a enzima  $\beta$ -lactamase capaz de degradar a Penicilina. No espaço de 10 anos, 90% das estirpes causadoras de infecção em ambiente hospitalar eram resistentes à Penicilina. Este evento foi resultado das características epidemiológicas do plasmídeo portador o gene da  $\beta$ -lactamase entre todo o tipo de estirpes de *S. aureus* (7; 8).

Posteriormente, a Meticilina, um  $\beta$ -lactâmico insensível à acção hidrolítica da  $\beta$ -lactamase, proporcionou, no final dos anos 50, um novo tratamento para as infecções provocadas pelas PRSA. No entanto, o *S. aureus* resistente à Meticilina (MRSA), que é simultaneamente resistente a todos os  $\beta$ -lactâmicos, incluindo penicilinas e cefaloporinas, rapidamente emergiu

a partir de 1961. Primeiro, em ambientes de cuidados de saúde locais e posteriormente, espalhando-se a nível mundial, o MRSA tornou-se um dos agentes causadores de infecções em ambientes hospitalares mais importantes. Como resultado da sua capacidade de ligação a material protésico e cateteres, é um grande agente patogénico em situações pós-cirúrgicas podendo causar também infecções em pacientes que necessitem de diálise (1; 3; 8; 9; 10).

Para o tratamento das infecções causadas por MRSA, a Vancomicina é o antimicrobiano de escolha e muitas vezes de último recurso. Mas sem surpresas, recentemente foi desenvolvida resistência a este antimicrobiano. As estirpes *S. aureus* com susceptibilidade intermédia à Vancomicina (VISA) foram isoladas pela primeira vez em 1997. Posteriormente, foi descrita a emergência de estirpes similares em vários países. Em 2002, foi descoberto nos Estados Unidos, *S. aureus* resistente à Vancomicina (VRSA), deixando assim de haver um antimicrobiano que seja universalmente eficaz contra o *S. aureus*. Por este motivo, futuras terapias para as infecções por *S. aureus* têm de depender menos da eficácia de apenas um antimicrobiano e mais na combinação de vários (9). O aparecimento do VRSA foi acompanhado pelo isolamento de MRSA de infecções adquiridas na comunidade entre indivíduos saudáveis com poucos, ou nenhuns, factores de risco associados a cuidados de saúde. Este aparecimento representa uma dramática mudança na epidemiologia do MRSA, uma vez que as infecções por *S. aureus* na comunidade eram causadas por *S. aureus* sensíveis à Meticilina (MSSA) (8; 9).

Esta epidemia de infecções, por MRSA na comunidade, tornou os  $\beta$ -lactâmicos agentes terapêuticos relativamente ineficazes quando, até então, eram considerados como os antimicrobianos de primeira escolha por serem bastante eficazes contra as infecções por *S. aureus* na comunidade. Apesar de estas infecções serem mais susceptíveis a antimicrobianos não  $\beta$ -lactâmicos como, por exemplo, a Clindamicina, Trimetoprim/Sulfametoxazole e Doxiciclina, do que as infecções por MRSA hospitalares, estas também tendem a ser mais virulentas. Apesar de a maioria das doenças causadas por MRSA na comunidade serem infecções de pele ou de tecidos moles, estas também provocam doenças mortais como a pneumonia necrótica ou sépsis grave (9).

## 1.2.2. Factores de virulência e patogénese

O arsenal dos factores de virulência do *S. aureus* é extenso. Além disso, vários produtos secretados e estruturais desempenham um papel importante na patogénese da infecção (Figura 2). Alguns exemplos desses factores de virulência encontram-se descritos na tabela 1 (11).

Tabela 1. Factores de virulência seleccionados do *S. aureus*, (adaptado de Gordon & Lowy, 2008).

Mecanismos de virulência	Factores seleccionados	Genes	Síndromes clínicas associados
Envolvidos na aderência	MSCRAMMs (ex. factores de aglomeração, proteínas de ligação à fibronectina, colagénio e proteínas de ligação à sialoproteína óssea)	<i>clfA, clfB, fnbA, fnbB, cna, sdr, bbp</i>	Endocardite, osteomielite e infecções de dispositivos protésicos e cateteres
Envolvidos na persistência	Acumulação de biofilme (ex. adesão intracelular polissacárida), pequenas colónias variáveis e persistência intracelular	locus <i>ica</i> , mutação <i>hemB</i>	Infecções recorrentes, fibrose cística e as síndromes descritas anteriormente
Envolvidos na fuga/destruição das defesas do hospedeiro	Leucocidinas (ex. PVL e toxina $\gamma$ ), polissacáridos capsulares (ex. 5 e 8), proteína A, CHIPS, Eap e modulinas solúveis em fenol	<i>lukS-PV, lukFPV, hlg, cluster cap5 e 8, spa, chp, eap</i> e cluster <i>psm-<math>\alpha</math></i>	Infecções de pele invasivas e pneumonia necrotizante (associadas a MRSA comunitários com PVL) e abscessos (associado a polissacáridos capsulares)
Envolvidos na invasão/penetração de tecidos	Proteases, lipases, nucleases, liase hialuronato, fosfolipase C e metaloproteases (elastase)	<i>V8, hysA, hla, plc, sepA</i>	Destruição de tecidos e infecções metastáticas
Envolvidos em doenças mediadas por toxinas e/ou sépsis	Enterotoxinas, síndrome do choque tóxico, toxinas esfoliativas A e B (ETA e ETB), toxina $\alpha$ , péptido-glicano e ácido lipóico	<i>sea-q, tstH, eta, etb, hla</i>	Intoxicação alimentar, síndrome do choque tóxico, síndrome da pele escaldada, impetigo bolhoso e sépsis
Com fraco papel na virulência	Coagulase, ACME e bacteriocina	<i>cluster arc</i> , <i>cluster opp-3</i> , <i>bsa</i>	

Legenda: ACME- elemento móvel do catabolismo da arginina; CHIPS- proteína inibitória de quimiotaxia dos *Staphylococcus*; Eap- Proteína de aderência extracelular; MSCRAMMs- componentes microbianos de superfície reconhecedores de matrizes moleculares adesivas; PVL- Leucocidina *Panton-Valentine*.

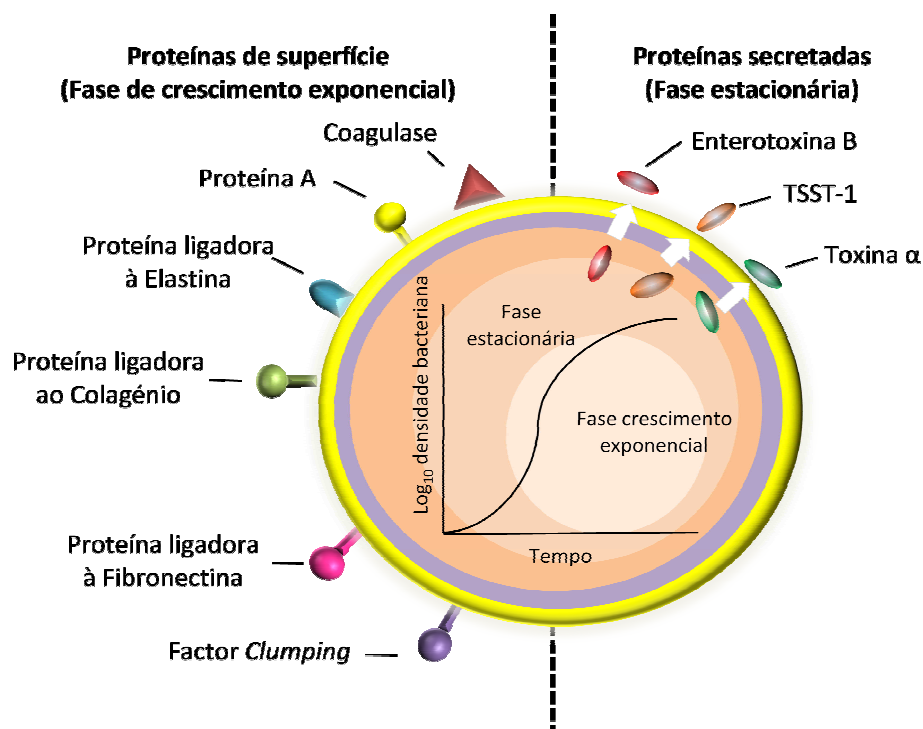


Figura 2. Factores patogénicos do *S. aureus*. TSST-1, toxina 1 da síndrome do choque tóxico (adaptado de Gordon & Lowy, 2008).

O *S. aureus* possui numerosas proteínas de superfície, denominadas “componentes microbianos de superfície reconhecedores de matrizes moleculares adesivas” (MSCRAMMs), que medeiam a aderência aos tecidos do hospedeiro. Os MSCRAMMs ligam-se a moléculas fibrosas dos tecidos conjuntivos como o colagénio, fibronectina e fibrinogénio. Diferentes MSCRAMMs podem aderir ao mesmo componente de um tecido (12). Os MSCRAMMs parecem ter um papel chave na iniciação das infecções cardiovasculares, ósseas e das articulações e também do material protésico. Quando o *S. aureus* adere ao tecido do hospedeiro ou ao material protésico, é capaz de crescer e persistir sob várias formas. Este pode formar biofilmes, o que lhe permite sobreviver através da fuga às defesas do hospedeiro ou aos antimicrobianos. Esta capacidade para formar biofilmes é uma das razões pela qual se torna difícil eliminar a infecção em material protésico, sem a sua remoção (12; 13). *In vitro*, o *S. aureus* também pode invadir e sobreviver no interior das células epiteliais, incluindo células endoteliais, o que teoricamente também o pode ajudar a escapar as defesas do hospedeiro, especialmente no caso de endocardites. O *S. aureus* também é capaz de formar pequenas colónias variáveis (SVCs) que podem contribuir para a sua persistência em infecções recorrentes. *In vitro*, as SVCs são capazes de se “esconder” dentro de células do hospedeiro sem lhes causar danos significativos, ficando assim, relativamente protegidas das defesas do

hospedeiro e da acção dos antimicrobianos. Estas podem ainda, mais tarde, reverter-se num fenótipo *wildtype* virulento, tendo como resultado uma infecção (12; 13; 14).

O *S. aureus* tem muitas outras características que lhe permitem escapar do sistema imunitário do hospedeiro durante uma infecção. A sua maior defesa é a produção de uma microcápsula antifagocitária. Esta cápsula pode também induzir a formação de abscessos. A proteína A (MSCRAMM) liga-se à porção Fc das imunoglobulinas, podendo assim prevenir a opsonização (12). Esta bactéria pode também secretar proteínas inibitórias de quimiotaxia ou proteínas de aderência extracelular, que interferem com o extravasamento dos neutrófilos e a quimiotaxia para o local de infecção. Além disso, o *S. aureus* produz leucocidinas que causam a destruição de leucócitos através da formação de poros na membrana celular (12; 15).

Durante um processo infeccioso, o *S. aureus* produz várias enzimas, tais como proteases, lipases e elastases, que lhe permitem invadir e destruir tecidos e metastizar-se para outros locais. O *S. aureus* possui catorze toxinas diferentes: a toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1); duas toxinas esfoliantes (ETA e ETB); e 11 enterotoxinas designadas A, B, C1, C2, C3, D, E, G, H, I e J (3). A síndrome do choque tóxico pode resultar da infecção de bactérias que possuam o gene *tsst-1*, *eta* ou *etb*. As enterotoxinas são responsáveis pelas intoxicações alimentares que este agente patogénico pode provocar, sendo os tipos A a E os mais frequentes. Cada estirpe de *S. aureus* pode transportar até 4 genes responsáveis pela produção de enterotoxinas (3; 8).

A regulação dos factores de virulência tem um papel central na patogénese. Para reduzir o gasto metabólico, a sua expressão ocorre de uma forma coordenada, isto é, apenas quando são necessários para a bactéria. A expressão de MSCRAMMs ocorre geralmente durante o crescimento logarítmico (replicação), enquanto que as proteínas secretadas, tais como as toxinas, são produzidas durante a fase estacionária (Figura 2). Durante a infecção, a expressão prévia de MSCRAMM facilita a colonização inicial dos tecidos, enquanto que a posterior expressão das toxinas facilita a propagação. O gene regulador acessório (*agr*) é um sistema *quorum sensing* que tem um papel crítico na regulação da virulência (16).

As características inerentes ao hospedeiro podem também afectar a susceptibilidade a uma doença provocada por esta bactéria. Mas, no geral, estão fracamente caracterizadas e é improvável que tenham um papel significativo quando comparadas com outros factores envolvidos na patogénese da infecção (6). Pensa-se que a susceptibilidade inerente ao hospedeiro possa ser afectada pelo seu estado imunológico. Desta forma, a quantidade de anticorpos contra o *S. aureus* parecem proteger contra os desenvolvimentos da síndrome do choque tóxico, que ocorre quase exclusivamente naqueles que possuem falta de anticorpos para a toxina em questão na altura da doença aguda (11; 16).

### 1.3. *Staphylococcus aureus* resistentes à Penicilina

Inicialmente, a produção de  $\beta$ -lactamase era mediada por um plasmídeo, mas há evidências de que o gene já integrou o DNA cromossómico (1; 17). Os genes que expressam a enzima encontram-se sob um sistema de controlo muito complexo, formado por um *cluster* molecular constituído pelos genes *bla Z*, *bla R1* e *bla I*, que codificam, respectivamente, a própria  $\beta$ -lactamase, um sinal tradutor (anti-repressor) e uma molécula repressora. Todos estes genes estão regulados negativamente pela proteína BlaI. Esta proteína, de 14-kDa, dimeriza e liga-se à região promotora de forma a reprimir a transcrição (Figura 3) (1; 17; 18).

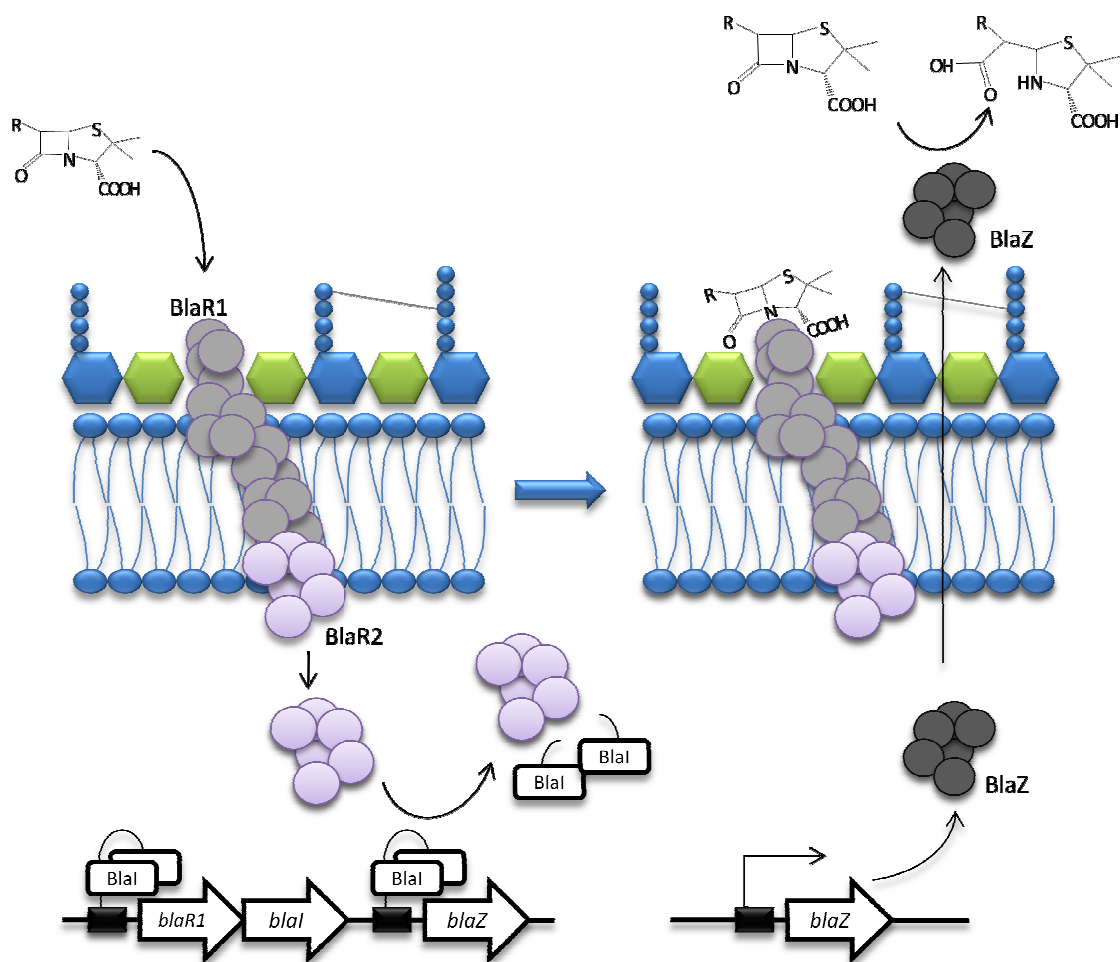


Figura 3. Operação *blaR1-blaI-blaZ* do *S. aureus* e a via de tradução de sinal para expressão da  $\beta$ -lactamase BlaZ em *S. aureus*, (adaptado de Walsh, 2003 e Bryskier, 1999).

Quando um antimicrobiano  $\beta$ -lactâmico se aproxima do lado exterior da membrana citoplasmática onde algumas cópias da proteína transmembranar BlaR1 se encontram ligadas, o antimicrobiano é detectado e a cascata de sinalização é activada. O domínio exterior da

proteína BlaR1 é um domínio de ligação à penicilina (PBP, do inglês *penicillin binding protein*) e a sinalização inicial é mediada através de uma acilação covalente com o  $\beta$ -lactâmico, como acontece para qualquer domínio PBP (Figura 3). A formação deste intermediário no domínio exterior irá promover o desencadear de uma série de alterações conformacionais no domínio de ligação das PBPs. Estas alterações vão propagar-se pelo domínio transmembranar culminando com a libertação do fragmento citoplasmático BlaR2. Este fragmento vai promover a proteólise da proteína BlaI de 14-kDa num fragmento de 11-kDa, perdendo desta forma a capacidade de se dimerizar e de se ligar ao promotor de DNA. Assim, a repressão da transcrição dos genes *blaZ* e *blaR1* é aliviada, levando à transcrição dos genes que culminam com a produção de mais proteína BlaR1 e de  $\beta$ -lactamase. Seguidamente, a  $\beta$ -lactamase é transportada para o exterior da célula, procedendo-se à hidrólise do antimicrobiano  $\beta$ -lactâmico e consequente, à aquisição de um fenótipo de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos (1; 19; 20).

#### 1.4. *Staphylococcus aureus* resistentes à Meticilina

O MRSA possui, por definição, o gene *mecA* responsável por esta resistência (9). Originalmente, o *S. aureus* possui quatro peptidoglicano sintetases (PBP 1, 2, 3 e 4). O gene *mecA* codifica uma PBP modificada, de 78-kDa, denominada PBP2a ou PBP2', que é uma peptidoglicano transpeptidase, e que difere da PBP endógena do *S. aureus* (Figura 4). Esta PBP2a mantém a sua actividade enzimática normal, mas, difere da PBP2 porque possui o local de reconhecimento aos  $\beta$ -lactâmicos modificado. Desta forma, quando as peptidoglicano sintetases estão ligadas aos  $\beta$ -lactâmicos tornam-se inactivas com excepção da PBP2a por esta ser insensível a estes antimicrobianos, inclusivamente à Meticilina. Portanto, apesar de se encontrar ligada à Meticilina, a PBP2a pode ainda promover a síntese da parede celular (9; 11; 21).

A regulação da expressão do gene *mecA* e a consequente produção da PBP2a que confere resistência à Meticilina em MRSA, processa-se de modo análogo ao operão que produz a  $\beta$ -lactamase anteriormente descrito. Assim, o complexo regulador do gene *mecA* é constituído por três genes, *mecR1-mecI-mecA*. O domínio exterior da proteína MecR1 é também uma PBP. Quando o  $\beta$ -lactâmico se liga covalentemente ao domínio PBP, neste caso ao fragmento MecR1, é iniciada uma sinalização transmembranar que resulta na libertação de um fragmento citoplasmático, MecR2, no domínio interior. Este fragmento MecR2 irá, posteriormente, clivar a proteína intacta MecI em dois fragmentos aliviando, assim, a repressão sobre o gene *mecA*, resultando na síntese da PBP2a (1).

O gene *mecA* encontra-se num elemento genético móvel, o "*Staphylococcal Cassette Chromosome mec*" (SCCmec), integrado no cromossoma do *S. aureus* num locus denominado *attBsc*, próximo da origem de replicação (*oriC*). Esta cassette converte instantaneamente o *S. aureus* a MRSA, promovendo a resistência a praticamente todos os agentes  $\beta$ -lactâmicos. A organização genética na vizinhança do gene *mecA* define a complexidade do gene *mec*, estando descritas, até hoje, para o *S. aureus*, três grandes classes. A classe A que contém todo o complexo regulador do *mecA* (*mecI-mecR1-mecA*). A classe B e classe C que contêm os genes reguladores do *mecA* interrompidos por outras sequências, *CIS1272-DmecR1-mecA* e *IS431-DmecR1-mecA*, respectivamente (7; 22).

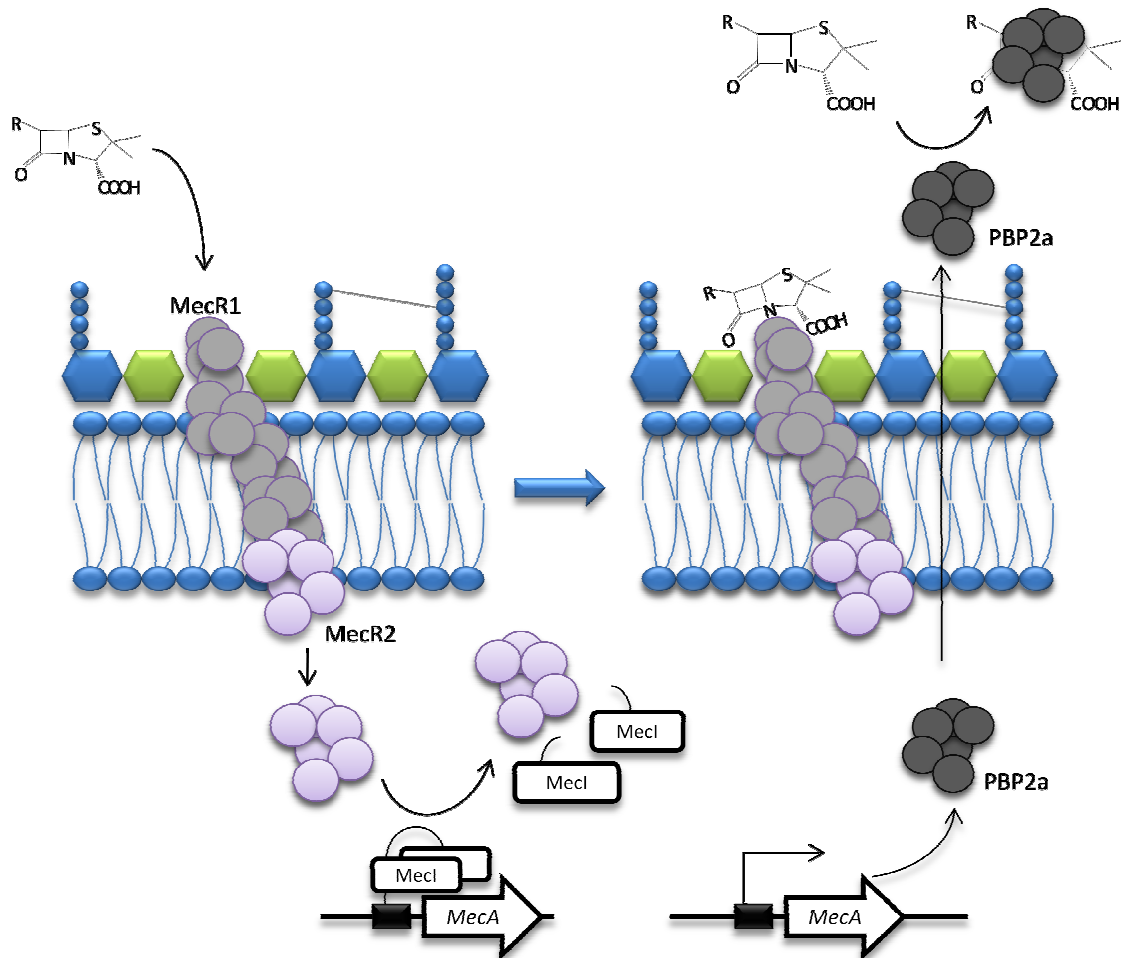


Figura 4. Operação *mecR1-mecI-mecA* do *S. aureus* e a via de tradução de sinal para expressão da PBP2a que confere resistência à Metilina em *S. aureus*, (adaptado de Walsh, 2003).

A mobilidade do SCC*mec* é devida, em parte, à presença de recombinases totalmente funcionais da família das invertases/resolvases e também por nesta cassete se encontrar codificado o complexo genético *ccr*, que permite a transmissão horizontal intra e interespecies do SCC*mec*. O complexo genético *ccr* pode ter dois genes, *ccrA* e *ccrB* (*ccrAB*), com quatro alotipos conhecidos ou um único gene, *ccR*, não muito relacionado com os genes *ccrAB*, *ccR* (7; 11).

Os tipos de SCC*mec* são definidos através da combinação da classe do complexo genético *mec* com o tipo de alotipo *ccr*. Com base nesta nomenclatura foram definidos seis tipos de SCC*mec* (Tabela 2) (7).

Tabela 2. Classificação dos tipos de SCCmec, (adaptado de Maltezou & Giamarellou, 2006 e Lencastre, Oliveira, & Tomasz, 2007).

Tipo SCCmec	Classe mec	Complexo genético ccr
I	B	AB1
II	A	AB2
III	A	AB3
IV	B	AB2
V	C	C
VI	B	AB4

As restantes partes do SCCmec são chamadas regiões “junkyard” (J), J1, J2 e J3, que constituem componentes não essenciais do SCCmec. Não obstante, estas regiões podem conter elementos genéticos, tais como *Tn554* (que codifica a resistência para os Macrolídeos, Clindamicina e Estreptogramina B) e *pt181* (que codifica a resistência as Tetraciclina) (7; 23).

Começando no sentido dos ponteiros a partir da origem de replicação do cromossoma da *S. aureus*, a região J3 é a região entre a junção cromossômica esquerda, que inclui a origem de replicação, e o complexo *mec*; a região J2 é a região entre o complexo *mec* e o complexo *ccr*; e a região J1 é a região entre o complexo *ccr* e a junção cromossômica direita. Deste modo, a organização estrutural do SCCmec pode ser sumariada como J3-mec-J2-ccr-J1 (Figura 5) (6; 7).

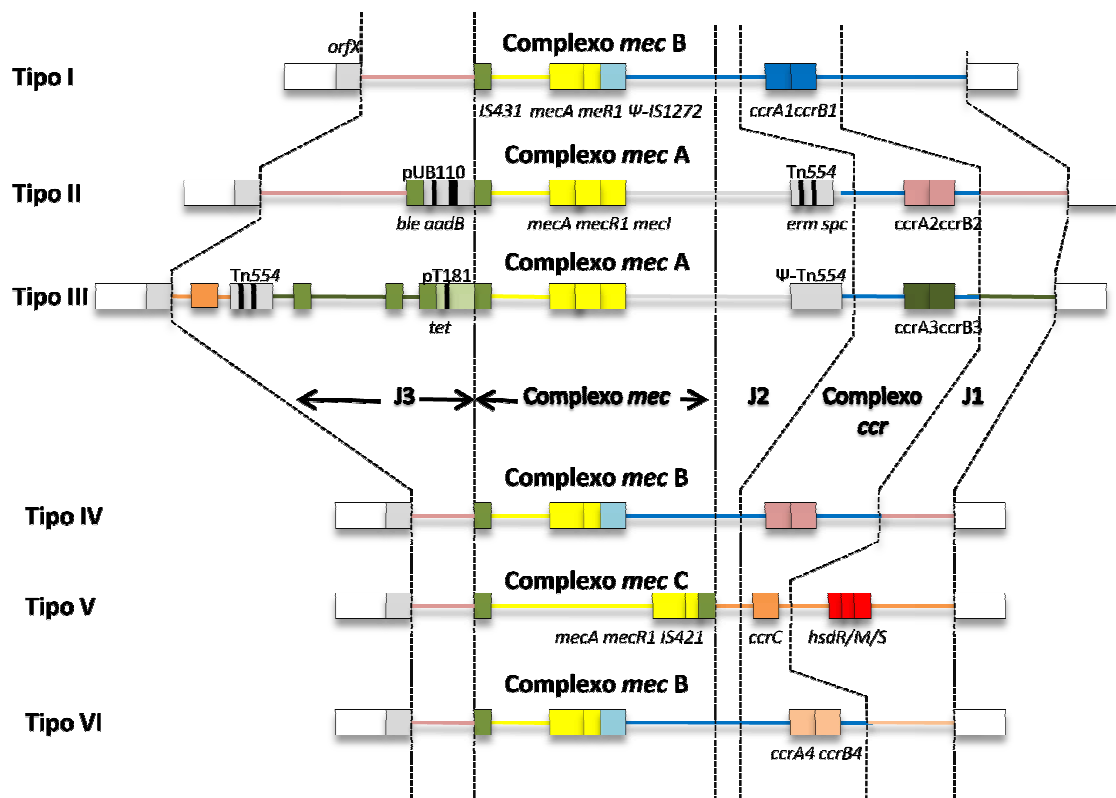


Figura 5. Organização genética dos tipos de SCCmec de I a VI, (adaptado de Lencastre, Oliveira, & Tomasz, 2007).

Duas teorias opostas foram sugeridas para descrever a relação entre o primeiro MRSA isolado e os recentes clones. A teoria “single-clone” sugere que todos os clones MRSA têm um ancestral comum, e que o SCCmec foi introduzido apenas uma vez no *S. aureus* (11; 12). A teoria “multi-clone” pressupõe que o SCCmec foi introduzido várias vezes em diferentes linhagens genéticas de *S. aureus*. Esta teoria tem sido suportada por vários estudos (12; 24).

#### **1.4.1. Emergência de *Staphylococcus aureus* resistente à Vancomicina**

A Vancomicina é um antimicrobiano glicopeptídico que não actua através da inibição directa das transglicosilases ou transpeptidases, mas através da complexação com as unidades estruturais do peptidoglicano com as terminações D-Ala-D-Ala. Este sequestro do substrato, leva a uma diminuição da síntese da parede celular, inibindo a ligação cruzada dos monómeros constituintes do peptidoglicano, essenciais para a estabilidade da parede celular, resultando assim numa sensibilidade à Vancomicina (1).

O primeiro caso descrito de VISA surgiu em 1996. A análise desses isolados demonstrou uma parede celular espessada com uma diminuição de peptidoglicano, resultando numa estrutura que liga e sequestra a Vancomicina causando uma diminuição na quantidade de antimicrobiano que atinge os locais de síntese da parede celular. A maioria destes isolados surge durante quimioterapia com Vancomicina, e portanto, parece aceitável presumir que mutações espontâneas em genes envolvidos na biossíntese da parede celular sejam responsáveis por este fenótipo (8; 25).

No início de 2002, foi isolada nos Estados Unidos da América (EUA), a primeira estirpe VRSA contendo o gene resistente à Vancomicina, *vanA*, específico para os glicopéptidos. Esta resistência é regulada pelo sistema regulatório de dois componentes, VanR e VanS (Figura 6). A VanS é um sensor associado à membrana que controla o nível de fosforilação da VanR. Esta, por sua vez, é um activador transcricional do operão que codifica a VanH, VanA e VanX (VanHAX). A VanH é uma desidrogenase que reduz o piruvato a D-Lactato enquanto que a VanA é uma ligase que catalisa a formação de uma ligação éster entre a D-Alanina e o D-Lactato. Como a Vancomicina não se consegue ligar ao dímero D-Ala-D-Lac, a bactéria adquire resistência. A VanX é uma dipeptidase que hidrolisa os componentes remanescentes do peptidoglicano D-Ala-D-Ala. Desta forma, a VanX previne a sensibilização à Vancomicina. Os resíduos terminais do peptidoglicano que são produzidos, se a eliminação do dímero D-Ala-D-Ala pela VanX não for completa, serão hidrolisados por uma D,D-carboxipeptidase, a VanY.

Assim, o dímero D-Ala-D-Lac substitui o dipéptido normal na síntese do peptidoglicano conferindo à bactéria resistência à Vancomicina. A VanZ é uma proteína que confere resistência à Teicoplanina, mas o mecanismo genético e bioquímico ainda é desconhecido (25; 26; 27).

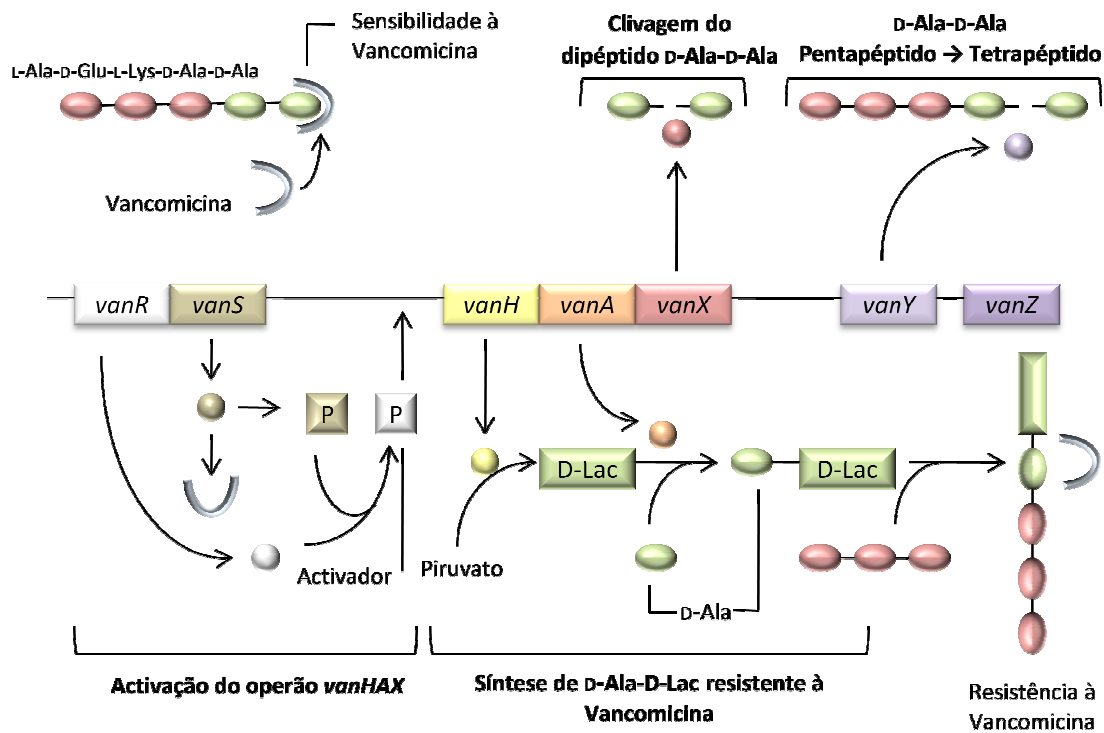


Figura 6. Cluster do gene *vanA* que confere a resistência à vancomicina, (adaptado de Hughes, 2003).

As estirpes VISA podem, dependendo do local de infecção, permanecer susceptíveis ao tratamento com Vancomicina. Contudo, muitas vezes precisam de doses mais elevadas e períodos de tratamento mais prolongados, sendo no entanto, a maioria sensível ao Trimetoprim/Sulfametoxazole (25).

No entanto, a emergência de VISA e VRSA também comprometeu as opções de tratamento para as infecções provocadas por outros Gram-positivos. Infecções complicadas e resistentes a vários antimicrobianos são geralmente denominadas por MDR (do inglês *Multidrug resistance*). Pacientes com VISA ou VRSA são geralmente tratados com múltiplos ciclos de antimicrobianos, o que pode constituir um factor de risco para o desenvolvimento de infecções provocadas por microorganismos com fenótipos MDR. Actualmente, todos os  $\beta$ -lactâmicos são considerados inadequados contra as estirpes MRSA. Além disso, VISAs e VRSA com fenótipos MDR já têm sido largamente descritos (25; 26). A emergência de VISA e VRSA sugere que os agentes antimicrobianos actuais disponíveis podem tornar-se, no futuro, ineficazes no tratamento das infecções sistémicas como bacteremias, endocardites, osteomielites, entre outras (25; 26).

#### **1.4.2. *Staphylococcus aureus* resistentes à Meticilina comunitários (CA-MRSA) e hospitalares (HA-MRSA)**

As infecções por MRSA ocorrem mais frequentemente em pessoas que têm o sistema imunitário debilitado e um historial de internamento hospitalar ou permanência em lares. Outras pessoas em risco são as que têm historial recente de diálise, cirurgia ou cateterização. Estes tipos de infecções são denominadas infecções por MRSA associadas a cuidados de saúde ou HA-MRSA, do inglês *hospital-acquired* MRSA (5; 25). As estirpes de MRSA têm também vindo a ser encontradas num contexto não hospitalar. Estas estirpes associadas à comunidade são, assim, designadas por CA-MRSA, do Inglês *community-acquired* MRSA (23; 26). Ocasionalmente, a caracterização molecular e os perfis de resistência a antimicrobianos têm sido utilizados para distinguir entre os CA-MRSA e os HA-MRSA (23; 26).

Após a introdução da Meticilina na prática médica o *S. aureus* rapidamente adquiriu resistência a este antimicrobiano. Passou-se apenas um ano até que o primeiro caso de MRSA fosse registado (1). Nas duas décadas seguintes, o MRSA foi-se estabelecendo por todo o mundo, tornando-se um importante agente patogénico nosocomial com um grande impacto económico nos sistemas de saúde. Actualmente, este microrganismo não deve ser considerado apenas um agente patogénico nosocomial. Na última década, sobretudo, os CA-MRSA têm aparecido por várias áreas em todo o mundo entre jovens sem factores de risco associados aos cuidados de saúde. É possível que infecções CA-MRSA tenham evoluído de estirpes HA-MRSA que foram exportadas do sistema de cuidados médicos e começaram a circular na comunidade (23; 25; 28).

Os HA-MRSAs e CA-MRSA apresentam, contudo, diferentes tipos genéticos. É possível que durante o seu processo evolutivo os HA-MRSA e CA-MRSA tenham adquirido diferente material genético móvel, e por isso, os seus perfis de resistência aos antimicrobianos também seja diferente. As estirpes HA-MRSA contêm *SCCmec* do tipo I, II e III, os quais são maiores e transportam vários genes de resistência, tornando-os resistentes a uma classe maior de antimicrobianos. Por sua vez, as estirpes CA-MRSA contêm *SCCmec* do tipo IV, que são menores que os anteriores e possuem apenas um gene de resistência. Desta forma, as estirpes de CA-MRSA são sensíveis à maior parte dos antimicrobianos (excepto  $\beta$ -lactâmicos e Eritromicina). Recentemente, também foram identificadas estirpes CA-MRSA que contêm *SCCmec* do tipo V (12). Uma grande quantidade de estirpes CA-MRSA expressa a proteína PVL, e portanto, a apresentação clínica entre CA-MRSA e HA-MRSA (Tabela 3) também diverge (7; 12; 28).

Evidências indicam que as estirpes contendo *SCCmec* do tipo IV ou V podem ser mais aptas à sobrevivência do que as demais (29). A propagação dos MRSA é facilitada pelo menor tamanho das cassetes *SCCmec* tipo IV tornando-os mais eficientes na transferência mediada por fagos dos MSSA (6; 7).

Tabela 3. Características que distinguem as HA-MRSA e CA-MRSA, (adaptado de Levenhagen, 2008 e Matouskova & Janout, 2008).

<i>Características</i>	<i>HA-MRSA</i>	<i>CA-MRSA</i>
<b>Resistência antimicrobiana</b>	Resistência a vários antimicrobianos (MDR)	Resistência a $\beta$ -lactâmicos e Eritromicina
<b>Epidemiologia</b>	Idosos; Indivíduos que tiveram um longo período de internamento hospitalar; Indivíduos que tiveram ou têm de fazer diálise ou cateterização; Indivíduos que tiveram ou têm de fazer procedimentos invasivos (cirurgia); Indivíduos que vivem em lares.	Indivíduos que vivem em situações superlotadas: militares e prisioneiros; Indivíduos que tiveram comportamentos de risco: utilizadores de drogas intravenosas, relações sexuais desprotegidas, etc.; Atletas; Indivíduos com pessoas próximas com CA-MRSA; Crianças e jovens adultos.
<b>Apresentação clínica</b>	Invasivas	Infecções de pele; “picadas de mosquito”; Raramente invasivas, Reincidência.
<b>Marcadores moleculares</b>	PVL –; <i>SCCmec</i> I-III.	PVL +; <i>SCCmec</i> IV,V

Legenda: HA-MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente à Meticilina associada ao ambiente hospitalar; CA-MRSA – MRSA associada à comunidade; MDR – resistência a múltiplos fármacos (*multidrug resistance*); PVL- – estirpes não portadoras da Leucocidina *Panton-Valentine*; PVL+ – estirpes portadoras da PVL.

O actual modelo aceite para explicar a origem das CA-MRSA (Figura 7) enuncia que uma pequena cassette de resistência à Meticilina (ex. *SCCmec* IV) estava integrada no genoma de vários clones MSSA ancestrais que circulavam em diferentes regiões geográficas. Alguns desses clones dotados com os melhores “traços” sobreviveram. Como já foi referido, o crescimento mais rápido dos CA-MRSA sugere que estes são mais adaptáveis que os HA-MRSA. Paralelamente, este modelo, também explica a emergência e propagação dos HA-MRSA a partir dos MSSA nos anos 60. No entanto, ao contrário dos HA-MRSA, os CA-MRSA provavelmente emergiram dos MSSA portadores dos genes para a PVL (PVL +). Em alguns locais, os CA-MRSA que possuem a PVL são mais comuns do que os CA-MSSA o que sugere que a resistência à Meticilina contribui para o sucesso das estirpes *S. aureus* PVL + (9; 28).

Neste contexto, cada vez mais estirpes MRSA contendo a PVL e com características do genótipo de CA-MRSA (SCC*mec* IV ou V) estão a ser documentadas em HA-MRSA (9). Este facto pode dever-se a uma colonização pré-existente de CA-MRSA com PVL que encontrou uma porta de entrada durante procedimentos invasivos realizados num contexto hospitalar (9; 28).

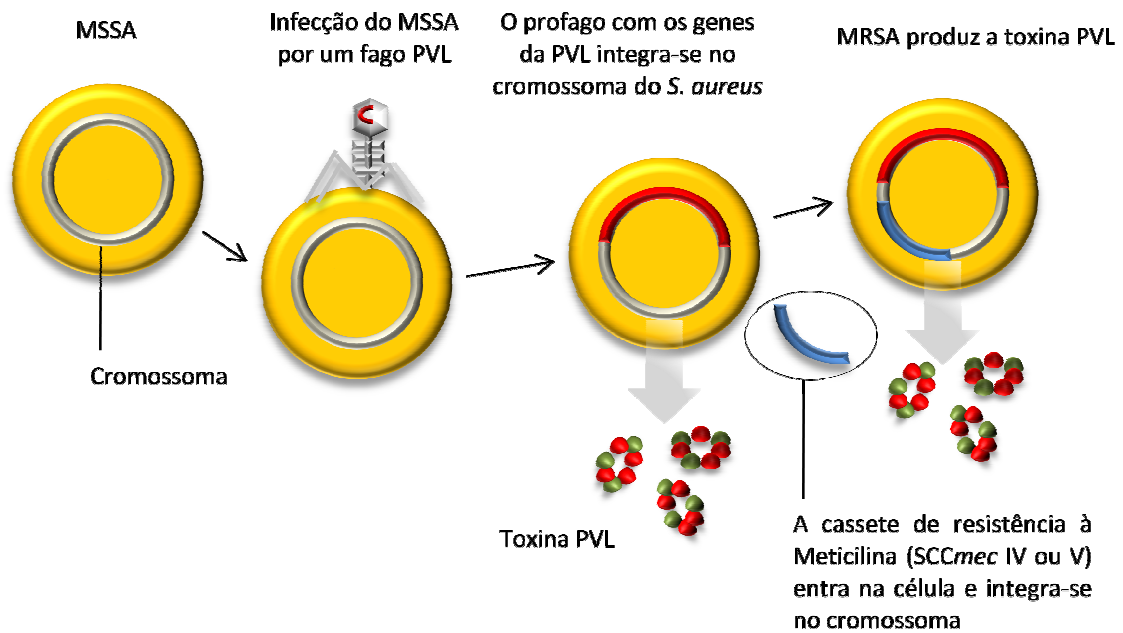


Figura 7. Modelo para a emergência dos CA-MRSA com PVL. Uma estirpe MSSA é infectada por um fago portador dos genes *lukS-PV* e *lukF-PV* que codificam a PVL. Posteriormente, uma cassette de resistência à Metilina (SCC*mec* IV ou V) portadora do gene *mecA* é transferida horizontalmente para a estirpe MSSA PVL positiva e integrada no genoma, numa localização distinta daquela onde se encontram os genes codificantes da PVL, (adaptado de Boyle-Vavra & Daum, 2007 e Levenhagen, 2008).

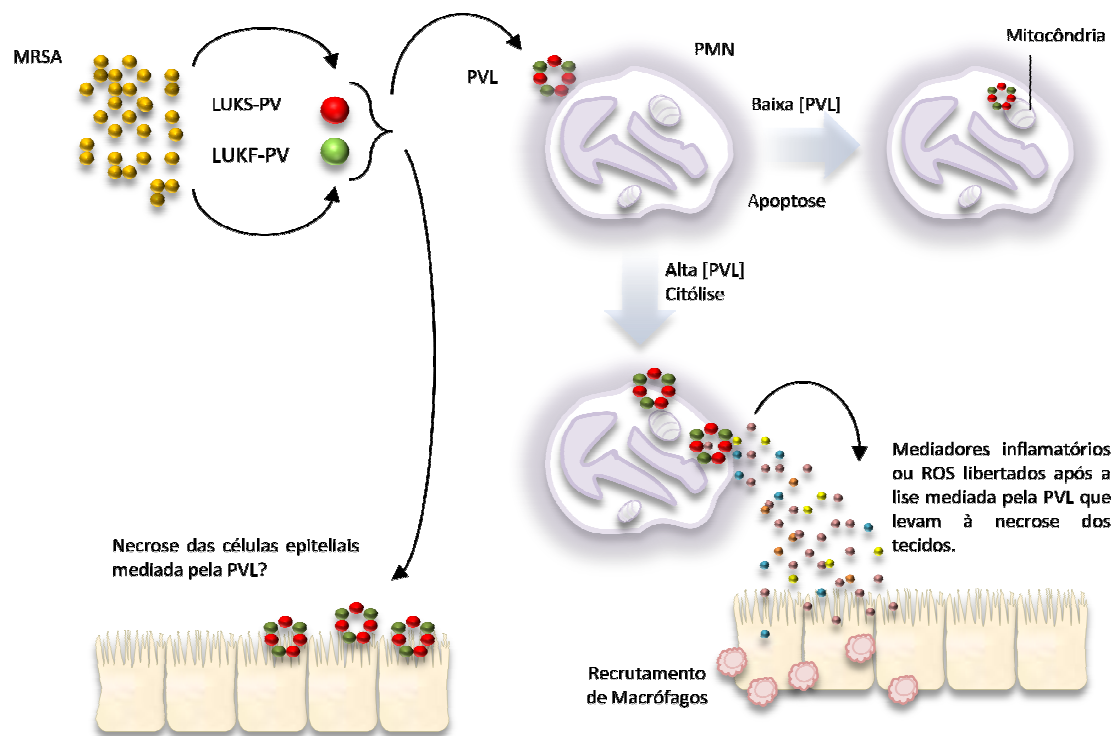
## 1.5. Leucocidina *Panton-Valentine*

As leucotoxinas, que são produzidas pelo *S. aureus*, pertencem a uma família de toxinas formadoras de poros, que são compostas por dois componentes distintos. O efeito tóxico depende da acção sinérgica de ambas proteínas: a da classe S (eluição lenta) e a da classe F (eluição rápida), sobre as células polimorfonucleares (PMN) e monócitos. Nesta família está incluída a leucocidina *Panton-Valentine* (PVL) constituída pelas subunidades LukS-PV e LukF-PV (21; 30).

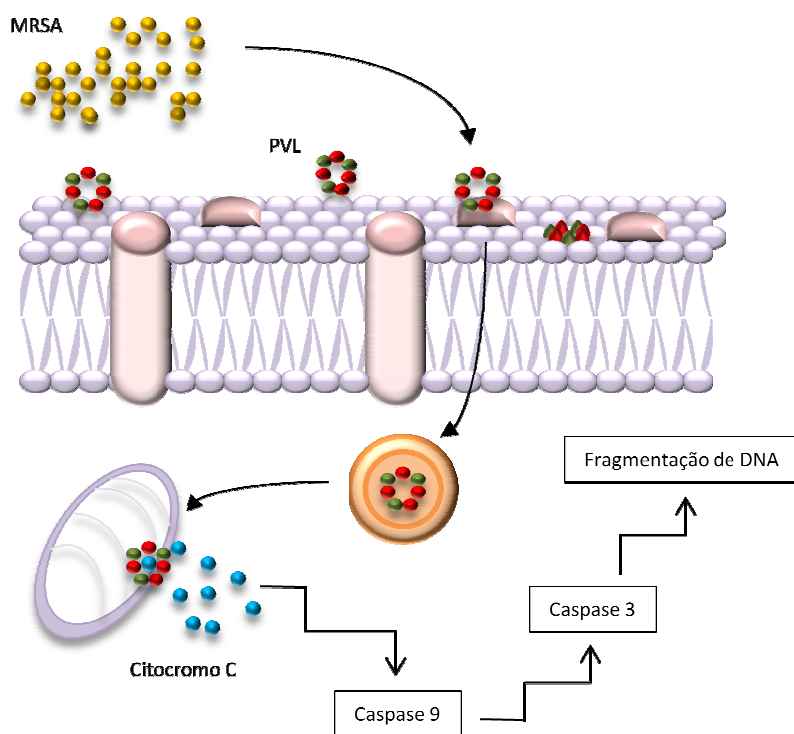
A PVL foi descrita pela primeira vez em 1932. É uma toxina que além de destruir certos leucócitos, também medeia necroses tecidulares. Tem vindo a ser associada a infecções de pele e de tecidos moles, e severas pneumonias necrotizantes entre crianças saudáveis e jovens adultos (23).

Estudos permitiram concluir que a PVL por si só não é uma substância tóxica, pois a injeção intravenosa de PVL em coelhos não se mostrou mortal. Foi também demonstrado que a PVL purificada causa lesões dermonecróticas em coelhos, contribuindo para a hipótese de que esta toxina possui um papel nas infecções da pele e tecidos moles. Recentemente, foi ainda demonstrado que a PVL foi capaz de provocar lesões necróticas mortais em pulmões de ratos através de inalação da toxina purificada (12; 31).

Os dois componentes da PVL, LukS-PV e LukF-PV, são secretados antes de formarem um heptâmero formador de poros nas membranas dos leucócitos polimorfonucleares (PMN) (Figura 8A), levando à lise destes. Ao contrário de outras leucocidinas formadoras de poros do *S. aureus*, a PVL não é hemolítica. O LukS-PV liga-se inicialmente a um receptor não identificado nos PMNs onde consequentemente dimeriza com o LukF-PV, seguindo-se uma ligação em série alternada de componentes LukS-PV e LukF-PV, até que todo o heptâmero esteja formado. Quando o LukS-PV se liga aos PMNs, uma proteína cinase do hospedeiro (A ou C) fosforila o LukS-PV, à qual se segue uma indução de canais de cálcio. Este facto sugere uma indução de sinal de transdução que pode activar a produção de interleucinas e mediadores inflamatórios. Dependendo da sua concentração, a PVL causa a lise tecidular ou a apoptose dos PMNs. A formação de poros de PVL na membrana mitocondrial (Figura 8B) tem sido descrita como o mecanismo que conduz à apoptose (9; 11; 12).



A



B

Figura 8. A - Modelo da necrose tecidual mediada pela PVL. Altas concentrações de PVL causam a lise dos PMNs, enquanto que baixas concentrações medeiam uma via para a apoptose dos PMNs, através da ligação directa à membrana mitocondrial. A necrose tecidual pode resultar da libertação de espécies reactivas de oxigénio (ROS) dos PMNs lisados. Alternativamente, a libertação dos grânulos dos PMNs lisados pode despoletar uma resposta inflamatória, resultando numa eventual necrose tecidual. É pouco provável que a PVL tenha um efeito necrótico directo nas células epiteliais. B - Mecanismo proposto por Boyle-Vavra & Daum; 2007, pelo qual a PVL pode induzir a apoptose dos PMNs. Baixas concentrações de PVL pode induzir a apoptose por uma via que presumivelmente envolve a formação de poros na membrana mitocondrial levando à libertação de citocromo c e indução de caspases 9 e 3, (adaptado de Boyle-Vavra & Daum, 2007).

## 1.6. Epidemiologia

A resistência a antimicrobianos e a virulência variam no espaço e no tempo. A um “macro” nível, varia entre países. Esta variação reflecte, parcialmente, os esforços no que concerne às políticas de controlo da infecção e da prescrição medicamentosa. Esta variação depende também de factores do acaso como a presença de um determinado clone resistente numa determinada região geográfica, os factores que permitiram que esse clone alcançasse esse local, que portadores do agente (animal ou humano), entre outros. A um “micro” nível, a resistência antimicrobiana varia entre unidades hospitalares e entre grupos de pacientes (32).

Conhecer a prevalência do MRSA, as suas novas resistências, virulências e os riscos de infecção de cada estirpe é essencial para auxiliar os clínicos a escolher uma terapêutica adequada. O uso anterior e inadequado de antimicrobianos de qualquer tipo, causa uma pressão selectiva que parece ser a força motriz para o desenvolvimento de fenótipos MDR. Além disso, a persistência de programas de controlo da infecção ineficientes e o aumento da gravidade das doenças nos pacientes hospitalizados também contribuíram para a recente explosão na prevalência de MRSA. A resistência a antimicrobianos glicopeptídicos, como a Vancomicina, em MRSA tem também aumentado nos últimos anos, paralelamente com o aumento da utilização desta no tratamento de infecções graves provocadas por MRSA. Comparado com as infecções provocadas por MSSA, as infecções provocadas por MRSA estão associadas a um aumento significativo de morbilidade, mortalidade, tempo de internamento hospitalar e custos. (33).

De seguida apresentam-se, resumidamente, os resultados dos estudos epidemiológicos realizados pelo Sistema Europeu de Vigilância à Resistência Antimicrobiana (EARSS, do inglês *European Antimicrobial Resistance Surveillance System*) da prevalência de MRSA e VRSA, no ano de 2007 em comparação aos anos anteriores, não só a nível europeu, mas também a sua evolução desde 2000 até 2008 em Portugal.

### 1.6.1. Europa

Em 2007, 31 países apresentaram ao EARSS, 31 591 casos de isolados de *S. aureus*, dos quais 22 % (n=7 115) foram identificados como MRSA (Figura 9).

As prevalências de isolados de MRSA variaram entre 0% em países do Norte da Europa e 50% em países do Sul da Europa. Treze países apresentaram prevalências iguais ou superiores a 25%. Como em anos anteriores, todos os países mediterrânicos, a Roménia, o Reino Unido e a Irlanda foram incluídos nesta categoria. No entanto, no Reino Unido, 2007 representa um ano de diminuição de casos de MRSA invertendo, desta forma, a tendência de aumento que permaneceu até 2006. Na França, Turquia e Eslovénia, o número de casos de MRSA encontra-se a diminuir e, pela primeira vez, observa-se uma tendência de descida. A prevalência de isolados de MRSA na Áustria, Bulgária e Itália demonstrou, também, uma significativa diminuição. Por sua vez, significativos aumentos documentados em 2006 continuaram em 2007 na República Checa, Hungria e Alemanha. Quatro países registaram prevalências acima dos 40%, entre os quais Portugal e Malta, que continuam a evidenciar um aumento contínuo. Na Grécia, como no ano anterior, verificou-se uma significativa diminuição, assim como em Espanha. No norte da Europa, a quantidade de MRSA encontra-se abaixo dos 3%, excepto para os Países Baixos (8-9%). Na Lituânia, as taxas continuam a diminuir fortemente, de 25% em 2004 para 8% em 2007. No entanto, na Holanda, Finlândia e Dinamarca foi documentado um significativo aumento. As taxas de MRSA na Estónia, Islândia, Noruega e Suíça continuam relativamente estáveis. Na Bélgica, a diminuição que começou em 2006 manteve-se, apesar de ainda não representar uma tendência significativa a nível estatístico.

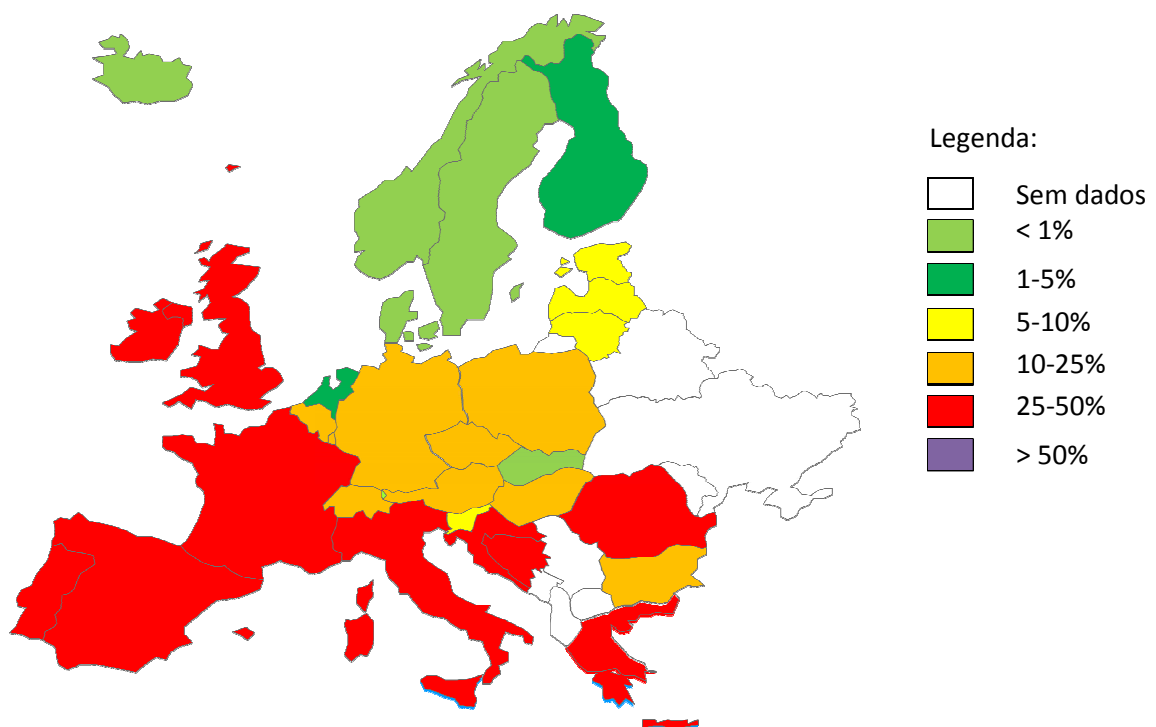


Figura 9. Prevalência de isolados de *S. aureus* resistentes à Meticilina a nível Europeu em 2007 (Dados do relatório do EARSS de 2007).

A nível dos isolados de VRSA a nível europeu em 2007, não se verifica ainda uma elevada frequência (Figura 10). No entanto, não devem ser descuidados os cuidados básicos de forma a prevenir o alastramento desta estirpe, deve-se ainda continuar a procurar novos meios de eliminá-la no caso de esta estirpe se tornar uma epidemia.

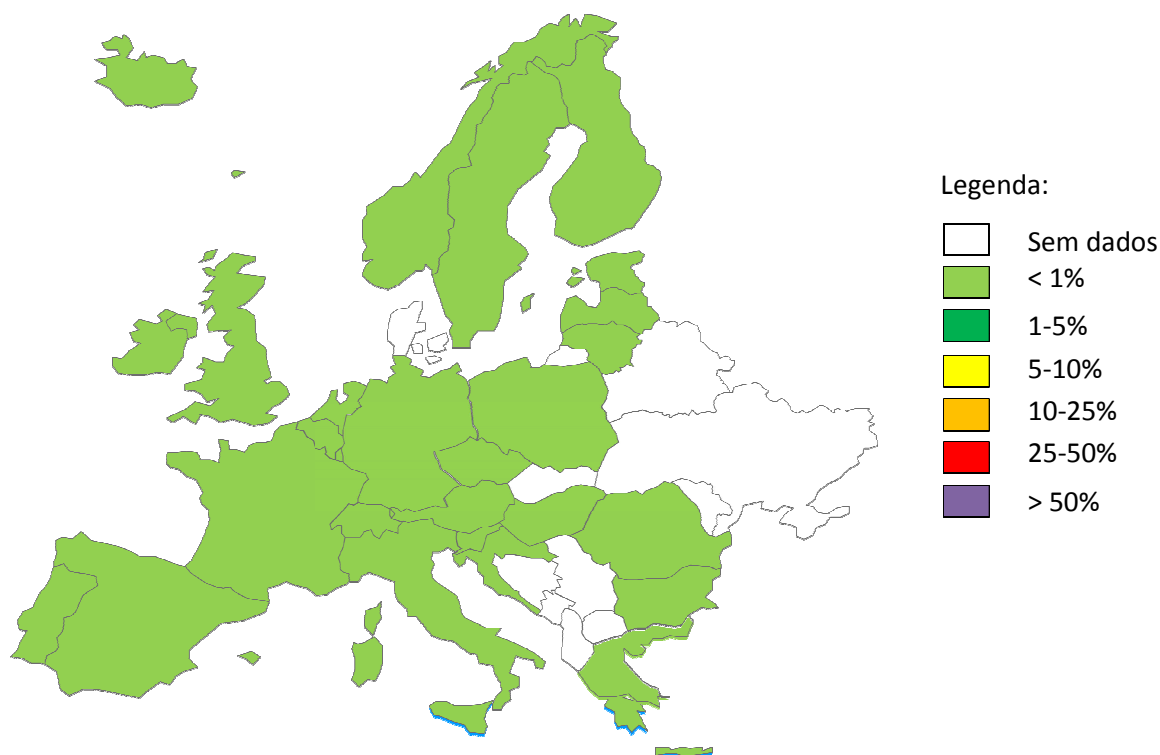


Figura 10. Prevalência de isolados de *S. aureus* resistentes à Vancomicina a nível europeu em 2007 (Dados do relatório do EARSS de 2007).

A distribuição de MRSA continua a ser considerada como problemática. No último relatório do EARSS, alguns dos países onde eram registadas baixas frequências de MRSA apresentam-se agora aumentadas. Noutros países parece ter havido uma estabilização das proporções. Apesar de tudo isso, foram registados mais países, comparativamente com anos anteriores, a apresentarem diminuições significativas na prevalência de MRSA. Uma tendência de descida já tinha sido observada em países como a França, a Eslovénia ou a Turquia, mas agora verifica-se também uma tendência de descida na Áustria, na Bulgária, na Itália, na Lituânia e no Reino Unido. Estas tendências de descida indicam que a introdução de políticas sanitárias de controlo da infecção pode efectivamente reverter os níveis de MRSA nos hospitais, mesmo em países onde se observam elevadas taxas de MRSA.

## 1.6.2. Portugal

Os dados do último relatório do EARSS utilizados para construir a tabela 4 referem-se a isolados registados, em Portugal, entre 2000 a 2008. Estes dados indicam que ao longo dos últimos anos tem havido um grande aumento de isolados MRSA, passando de 25% em 2000 para o dobro em 2008 (52%) (Figura 11). Concluí-se assim que, em Portugal, o registo do número de estirpes MRSA segue o padrão de aumento verificado por grande parte da Europa.

Tabela 4. Resultados para os isolados MRSA e VRSA entre os anos de 2000 e 2008 (Dados do relatório do EARSS de 2007).

	<i>Antimicrobiano</i>	<i>Número</i>			<i>Total</i>	<i>Percentagem</i>		
		<i>S</i>	<i>I</i>	<i>R</i>	<i>N</i>	<i>S</i>	<i>I</i>	<i>R</i>
2000	MRSA	112	0	38	150	74.7	0.0	25.3
	VRSA	39	0	0	39	100.0	0.0	0.0
2001	MRSA	355	0	166	521	68.1	0.0	31.9
	VRSA	422	0	0	422	100.0	0.0	0.0
2002	MRSA	336	0	207	543	61.9	0.0	38.1
	VRSA	522	0	0	522	100.0	0.0	0.0
2003	MRSA	563	0	470	1033	54.5	0.0	45.5
	VRSA	1027	0	0	1027	100.0	0.0	0.0
2004	MRSA	573	0	490	1063	53.9	0.0	46.1
	VRSA	1002	0	0	1002	100.0	0.0	0.0
2005	MRSA	616	0	537	1153	53.4	0.0	46.6
	VRSA	1047	0	1	1048	100.0	0.0	0.0
2006	MRSA	678	0	628	1306	51.9	0.0	48.1
	VRSA	1206	0	0	1206	100.0	0.0	0.0
2007	MRSA	714	0	669	1383	51.6	0.0	48.4
	VRSA	1269	0	0	1269	100.0	0.0	0.0
2008	MRSA	733	0	823	1556	47.1	0.0	52.9
	VRSA	1458	0	0	1458	100.0	0.0	0.0

Legenda: S- Sensível; I- Intermediário; R- Resistente.

Relativamente a estirpes VRSA, os últimos dados da EARSS indicam que em Portugal, até 2008, apenas tinha sido detectado um único caso.

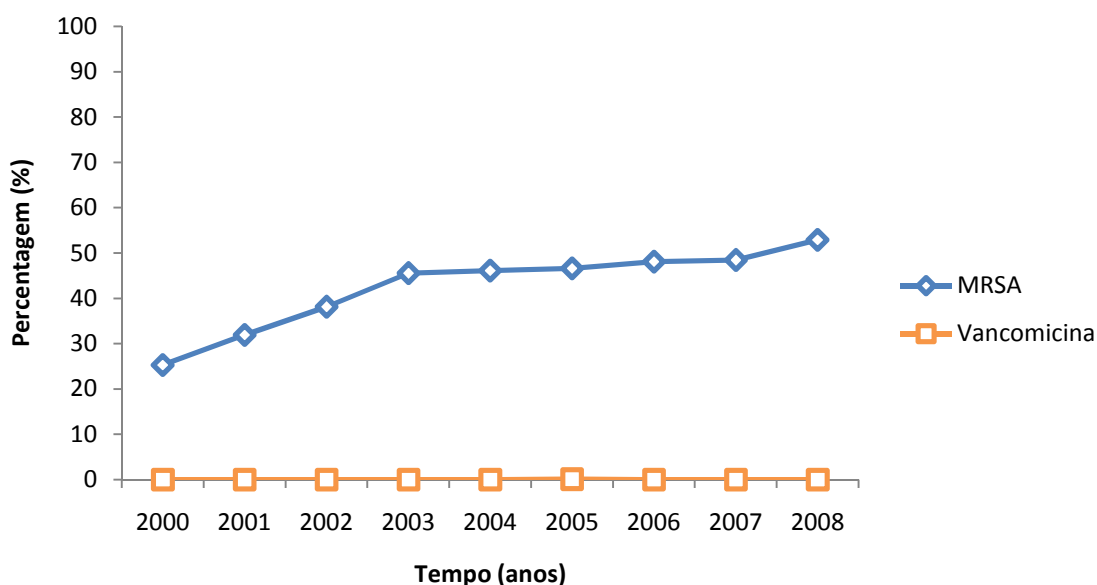


Figura 11. Representação gráfica da percentagem de predominância de MRSA e VRSA em Portugal ao longo dos últimos anos. MRSSA- *S. aureus* resistentes à Meticilina (Dados do relatório do EARSS de 2007).

### 1.6.3. Transmissão

A MRSA espalha-se de pessoa para pessoa através de contacto físico directo. No hospital, a MRSA é transportada de uma pessoa para a outra através das mãos dos profissionais de saúde (34). As mãos ficam contaminadas com MRSA quando estes estão a tratar pacientes colonizados ou infectados com esta estirpe, ou quando entram em contacto com material ou superfícies contaminadas. Se a lavagem das mãos com água e sabão ou com uma solução própria para a desinfecção, é feita incorrectamente ou mesmo se for inexistente, a bactéria espalha-se quando os profissionais de saúde tocam noutros doentes (5; 34). A transmissão de MRSA também ocorre quando pacientes colonizados ou infectados com MRSA se movem entre as instalações dos cuidados intensivos, serviço ambulatorio entre outros (34). Na comunidade, o contacto directo de pele a pele e o contacto com material contaminado são os principais meios de transmissão da MRSA. A MRSA é mais facilmente transmissível em áreas como escolas, instalações de desporto, dormitórios, quartéis militares, agregados familiares, prisões e infantários. São cinco os factores que permitem a transmissão nestas áreas: a)

sobrelotação, *b)* contacto frequente pele com pele entre indivíduos, *c)* participação em actividades que resultam em cortes e feridas na pele, *d)* partilha de material pessoal e superfícies que possam estar contaminadas e *e)* uma insuficiente higienização pessoal (5).

#### **1.6.4. Prevenção**

Se não forem tomadas medidas adequadas para entender e controlar a sua constante alteração epidemiológica e apresentação clínica, o MRSA pode tornar-se um grave problema de saúde pública no futuro próximo.

As infecções por MRSA podem ser prevenidas. A melhor prevenção é a lavagem das mãos. A lavagem minuciosa das mãos com água e sabão ou o uso de uma solução própria para desinfecção, previne a transferência de MRSA para outras pessoas ou ambientes. No hospital, a propagação de MRSA pode ser controlada através da implementação de medidas de controlo de infecções. A higienização das mãos, luvas, bata, máscaras e a manipulação adequada dos equipamentos utilizados pelos doentes e a roupa destes, têm um papel essencial na prevenção da transmissão de MRSA. Adicionalmente, são recomendadas precauções no contacto de pacientes com abscessos ou feridas que necessitem de ser drenadas. A prevenção da transmissão de MRSA entre os indivíduos na comunidade pode ser conseguida com a implementação de algumas medidas como a implementação de práticas de boa higiene pessoal, evitar a partilha de material pessoal, cobrir cortes e feridas, entre outras (5; 12; 35).







CAPÍTULO **2**

---

**Material e métodos**



## **CAPÍTULO 2:**

<b>2. Materiais e métodos</b> .....	<b>39</b>
2.1. Técnicas de genética molecular: .....	39
2.1.1. Extracção de DNA .....	40
2.1.2. Amplificação de genes por mPCR .....	41
2.1.3. Revelação dos produtos de PCR por electroforese .....	41
2.1.4. Tampões e soluções .....	42
<b>2.1.4.1. Ácido etilenodiaminotetra-acético (EDTA) 0,5 M pH 8,0</b> .....	<b>42</b>
<b>2.1.4.2. Tampões tris(hidroximetil)aminometano (TRIS)</b> .....	<b>42</b>
2.1.4.2.1. 10 x TRIS EDTA (TE) pH 7,6/pH 8,0 .....	42
2.1.4.2.2. TRIS-Ácido acético-EDTA (50x TAE) .....	42
2.1.4.2.3. Tampão de carregamento .....	43
<b>2.1.4.3. Lisozima (10 mg/mL)</b> .....	<b>43</b>
<b>2.1.4.4. Proteinase K (20 mg/mL)</b> .....	<b>43</b>
<b>2.1.4.5. RNase (1 mg/mL)</b> .....	<b>43</b>
<b>2.1.4.6. Acetato de sódio (3M pH 5,2)</b> .....	<b>43</b>
<b>2.1.4.7. Brometo de etídio (10 mg/mL)</b> .....	<b>44</b>
2.2. Método de susceptibilidade aos antimicrobianos: Método de difusão de disco Kirby-Bauer .....	45
2.2.1. Antibimicrobianos .....	45
2.2.2. Meios de cultura .....	47
<b>2.2.2.1. Meio Tryptic soy</b> .....	<b>47</b>
<b>2.2.2.2. Meio para ensaios de susceptibilidade aos antimicrobianos: Mueller-Hinton</b> .....	<b>47</b>
<b>2.2.2.3. Glicerol/TSB</b> .....	<b>47</b>
2.3. Tratamento estatístico .....	48



## 2. Materiais e métodos

---

No presente trabalho, o objectivo foi caracterizar geneticamente, durante o período de aproximadamente seis meses, os isolados clínicos de *S. aureus*, na região norte de Portugal e determinar o seu perfil de susceptibilidade a antimicrobianos. Para tal, foram recolhidas várias amostras provenientes de dois hospitais, o Hospital Santa Maria Maior (HSMM), em Barcelos, e o Hospital Pedro Hispano (HPH), em Matosinhos (Figura 12). O HSMM contribuiu com 45 isolados clínicos e o HPH com 68 isolados clínicos, perfazendo um total de 113.



Figura 12. Localização das unidades hospitalares de onde foram recolhidas os isolados clínicos em estudo.

1- Matosinhos, 2- Barcelos.

### 2.1. Técnicas de genética molecular:

Para determinar se os isolados clínicos eram portadores dos genes *mecA* e *lukFS-PV* foi utilizada a técnica de mPCR (*Multiplex Polymerase Chain Reaction*). A metodologia utilizada incluiu a extracção de DNA, amplificação dos genes por mPCR, a revelação dos produtos de mPCR em electroforese com gel de agarose e a documentação em fotografia digital.

### 2.1.1.Extracção de DNA

A extracção de DNA foi realizada pelo método de Fenol/Clorofórmio. Uma colónia isolada foi retirada de uma placa com meio *Tryptic soy agar* (TSA), e colocada a crescer em 5 mL de meio *Tryptic soy broth* (TSB) durante aproximadamente 6 horas, a 37 °C. Após este tempo foram retirados 0,5 mL de suspensão de células para um microtubo de 2,5 mL e centrifugados à velocidade máxima por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e foram adicionados 80 µL de Solução I (Tabela 5) e 20 µL de Lisozima (20mg/mL), seguindo-se forte agitação da suspensão, antes de ser colocada a incubar a 37 °C (com agitação durante 30 minutos). De seguida, adicionaram-se 80 µL de Solução II (Tabela 5) e 20 µL de Proteinase K (25 mg/mL), seguindo-se novamente forte agitação e posterior incubação a 56 °C (durante 1 hora, com agitação forte a meio da incubação). Após o período de incubação, adicionou-se um volume de Fenol/Clorofórmio (1:1) igual ao que se encontrava no tubo, seguindo-se uma centrifugação a 12 000 g. A parte superior foi retirada para um novo microtubo e o processo repetido duas vezes, utilizando-se na última Clorofórmio em vez da solução de Fenol/Clorofórmio (1:1). Após o processo, iniciou-se a precipitação do DNA através da adição 100 µL de 2,5 partes de Isopropanol a 100% a 2°C e 0,1 partes de Acetato de sódio (3M a pH 5,2). A amostra foi posteriormente colocada a 70°C durante 20 minutos ou a -20 °C overnight e, depois deste período, centrifugada durante 5 minutos, à velocidade máxima. Desprezou-se o sobrenadante e o precipitado foi lavado em Etanol a 70%. Após a lavagem, quando o precipitado secou, foi solubilizado em 40 µL de tampão 10 x TRIS EDTA (TE) com RNase (10µL/mL) e guardado a -70 °C até à sua utilização.

Tabela 5. Composição das soluções I e II para a extracção de DNA.

Solução	Composição
I	10 mM TRIS-Ácido clorídrico pH 8,0 0,1 M NaCl 1 mM EDTA, pH 8,0 5% Triton X
II	12 mM TRIS-HCl. pH 8,0 6 mM EDTA pH 8,0 0,5% SDS

Legenda: TRIS- Tampão *tris*(hidroximetil)aminometano; EDTA- Ácido etilenodiaminotetra-acético.

### 2.1.2. Amplificação de genes por mPCR

Os *primers* utilizados neste trabalho (Tabela 6) eram específicos para os genes *16S rRNA*, *mecA* e *lukFS-PV*. Além dos *primers* para os genes *mecA* e *lukFS-PV*, o *primer* da subunidade ribossomal 16S utilizado, encontra-se conservado e é específico para o género *Staphylococcus* servindo assim, como controlo interno da reacção de amplificação.

Tabela 6. Primers e condições de PCR utilizadas (36).

Primer	Sequência Oligonucleótidos (5'→3')	Tamanho (bp)	Tempo (segundos) Temperatura (°C)		
			Desnaturação	Annealing	Extensão
<i>Staph756<sub>FW</sub></i>	aac tct gtt att agg gaa gaa ca	756	45 s	45 s	75 s
<i>Staph756<sub>RV</sub></i>	cca cct tcc tcc ggt ttg tca cc		94 °C	55 °C	72 °C
<i>MecA<sub>FW</sub></i>	gta gaa atg act gaa cgt ccg ata a	310		(10 ciclos)	
<i>MecA<sub>RV</sub></i>	cca att cca cat tgt ttc ggt cta		45 s	45 s	75 s
<i>Luk-PV<sub>FW</sub></i>	atc att agg taa aat gtc tgg aca tga tcc a	433	94 °C	50 °C	72 °C
<i>Luk-PV<sub>RV</sub></i>	gca tca agt gta ttg gat agc aaa agc			(30 ciclos)	

O PCR foi realizado num volume reaccional de 25 µL (Tabela 7) contendo 2 µL de DNA da amostra nas condições descritas na tabela 6.

Tabela 7. Componentes com a respectiva concentração utilizados para a reacção de PCR (37).

Componente	Concentração
<i>PCR Buffer (10 x):</i>	
- 50 mM Cloreto de Potássio;	1 x
- 20 mM Tris-Ácido Clorídrico (pH=8,4)	
Cloreto de Magnésio	0,5 mM
dNTPs	0,2 mM
Primer FW	0,2 µM
Primer RV	0,2 µM
Taq DNA polimerase	1 U

Legenda: dNTPs- Desoxirribonucleotídeos fosfatados.

### 2.1.3. Revelação dos produtos de PCR por electroforese

Os produtos obtidos da reacção de PCR foram analisados por electroforese em agarose gel a 0,7 % e revelados com Brometo de etídio.

## **2.1.4. Tampões e soluções**

### **2.1.4.1. Ácido etilenodiaminotetra-acético (EDTA) 0,5 M pH 8,0**

O EDTA é um aditivo comum em muitos tampões que permite diminuir as interações intermoleculares mediadas pelos catiões divalentes e prevenir a desnaturação do DNA que parece ser facilitada pelos corantes, a uma força iónica baixa como por exemplo os tampões de aplicação da amostra nas técnicas electroforéticas (38; 39).

É recomendada a preparação de soluções mãe de EDTA a 0,5 M a pH 8,0 antes da preparação de outras soluções. Os passos de preparação incluem a adição de 186,1 g de EDTA disódico dihidratado a 800 mL de água destilada, seguida de vigorosa agitação. Após o ajuste do pH a 8,0 com Hidróxido de sódio (NaOH), a solução deve ser esterilizada por autoclavagem durante 15 minutos, a 121 °C. O EDTA não se dissolve até o seu pH chegar próximo de 8,0 (40).

### **2.1.4.2. Tampões tris(hidroximetil)aminometano (TRIS)**

O TRIS foi considerado o melhor tampão para electroforeses de DNA, RNA e proteínas (38). O TRIS está presente em vários tampões e pode ser preparado juntamente com vários tipos de aditivos diferentes, como por exemplo, o EDTA, Ácido acético, Ácido bórico, e detergentes como, por exemplo, o Dodecil sulfato de sódio (SDS), aditivos densos e viscosos, tais como a sacarose, glicerol (para tampões de carregamento), entre outros (38; 41).

A solução mãe de TRIS-HCl 1,0M a pH 7,6/8,0 pode ser preparada dissolvendo 1,21 g de TRIS em 800 mL de água destilada, ajustando-se de seguida o pH a 8,0 com Ácido clorídrico (HCl) 0,1 M (40).

#### **2.1.4.2.1. 10 x TRIS EDTA (TE) pH 7,6/pH 8,0**

A solução mãe de TE pH 7,6/pH 8,0 é preparada com 100 mM de TRIS-HCl pH 7,6/pH 8,0 e 10 mM de EDTA pH 8,0, sendo a solução posteriormente autoclavada durante 15 minutos a 121 °C para ser esterilizada (40).

#### **2.1.4.2.2. TRIS-Ácido acético-EDTA (50x TAE)**

A electroforese de ácidos nucleicos em gel de agarose ou poliacrilamida é geralmente realizada com tampões TBE (TRIS-Ácido bórico-EDTA) ou TAE (41). A preparação da solução mãe do tampão de electroforese TAE (50x TAE) foi realizada por dissolução de 242 g de TRIS, 57,1 mL de Ácido acético glacial, 100 mL de EDTA 0,5 M (pH 8,0) em água destilada, até perfazer o volume de 1 L. A esterilização da solução preparada foi feita por autoclavagem durante 15 minutos, a 121 °C (40).

#### 2.1.4.2.3. Tampão de carregamento

Na preparação do tampão de carregamento é comum utilizar, além do corante, um aditivo denso para reforçar o peso da amostra no gel de electroforese (38). A composição do tampão de carregamento usado foi de 0,25% (m/v) de azul de bromofenol e 40% (m/v) de sacarose em água destilada. O tampão carregamento foi mantido a 4º C (40).

#### 2.1.4.3. Lisozima (10 mg/mL)

A Lisozima (1,4-β-N-acetilmuramidase) é uma enzima que actua na hidrólise das ligações glicosídicas β 1,4 entre resíduos do ácido N-acetilmurâmico (*Mur2Ac*) e N-Acetil-D-glucosamina (*GlcNAc*) de bactérias, pois destrói o peptidoglicano, e por isto muito utilizada em vários protocolos de extracção de DNA. A preparação da Lisozima é feita imediatamente antes de ser dissolvida a uma concentração de 10 mg/mL em 10 mM TRIS-HCl pH 8,9 para que haja uma boa dissolução da enzima, sendo posteriormente armazenada a -20 °C (40).

#### 2.1.4.4. Proteinase K (20 mg/mL)

A Proteinase K é uma protease endolítica que cliva ligações peptídicas na parte carboxílica de aminoácidos alifáticos, aromáticos ou hidrofóbicos e foi classificada como uma protease de serina(42). Tem sido muito utilizada, como a Lisozima, em protocolos de biotecnologia para extracção de DNA de bactérias, células e tecidos (40). Esta enzima foi comprada já dissolvida com uma concentração de 20 mg/mL e armazenada em alíquotas a -20 °C(40).

#### 2.1.4.5. RNase (1 mg/mL)

A RNase A é uma endorribonuclease que degrada especificamente RNA de cadeia simples nos resíduos de citosina e uracilo. Cliva a ligação fosfodiéster entre a 5'-ribose de um nucleótido e o grupo fosfato ligado à 3'-ribose do nucleótido de pirimidina adjacente. O 2'-3'-fosfato cíclico é hidrolizado ao correspondente 3'-nucleósido (43). Tem sido utilizada para o isolamento de DNA, tanto plasmídico como genómico, livre de RNA. A preparação da solução de RNase com a concentração final de 1 mg/mL conseguiu-se através da dissolução de 1,5 mg de RNase em pó em 1,5 mL de tampão TE estéril pH 7,6.

#### 2.1.4.6. Acetato de sódio (3M pH 5,2)

O Acetato de sódio é usado para a precipitação alcoólica de DNA com etanol. É preparado através da dissolução de 408,3 g de Acetato de sódio trihidratado em 800 mL de água destilada

com ajustamento de pH a 5,2 com Acido acético glacial, sendo o volume ajustado a 1 L com água destilada. A posterior esterilização é feita por autoclavagem durante 15 minutos a 121 °C (40).

#### ***2.1.4.7. Brometo de etídio (10 mg/mL)***

O Brometo de etídio (EtBr) é usado para detectar tanto ácidos nucleicos em dupla cadeia, como em cadeia simples (44). A solução de trabalho é preparada pesando 0,01 g de EtBr para 1 mL de água destilada e agitada por algumas horas para assegurar que o corante se encontrava bem dissolvido. O microtubo onde se armazena a solução deve ser envolvido em alumínio e conservado em ambiente seco e escuro (40).

## **2.2. Método de susceptibilidade aos antimicrobianos: Método de difusão de disco Kirby-Bauer**

Quando um disco de papel de filtro impregnado com um determinado agente químico é colocado numa placa de Petri com agar, este irá difundir-se do disco para o agar. Esta difusão irá distribuir o agente químico no agar apenas em redor do disco em gradiente. A solubilidade do agente químico, bem como o seu tamanho molecular, irá determinar a área da infiltração do químico ao redor do disco. Se um organismo for colocado na placa de petri com o químico e este for susceptível ao químico, não irá crescer na área circundante do disco. Esta área em que não ocorre crescimento é denominada “zona de inibição”(45).

Muitos factores podem afectar o teste de susceptibilidade pelo método de difusão de disco. Durante a realização destes testes, vários parâmetros foram mantidos constantes para que apenas a zona de inibição variasse. As condições que devem ser mantidas constantes são o tipo de agar usado, a quantidade de organismo usado, a concentração do químico usado, bem como as condições de incubação, tais como o tempo, temperatura e atmosfera (46). A quantidade de organismo usada é obtida através de uma turbidez de 0,5 na escala de McFarland ou com uma densidade óptica entre 0,08 e 0,10 a 625 nm. Para os testes de susceptibilidade aos antimicrobianos, as concentrações de antimicrobiano estão predeterminadas e disponíveis comercialmente. Antes da visualização dos resultados deve proceder-se à incubação das placas de petri com os organismos e antimicrobianos a 35-37 °C por 18-24 horas (47).

O agar Mueller-Hinton é o meio de cultura recomendado para a generalidade de ensaios de difusão em disco de Kirby-Bauer. O diâmetro das zonas de inibição foi determinado usando tabelas do laboratório de referência Norte-Americano *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI). Com base nas tabelas de referência, os valores do diâmetro das zonas de inibição foram convertidos para a qualificação “Sensível”, “Intermediário” ou “Resistente”.

### **2.2.1. Antibimicrobianos**

Na tabela 8 descrevem-se os agentes antimicrobianos usados no presente estudo, bem como a quantidade de fármaco impregnada por disco. Estes antimicrobianos encontram-se agrupados pela classe em que estão inseridos.

Tabela 8. Resumo das classes dos agentes antimicrobianos utilizados, bem como das quantidades presentes em cada disco usado para o teste de susceptibilidade (47).

<i>Classe</i>	<i>Antimicrobiano</i>	<i>Quantidade por disco</i>
	Benzilpenicilina/Penicilina G	10 unidades
<i>Penicilinas</i>	Oxacilina	1 µg
	Ampicilina	10 µg
	Amoxicilina /Ácido clavulânico	30 µg
	Ampicilina / Sulbactamo	20 µg
	2ª Geração: Cefuroxima	30 µg
<i>Cefalosporinas</i>	2ª Geração: Cefaclor	30 µg
	3ª Geração: Cefotaxima	30 µg
	3ª Geração: Ceftriaxona	30 µg
<i>Cefamicinas</i>	Cefoxitina	30 µg
<i>Carbapenemos</i>	Imipenem	10 µg
<i>Glicopéptidos</i>	Teicoplanina	30 µg
	Vancomicina	30 µg
<i>Aminoglicosídeos</i>	Gentamicina	10 µg
	Tobramicina	10 µg
<i>Macrolídeos</i>	Eritromicina	15 µg
	Azitromicina	15 µg
	Claritromicina	15 µg
<i>Tetraciclina</i>	Tetraciclina	30 µg
<i>Lincosamidas</i>	Clindamicina	2 µg
<i>Sulfonamidas</i>	Linezolid	30 µg
<i>Quinolonas</i>	Levofloxacina	5 µg
	Moxifloxacina	5 µg
	Ciprofloxacina	5 µg
	Norfloxacina	10 µg
<i>Ansamidas</i>	Rifampicina	5 µg
<i>Nitrofuranos</i>	Nitrofurantoina	30 µg
<i>Sulfonamidas</i>	Trimetoprim/Sulfametoxazole	25 µg

## **2.2.2. Meios de cultura**

### **2.2.2.1. Meio Tryptic soy**

Os meios TSA e TSB são dos meios mais usados para cultivar vários tipos de microrganismos. O TSA é usado principalmente como meio de crescimento inicial para observação da morfologia das colónias, produzir uma cultura pura, obter um crescimento suficiente para posteriores testes bioquímicos e armazenamento de culturas (48; 49).

Foi utilizada uma apresentação comercial desidratada deste meio e a hidratação foi feita de acordo com as indicações do produto. A esterilização foi realizada por autoclavagem durante 15 minutos, a 121 °C e o pH confirmado a 7,3 antes da esterilização. O meio foi arrefecido até aos 55 °C, antes de ser distribuído pelas placas de Petri.

### **2.2.2.2. Meio para ensaios de susceptibilidade aos antimicrobianos: Mueller-Hinton**

O meio Mueller-Hinton agar é o meio recomendado pela *Food and Drug Administration* (FDA) e pelo *CLSI* para o método de difusão de antimicrobianos por disco na maioria das bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas, encontradas em material alimentar ou clínico. Este meio demonstra ter uma boa reprodutibilidade e taxas de crescimento satisfatórias para a maioria dos agentes patogénicos. Uma infusão de carne e caseína presente no meio fornecem compostos de azoto, vitaminas, carbono, enxofre e aminoácidos. É também adicionado amido para absorver os metabolitos tóxicos produzidos.

O meio Mueller-Hinton foi obtido comercialmente numa apresentação desidratada. A hidratação foi realizada de mediante as instruções do produto. A esterilização foi conseguida por autoclavagem durante 15 minutos, a 121 °C e o pH corrigido a 7,3 antes da esterilização. O meio foi arrefecido até aos 55 °C, antes de ser distribuído pelas placas de Petri.

### **2.2.2.3. Glicerol/TSB**

Este meio é descrito como adequado para o armazenamento de bactérias a -8 °C, uma vez que o glicerol actua como um agente criopreservante deixando as células vivas intactas (50). O congelamento desprotegido das bactérias, por norma, é letal não apenas para as bactérias como também para outras células e tecidos (50). Uma solução de 40 %(v/v) de glicerol foi preparada diluindo 4 volumes de glicerol em 6 volumes de água destilada. Depois, foi adicionado meio 2xTSB estéril em quantidades iguais à solução de glicerol. A solução foi esterilizada por autoclavagem durante 15 minutos, a 121 °C e armazenada a 4 °C até à sua utilização.

### **2.3. Tratamento estatístico**

Os resultados obtidos foram tratados estatisticamente, no software SPSS (versão 13.0 para Windows), através do test t de *student* para variáveis independentes (agentes antimicrobianos), com um nível de significância  $\leq 0,05$ . Os resultados são apresentados sob a forma de médias de frequência, com o respectivo erro padrão associado.





CAPÍTULO **3**

---

**Resultados**



### **CAPÍTULO 3**

<b>3. Resultados</b> .....	<b>55</b>
3.1. Caracterização genética .....	55
3.1.1. Caracterização por unidade hospitalar .....	56
3.1.2. Caracterização por sexo do paciente.....	57
3.2. Susceptibilidade a antimicrobianos .....	58
3.2.1. MSSA/MRSA.....	59
<b>3.2.1.1. Penicilinas</b> .....	<b>59</b>
<b>3.2.1.2. Cefalosporinas, Cefamicina e Carbapenemos</b> .....	<b>61</b>
<b>3.2.1.3. Glicopéptidos</b> .....	<b>62</b>
<b>3.2.1.4. Aminoglicosídeos, Macrolídeos, Tetraciclina e Oxazolidinonas</b> .....	<b>63</b>
<b>3.2.1.5. Quinolonas e Ansamínicos</b> .....	<b>65</b>
<b>3.2.1.6. Nitrofuranos e Sulfonamidas</b> .....	<b>66</b>
<b>3.2.1.7. Lincosamidas e indução da resistência pela Eritromicina</b> .....	<b>68</b>
3.2.2. PVL-/PVL+.....	69
<b>3.2.2.1. Penicilinas</b> .....	<b>69</b>
<b>3.2.2.2. Cefalosporinas, Cefamicinas e Carbapenemos</b> .....	<b>71</b>
<b>3.2.2.3. Glicopéptidos</b> .....	<b>72</b>
<b>3.2.2.4. Aminoglicosídeos, Macrolídeos, Tetraciclina e Oxazolidinonas</b> .....	<b>73</b>
<b>3.2.2.5. Quinolonas e Ansamínicos</b> .....	<b>75</b>
<b>3.2.2.6. Nitrofuranos e Sulfonamidas</b> .....	<b>76</b>
<b>3.2.2.7. Lincosamidas e resistência induzida pela Eritromicina</b> .....	<b>78</b>



# 3. Resultados

Nesta secção procedeu-se à caracterização dos 113 isolados clínicos, provenientes das duas unidades hospitalares que colaboraram neste estudo. Destes 113 isolados, 45 eram respectivos ao Hospital de Santa Maria Maior (HSMM), em Barcelos e 68 do Hospital Pedro Hispano (HPH).

Esta caracterização dividiu-se em duas partes. A primeira consistiu na caracterização dos isolados clínicos a nível genético, avaliando a sua frequência quanto ao local de origem da amostra e sexo do paciente. A segunda parte, consistiu na avaliação da susceptibilidade a vários antimicrobianos.

## 3.1. Caracterização genética

A caracterização genética das amostras foi realizada mediante a técnica de mPCR, nas condições descritas no capítulo anterior, com o objectivo de se obter a frequência dos genes *mecA* e *lukFS-PV* na amostra, responsáveis pela resistência à Meticilina e pela produção da proteína PVL, respectivamente. A utilização do gene *16S rRNA*, conservado no género estafilococos, foi importante para controlo interno das reacções de PCR (Figura 13).

A estatística descritiva dos resultados foi obtida através de tratamento no *software* SPSS.

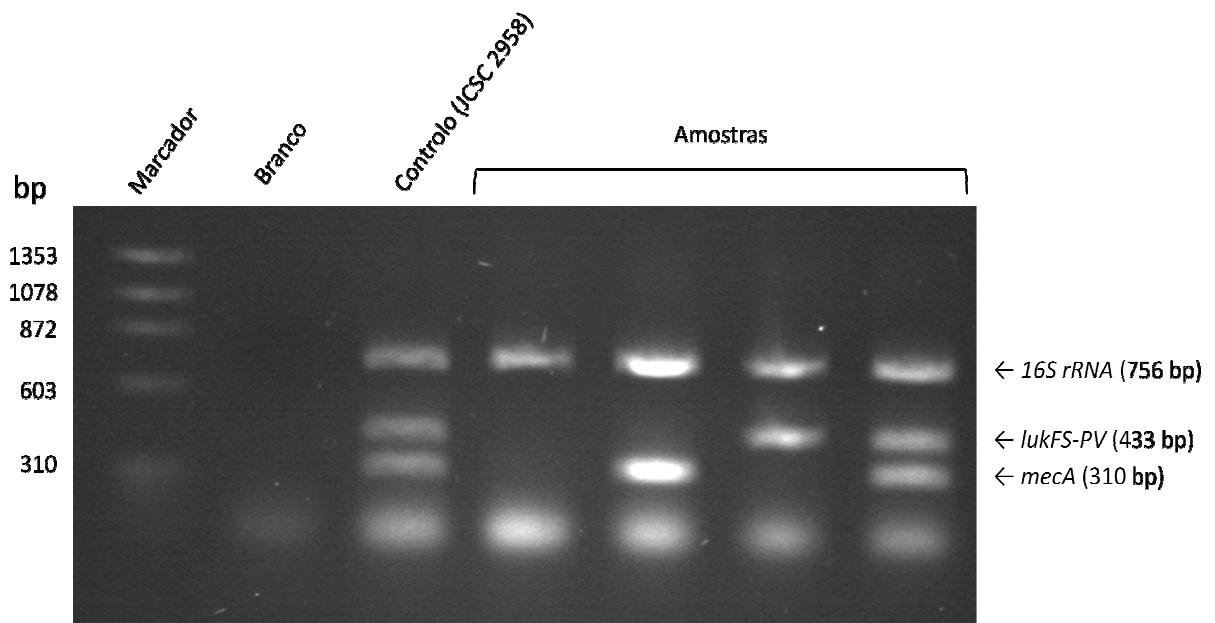


Figura 13. Gel de agarose gel a 0,7 % revelado com Brometo de etídio. Marcador: DNA Marker Lambda Hind III / phiX174 Hae III.

### 3.1.1. Caracterização por unidade hospitalar

Os resultados seguintes indicam a percentagem da frequência dos genes em estudo para as regiões de Barcelos e de Matosinhos.

Para o gene *mecA*, verificou-se que este é mais frequente no HPH (60%) do que no HSMM (29%) (Tabela 9).

Para o gene *lukFS-PV*, observou-se situação semelhante à do gene *mecA*. Verificou-se uma maior frequência deste gene no HPH (8%) do que no HSMM (2%), no entanto, são frequências muito menores que as observadas para o gene *mecA* (Figura 14).

Tabela 9. Percentagem da frequência dos genes *mecA* e *lukFS-PV* nas regiões de Barcelos e Matosinhos.

Unidade hospitalar	MSSA	MRSA	PVL
HSMM	71% (32/45)	29% (13/45)	2% (1/45)
HPH	40% (27/68)	60% (41/68)	8% (6/68)
Total	52% (59/113)	48% (54/113)	9% (7/113)

Legenda: MSSA- *Staphylococcus aureus* sensíveis à Meticilina; MRSA- *Staphylococcus aureus* resistentes à Meticilina, isolados portadores do gene *mecA*; PVL- Isolados portadores do gene *lukFS-PV*; HSSM-Hospital Santa Maria Maior, Barcelos; HPH-Hospital Pedro Hispano, Matosinhos.

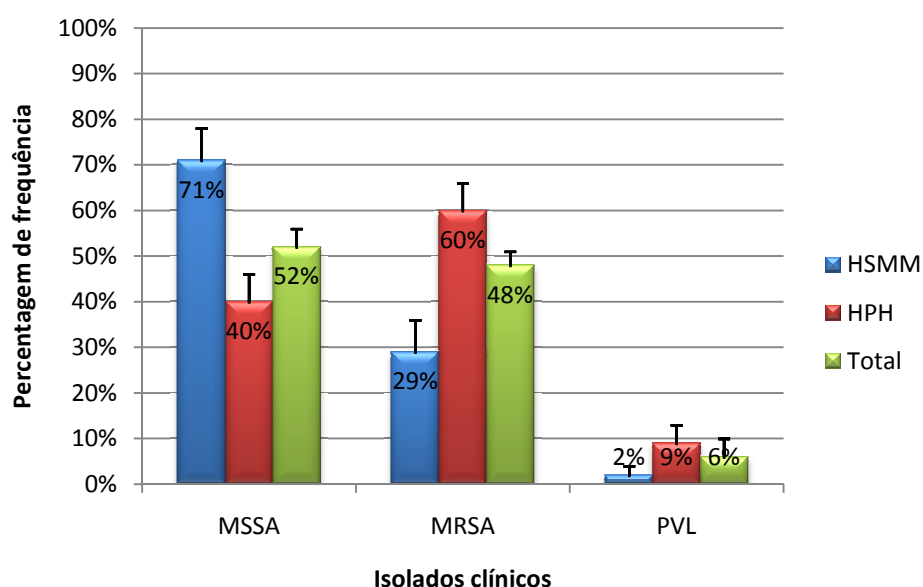


Figura 14. Percentagem da frequência dos genes *mecA* e *lukFS-PV* na amostra. MSSA- *Staphylococcus aureus* sensíveis à Meticilina; MRSA- *Staphylococcus aureus* resistentes à Meticilina, isolados portadores do gene *mecA*; PVL- Isolados portadores do gene *lukFS-PV*; HSSM-Hospital Santa Maria Maior, Barcelos; HPH-Hospital Pedro Hispano, Matosinhos.

### 3.1.2. Caracterização por sexo do paciente

Os resultados seguintes indicam a percentagem da frequência dos genes em estudo por sexo do paciente de onde as estirpes foram isoladas.

O gene *mecA* foi encontrado predominantemente em isolados clínicos provenientes de indivíduos do sexo masculino (59%) (Figura 15).

Relativamente ao gene *lukFS-PV*, observou-se tendência semelhante à verificada para o gene *mecA*. O gene *lukFS-PV* é também, mais frequente em indivíduos do sexo masculino (9%).

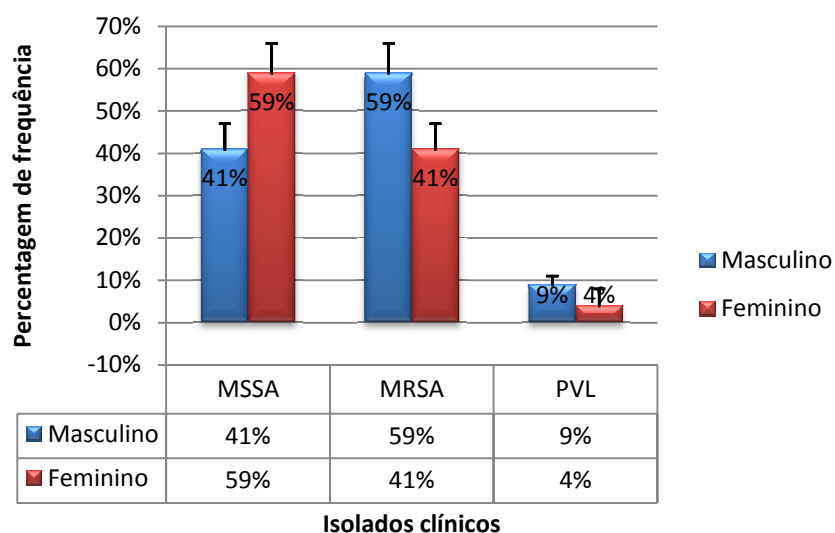


Figura 15. Percentagem de frequência dos genes *mecA* e *lukFS-PV* relativamente ao sexo dos pacientes. MSSA- *Staphylococcus aureus* sensíveis à Metilina; MRSA- *Staphylococcus aureus* resistentes à Metilina, isolados portadores do gene *mecA*; PVL- isolados portadores do gene *lukFS-PV*.

### 3.2. Susceptibilidade a antimicrobianos

A determinação da susceptibilidade a antimicrobianos foi efectuada através do Método de difusão de disco Kirby-Bauer. Os agentes antimicrobianos utilizados no presente estudo, pertencem a diferentes classes, tal como descrito no capítulo anterior (“Materiais e Métodos”). Para uma melhor organização e apresentação dos resultados obtidos, esta secção foi dividida em várias subsecções. O estudo da susceptibilidade aos antimicrobianos foi conduzido primeiramente tendo em conta o tipo de isolados. Assim, definiram-se dois grupos. O primeiro, em que foram analisados os isolados que não são portadores do gene *Meca*, e isolados portadores deste (MSSA e MRSA respectivamente). Seguidamente, foram analisados os isolados não portadores do gene *lukFS-PV* (PVL-) e isolados portadores do gene *lukFS-PV* (PVL+). Dentro de cada um destes grupos, foi estudada a susceptibilidade aos vários agentes antimicrobianos, organizando-se pela classe em que se inserem e mecanismo de acção.

A estatística descritiva dos resultados foi obtida, como anteriormente, através de tratamento estatístico no *software* SPSS. Para além do cálculo da média da frequência dos isolados resistentes a cada antimicrobiano, foi também realizado um teste t de *student* para comparar as respectivas médias de frequência entre os dois grupos. Para o teste de t de *student* utilizou-se como hipótese nula: “A média dos isolados MSSA ou PVL- resistentes ao antimicrobiano testado é igual à média dos isolados MRSA ou PVL+ resistentes ao mesmo antimicrobiano”. Como hipótese 1: “A média dos isolados MSSA ou PVL- resistentes ao antimicrobiano testado é menor à média dos isolados MRSA ou PVL+ resistentes ao mesmo antimicrobiano” e como hipótese 2: “A média dos isolados MSSA ou PVL- resistentes ao antimicrobiano testado é maior à média dos isolados MRSA ou PVL+ resistentes ao mesmo antimicrobiano”.

A figura 16 mostra exemplos das placas de Petri utilizadas para os testes de susceptibilidade aos vários agentes antimicrobianos. Dependendo do isolado e dos agentes antimicrobianos utilizados podem observar-se situações de susceptibilidade ou de resistência.

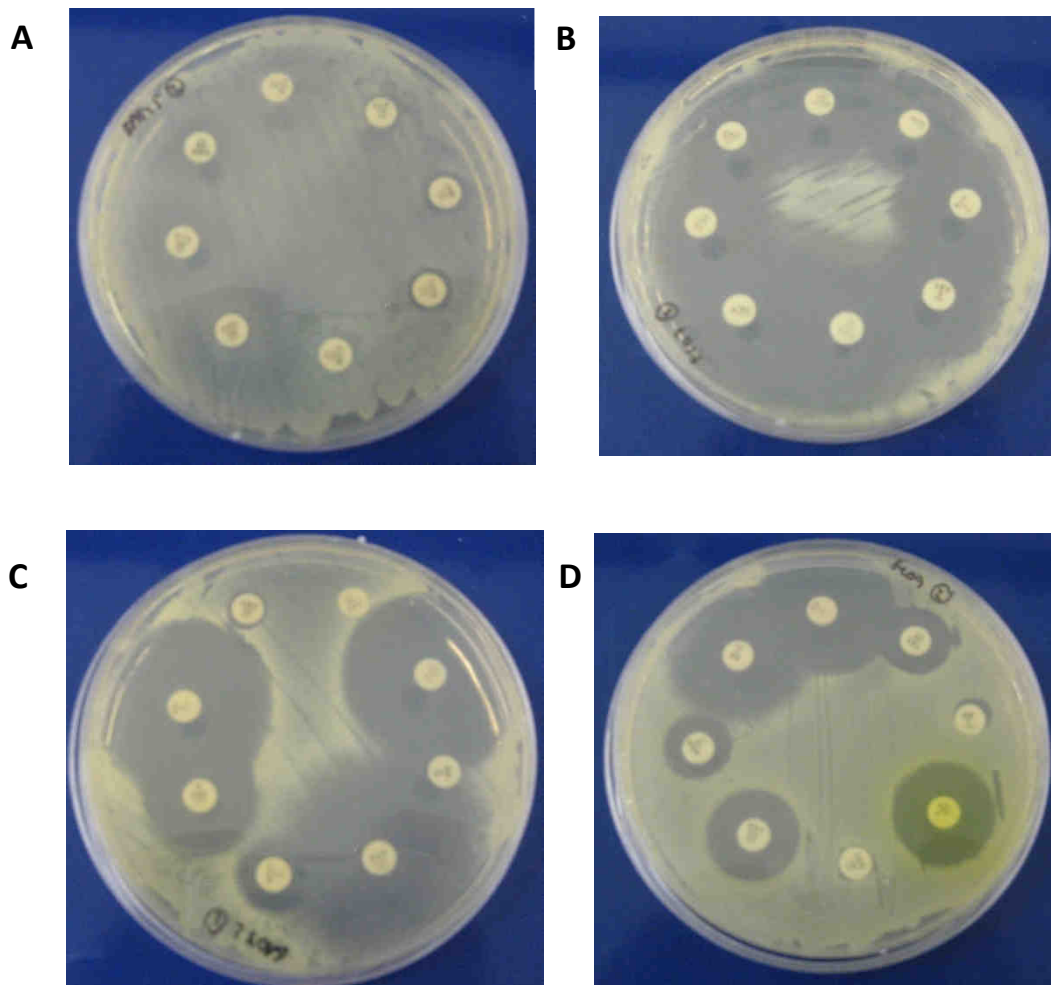


Figura 16. Placas de Petri utilizadas para o teste de susceptibilidade a antimicrobianos onde se pode observar A- uma total resistência do isolado aos antimicrobianos utilizados; B- susceptibilidade do isolado aos antimicrobianos utilizados; C- susceptibilidade e resistência do isolado, dependendo dos antimicrobianos utilizados; D- susceptibilidade e resistência do isolado, dependendo dos antimicrobianos utilizados.

### 3.2.1. MSSA/MRSA

#### 3.2.1.1. Penicilinas

Os agentes antimicrobianos pertencentes a esta classe são inibidores da síntese da parede celular da bactéria (2).

Os resultados seguintes indicam que, para as estirpes MSSA, a percentagem de isolados resistentes às Penicilinas é relativamente baixa, excepto no caso da Benzilpenicilina/Penicilina G e Ampicilina onde a percentagem é de aproximadamente 80% (Tabela 10 e Figura 17).

No que concerne aos isolados MRSA, os resultados indicam uma elevada resistência por parte destas estirpes às Penicilinas (sempre acima dos 80%), havendo no total dos isolados, 95% que são resistentes a toda a classe.

Tabela 10. Percentagens de isolados MSSA e MRSA resistentes aos agentes antimicrobianos da classe das Penicilinas.

Isolados	Agente antimicrobiano				
	Penicilinas			Penicilinas + Inibidor $\beta$ -lactamase	
	AMP	P	OX	AMC	AMS
MSSA	81% (22/27)	78% (43/55)	2% (1/55)	24% (13/55)	16% (9/55)
MRSA	98% (40/41)	96% (52/54)	98% (53/54)	85% (46/54)	82% (44/54)

Legenda: AMP- Ampicilina; P- Benzilpenicilina/Penicilina G; OX- Oxacilina; AMC- Amoxicilina/Ácido clavulânico; AMS- Ampicilina/Sulbactamo; MSSA- *Staphylococcus aureus* sensíveis à Metecilina; MRSA- *Staphylococcus aureus* resistentes à Metecilina.

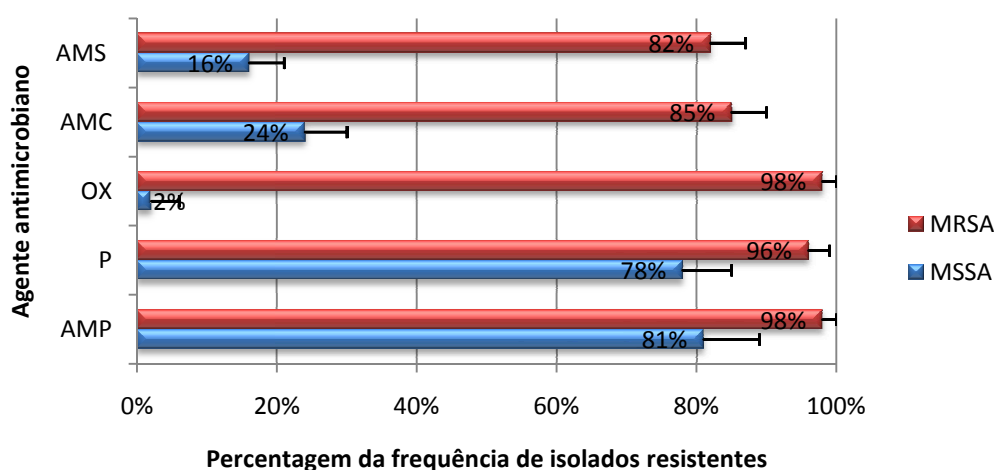


Figura 17. Percentagens de isolados MSSA e MRSA resistentes aos agentes antimicrobianos da classe das Penicilinas. Penicilinas: P- Benzilpenicilina/Penicilina G; OX- Oxacilina; AMP- Ampicilina; Penicilinas com inibidor  $\beta$ -lactamase: AMC- Amoxicilina/Ácido clavulânico; AMS- Ampicilina/Sulbactamo; MSSA- *Staphylococcus aureus* sensíveis à Metecilina; MRSA- *Staphylococcus aureus* resistentes à Metecilina.

Para um nível de confiança de 95%, existe evidência estatística, que permite aceitar a hipótese de que para todos os agentes antimicrobianos usados, a média dos isolados MSSA resistentes é menor que a média dos isolados MRSA resistentes.

### 3.2.1.2. Cefalosporinas, Cefamicina e Carbapenemos

As cefalosporinas, cefamicinas e carbapenemos são, à semelhança das penicilinas, antimicrobianos pertencentes aos antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos sendo, por isso, inibidores da síntese da parede celular da bactéria (2).

Os resultados obtidos no presente estudo, relativamente ao perfil de susceptibilidade das classes das Cefalosporinas, Cefamicinas e Carbapenemos, indicam um baixo número de MSSA resistentes a qualquer dos agentes antimicrobianos testados. Assim, observaram-se índices de 18% de estirpes MSSA resistentes às Cefalosporinas, 27 % para as Cefamicinas e de 9% para os Carbapenemos (Tabela 11).

No caso dos isolados MRSA, pode observar-se uma elevada taxa de estirpes resistentes a qualquer um dos agentes antimicrobianos utilizados, com percentagens de estirpes resistentes superiores a 80% (Figura 18).

Tabela 11. Percentagens de isolados MSSA e MRSA resistentes aos agentes antimicrobianos da classe das Cefalosporinas, Cefamicinas e Carbapenemos.

Isolados	Agente antimicrobiano					
	Cefalosporinas				Cefamicinas	Carbapenemos
	CXM	CEC	CTX	CRO	FOX	IPM
MSSA	20% (11/55)	20% (11/55)	20% (11/55)	25% (14/55)	27% (15/55)	9% (5/55)
MRSA	83% (45/54)	87% (47/54)	81% (44/54)	85% (46/54)	89% (48/54)	80% (43/54)

Legenda: CXM- Cefuroxima; CEC- Cefaclor; CTX- Cefotaxima; CRO- Ceftriaxona; FOX- Cefoxitina; IPM- Imipenemo; MSSA- *Staphylococcus aureus* sensíveis à Metilina; MRSA- *Staphylococcus aureus* resistentes à Metilina.

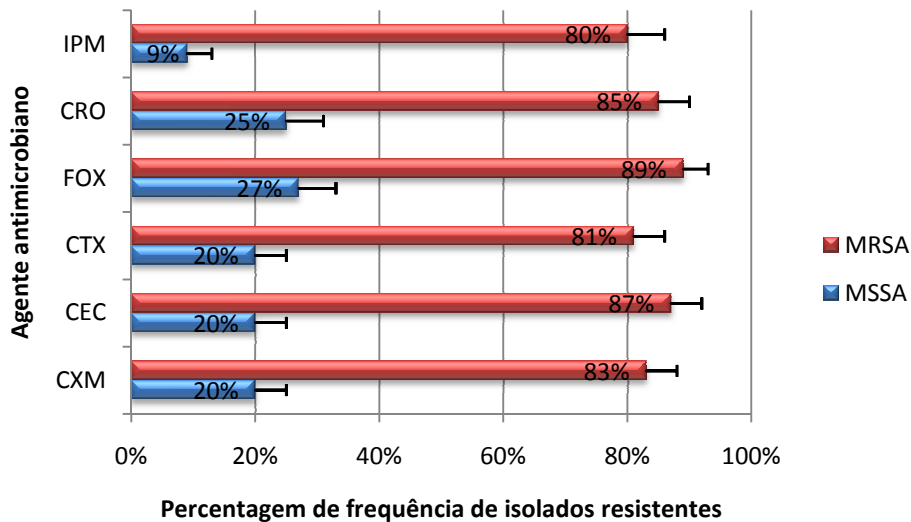


Figura 18. Percentagens de isolados MSSA e MRSA resistentes aos agentes antimicrobianos da classe das Cefalosporinas, Cefamicinas e Carbapenemos. Cefalosporinas: CXM- Cefuroxima; CEC- Cefaclor; CTX- Cefotaxima; CRO- Ceftriaxona; Cefamicinas: FOX- Cefoxitina; Carbapenemos: IPM- Imipenemo; MSSA- *Staphylococcus aureus* sensíveis à Metilina; MRSA- *Staphylococcus aureus* resistentes à Metilina.

Para um nível de confiança de 95%, existe evidência estatística, que permite aceitar a hipótese de que para todos os agentes antimicrobianos utilizados, a média dos isolados MSSA resistentes é menor que a média dos isolados MRSA resistentes.

### 3.2.1.3. Glicopéptidos

Os agentes antimicrobianos pertencentes à classe dos Glicopéptidos, à semelhança dos  $\beta$ -lactâmicos, são também, inibidores da síntese da parede celular na bactéria (2).

Os resultados obtidos no presente estudo relativamente ao perfil de susceptibilidade da Teicoplanina e Vancomicina indicam que para ambos existe um índice de isolados MSSA e MRSA resistentes muito baixo, de 4% e 2% respectivamente (Tabela 12 e Figura 19).

Tabela 12. Percentagens de isolados MSSA e MRSA resistentes aos agentes antimicrobianos da classe dos Glicopéptidos.

Isolados	Agente antimicrobiano	
	Glicopéptidos	
	TEC	VA
MSSA	2% (1/55)	2% (1/55)
MRSA	4% (2/54)	4% (2/54)

Legenda: TEC- Teicoplanina; VA- Vancomicina; MSSA- *Staphylococcus aureus* sensíveis à Metilina; MRSA- *Staphylococcus aureus* resistentes à Metilina.

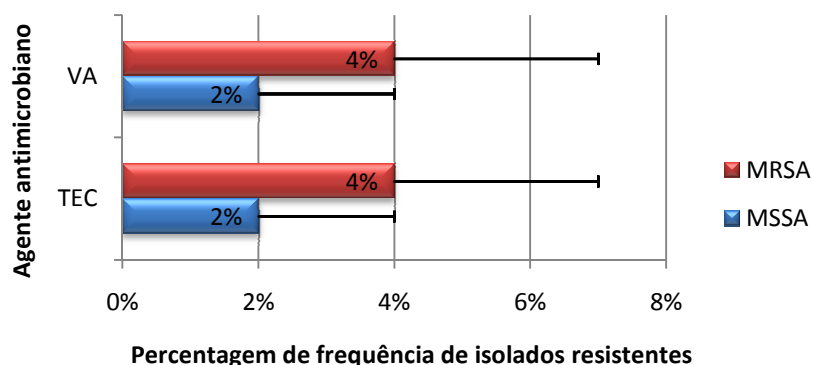


Figura 19. Percentagens de isolados MSSA e MRSA resistentes aos agentes antimicrobianos da classe dos Glicopéptidos. TEC- Teicoplanina; VA- Vancomicina; MSSA- *Staphylococcus aureus* sensíveis à Metilina; MRSA- *Staphylococcus aureus* resistentes à Metilina.

Para um nível de confiança de 95%, existe evidência estatística, que permite aceitar a hipótese que para ambos os agentes antimicrobianos utilizados, a média dos isolados MSSA resistentes é menor que a média dos isolados MRSA resistentes.

#### 3.2.1.4. Aminoglicosídeos, Macrolídeos, Tetraciclínas e Oxazolidinonas

Os agentes antimicrobianos pertencentes ao grupo dos Aminoglicosídeos, Macrolídeos, Tetraciclínas e Oxazolidinonas são potentes inibidores da síntese proteica, através da sua ligação aos ribossomas das bactérias (2).

No que concerne à susceptibilidade a estes antimicrobianos, os isolados MRSA possuem maiores níveis de resistência do que os MSSA (Tabela 13 e Figura 20).

Os MSSA apresentam níveis muito baixos de estirpes resistentes (entre os 0 e 9%) para todas as classes, excepto para a classe dos Macrolídeos, em que a quantidade de isolados resistentes pode atingir os 50%. De maneira semelhante, verifica-se o mesmo cenário para os isolados MRSA. Contudo, é possível observar um maior número de isolados resistentes a estes grupos de antimicrobianos, comparativamente com os MSSA.

De referir que, tanto nos MSSA, como nos MRSA, ocorre uma susceptibilidade total no caso das Oxazolidinonas (0% de isolados resistentes).

Tabela 13. Percentagens de isolados MSSA e MRSA resistentes aos agentes antimicrobianos da classe dos Aminoglicosídeos, Macrolídeos, Tetraciclina e Oxazolidinonas.

Isolados	Agente antimicrobiano						
	Aminoglicosídeos		Macrolídeos			Tetraciclina	Oxazolidinonas
	CN	TOB	E	AZM	CLR	TCT	LZD
MSSA	4% (2/54)	9% (5/55)	45% (25/55)	50% (28/55)	35% (19/55)	7% (2/27)	0% (0/55)
MRSA	20% (11/54)	43% (23/54)	80% (43/54)	78% (42/54)	72% (39/54)	10% (4/41)	0% (0/54)

Legenda: CN- Gentamicina; TOB- Tobramicina; E- Eritromicina; AZM- Azitromicina; CLR- Claritromicina; TCT- Tetraciclina; LZD- Linezolide; MSSA- *Staphylococcus aureus* sensíveis à Meticilina; MRSA- *Staphylococcus aureus* resistentes à Meticilina.

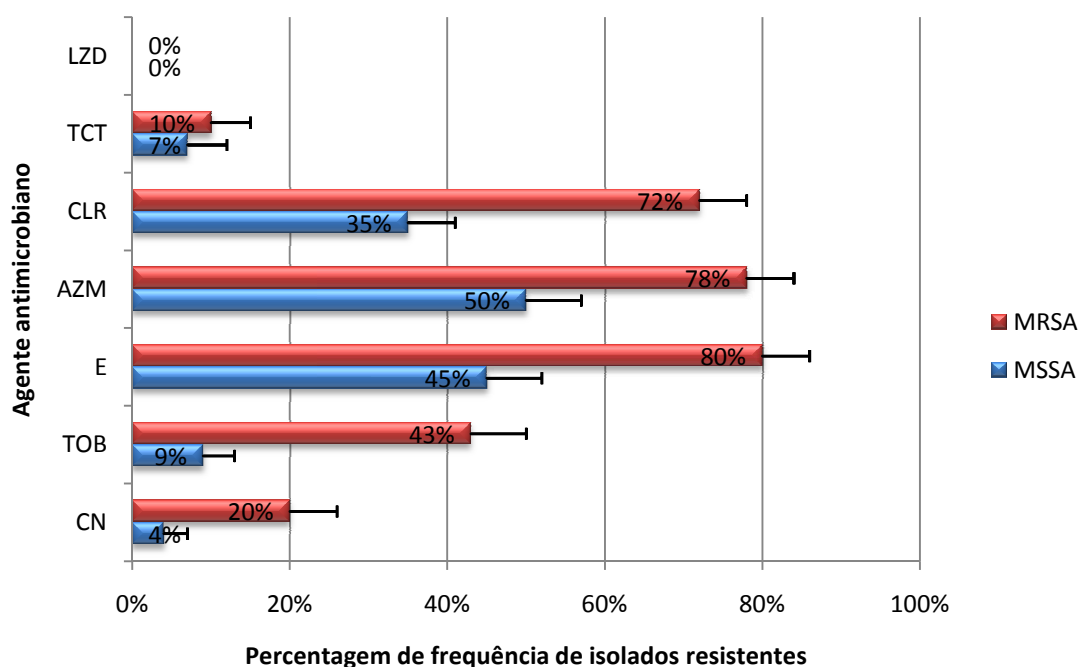


Figura 20. Percentagens de isolados MSSA e MRSA resistentes aos agentes antimicrobianos da classe dos Aminoglicosídeos, Macrolídeos, Tetraciclina e Oxazolidinonas. Aminoglicosídeos: CN- Gentamicina; TOB- Tobramicina; Macrolídeos: E- Eritromicina; AZM- Azitromicina; CLR- Claritromicina; Tetraciclina: TCT- Tetraciclina; Oxazolidinonas: LZD- Linezolide; MSSA- *Staphylococcus aureus* sensíveis à Meticilina MRSA- *Staphylococcus aureus* resistentes à Meticilina.

Para um nível de confiança de 95%, existe evidência estatística, que permite aceitar a hipótese que para todos os agentes antimicrobianos utilizados, a média dos isolados MSSA resistentes é menor que a média dos isolados MRSA resistentes a todos estes antimicrobianos.

### 3.2.1.5. Quinolonas e Ansamicinas

Os agentes antimicrobianos pertencentes às classes das Quinolonas e Ansamicinas são inibidores da síntese de DNA (2).

Os resultados apresentados a seguir indicam que para os MSSA, a quantidade de isolados resistentes às Quinolonas são baixos, variando entre os 20% para a Levofloxacina e os 33% para a Norfloxacina. Para a Rifampicina, pertencente à classe das Ansamicinas, a percentagem de isolados resistentes é de 9% (Tabela 14 e Figura 21).

Para as Quinolonas, a quantidade de isolados MRSA resistentes são medianos, tanto para a Levofloxacina, a Moxifloxacina e como para a Ciprofloxacina. No caso da Norfloxacina observou-se um aumento no índice de isolados resistentes (69%), relativamente aos outros agentes antimicrobianos pertencentes à mesma classe. Para a classe das Ansamicinas, verificou-se que a taxa de isolados resistentes era baixa, tal como nos MSSA, havendo no entanto, um índice maior de isolados resistentes nos MSSA (9%) que nos MRSA (6%).

Tabela 14. Percentagens de isolados MSSA e MRSA resistentes aos agentes antimicrobianos da classe das Quinolonas e Ansamicinas.

Isolados	Agente antimicrobiano				
	Quinolonas				Ansamicinas
	LEV	MXF	CIP	NOR	RD
MSSA	20% (11/55)	20% (11/55)	24% (13/55)	33% (18/54)	9% (5/55)
MRSA	54% (29/54)	44% (24/54)	57% (31/54)	69% (37/54)	6% (3/54)

Legenda: LEV- Levofloxacina; MXF- Moxifloxacina; CIP- Ciprofloxacina; NOR- Norfloxacina; RD- Rifampicina; MSSA- *Staphylococcus aureus* sensíveis à Metilina; MRSA- *Staphylococcus aureus* resistentes à Metilina.

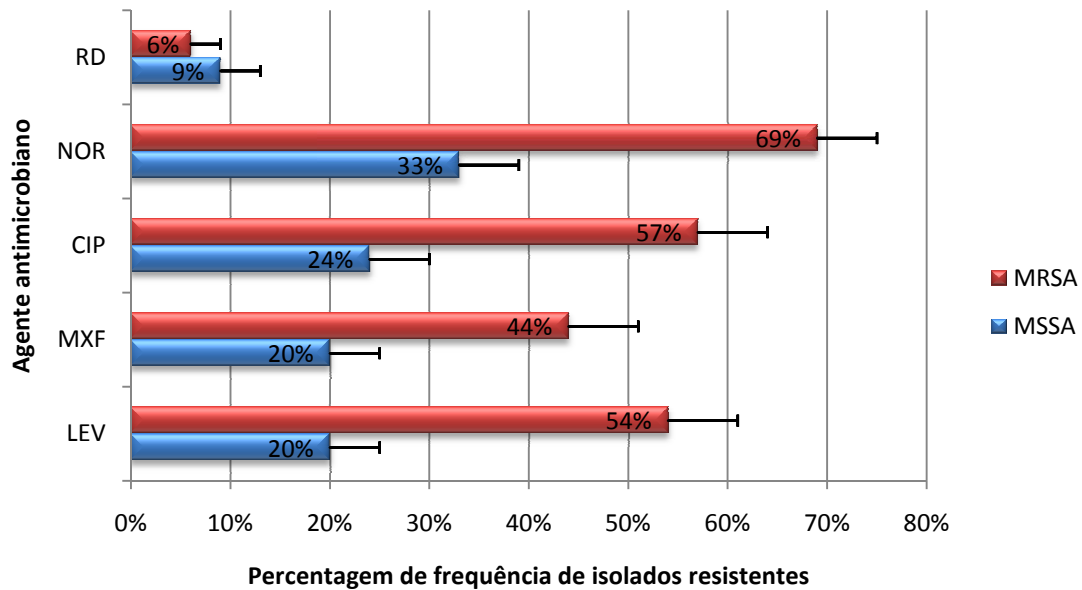


Figura 21. Percentagens de isolados MSSA e MRSA resistentes aos agentes antimicrobianos da classe das Quinolonas e Ansamícinas. Quinolonas: LEV- Levofloxacina; MXF- Moxifloxacina; CIP- Ciprofloxacina; NOR- Norfloxacina; Ansamícinas: RD- Rifampicina; MSSA- *Staphylococcus aureus* sensíveis à Metilicina; MRSA- *Staphylococcus aureus* resistentes à Metilicina.

Para um nível de confiança de 95%, existe evidência estatística, que permite aceitar a hipótese que para quase todos os agentes antimicrobianos utilizados, a média dos isolados MSSA resistentes é menor que a média dos isolados MRSA resistentes. A única exceção surge para o caso da Rifampicina em que é aceita a hipótese alternativa. Ou seja, a média dos isolados MSSA resistentes à Rifampicina é maior que a média dos isolados MRSA resistentes a esta.

### 3.2.1.6. Nitrofuranos e Sulfonamidas

Os Nitrofuranos e a Sulfonamidas são considerados agentes antimetabólicos. Os antimicrobianos pertencentes à classe dos Nitrofuranos são inibidores do ciclo de Krebs, ao passo que os antimicrobianos pertencentes à classe das Sulfonamidas são inibidores da síntese do folato (51).

Os resultados apresentados a seguir indicam que, tanto para os nitrofuranos, como para as Sulfonamidas, a porcentagem de isolados MSSA e MRSA resistentes são muito baixos. A única exceção verificou-se para a combinação Trimetoprim/Sulfametoxazole, onde se verifica um ligeiro aumento da quantidade de isolados MRSA resistentes (17%) (Tabela 15 e Figura 22).

Relativamente à Nitrofurantoina, e apesar de a diferença ser mínima, observou-se novamente, uma maior percentagem de isolados MSSA resistentes (4%) comparativamente com os MRSA (2%).

Tabela 15. Percentagens de isolados MSSA e MRSA resistentes aos agentes antimicrobianos da classe dos Nitrofuranos e Sulfonamidas.

Isolados	Agente antimicrobiano	
	Nitrofuranos	Sulfonamidas
	F	SXT
MSSA	4% (2/54)	2% (1/55)
MRSA	2% (1/54)	17% (9/54)

Legenda: SXT- Trimetoprim/Sulfametoxazole; F- Nitrofurantoina; MSSA- *Staphylococcus aureus* sensíveis à Metecilina; MRSA- *Staphylococcus aureus* resistentes à Metecilina.

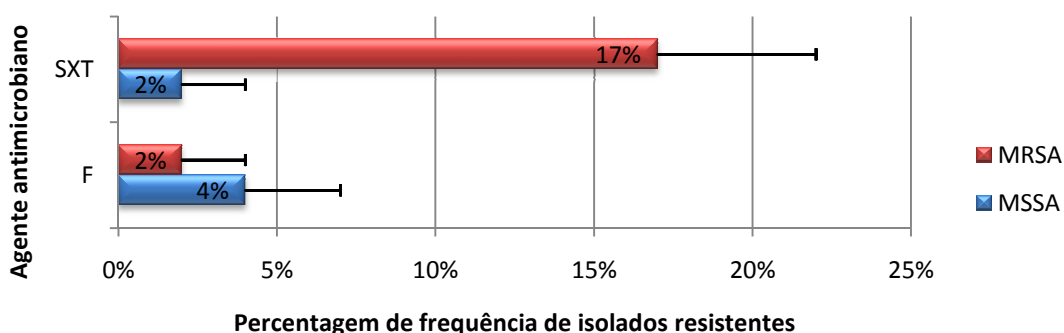


Figura 22. Percentagens de isolados MSSA e MRSA resistentes aos agentes antimicrobianos da classe dos Nitrofuranos e Sulfonamidas. Nitrofuranos: SXT- Trimetoprim/Sulfametoxazole; Sulfonamidas: F- Nitrofurantoina; MSSA- *Staphylococcus aureus* sensíveis à Metecilina; MRSA- *Staphylococcus aureus* resistentes à Metecilina.

Para um nível de confiança de 95%, existe evidência estatística, que permite aceitar a hipótese de que, para o caso do Trimetoprim/Sulfametoxazole, a média dos isolados MSSA resistentes é menor que a média dos isolados MRSA resistentes. Para o caso da Nitrofurantoina é aceite a hipótese alternativa: a média dos isolados MSSA resistentes é maior que a média dos isolados MRSA resistentes à Nitrofurantoina.

### 3.2.1.7. Lincosamidas e indução da resistência pela Eritromicina

Os agentes antimicrobianos pertencentes à classe das Lincosamidas são inibidores da síntese proteica, através da sua ligação aos ribossomas das bactérias (2).

Pela análise dos resultados apresentados a seguir, observou-se uma quantidade significativa de isolados MRSA resistentes à Lincosamida (67%). Os isolados MSSA são os que se apresentam menos resistentes a este grupo de antimicrobianos (29%) (Tabela 16 e Figura 23).

Relativamente à Clindamicina, induzida pela Eritromicina, verifica-se que a percentagem de isolados onde este fenómeno se observou é menor nos MSSA (27%) do que nos MRSA (43%).

Tabela 16. Percentagens de isolados MSSA e MRSA resistentes ao agente antimicrobiano da classe das Lincosamidas e resistência induzida desta pela eritromicina.

Isolados	Agente antimicrobiano		
	Lincosamidas	Macrolídeo	Resistência DA induzida por E
	DA	E	
MSSA	29% (16/55)	45% (25/55)	27% (15/55)
MRSA	67% (36/54)	80% (43/53)	43% (23/54)

Legenda: DA- Clindamicina; E-Eritromicina; MSSA- *Staphylococcus aureus* sensíveis à Metilina; MRSA- *Staphylococcus aureus* resistência à Metilina.

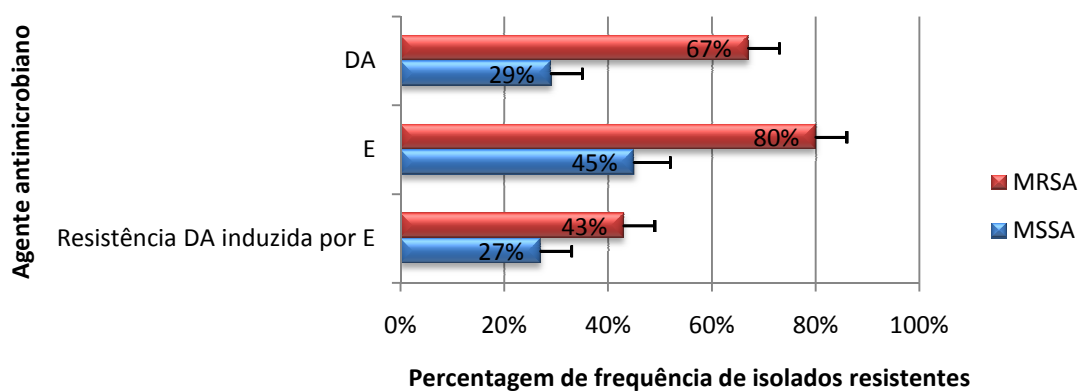


Figura 23. Percentagens de isolados MSSA e MRSA resistentes ao agente antimicrobiano da classe das Lincosamidas e indução da resistência pela Eritromicina. DA- Clindamicina; E-Eritromicina; MSSA- *Staphylococcus aureus* sensíveis à Metilina; MRSA- *Staphylococcus aureus* resistentes à Metilina.

A figura 24 representa, um caso de indução da resistência da Clindamicina pela Eritromicina (chamado halo “D”) e um caso onde não ocorre indução da resistência da Clindamicina, respectivamente.

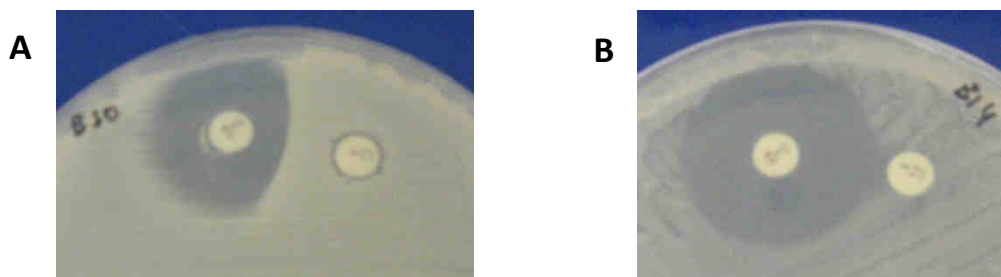


Figura 24. A- Caso em que se observa indução da resistência da Clindamicina pela Eritromicina; B- Caso em que não se observa indução da resistência da Clindamicina pela Eritromicina; À direita situa-se o antimicrobiano Clindamicina e à esquerda o antimicrobiano Eritromicina.

Para um nível de confiança de 95%, existe evidência estatística, que permite aceitar a hipótese de que para todos os testes realizados, a média dos isolados MSSA resistentes é menor que media dos isolados MRSA resistentes.

### 3.2.2. PVL-/PVL+

#### 3.2.2.1. Penicilinas

Os resultados seguintes para os isolados portadores do gene *lukFS-PV*, indicam uma heterogeneidade relativamente à resposta das estirpes em estudo aos agentes antimicrobianos utilizados.

Assim, pode observar-se que os isolados portadores do gene *lukFS-PV* são em grande parte resistentes às Penicilinas propriamente ditas (Benzilpenicilina/Penicilina G, Ampicilina e Oxacilina). Observam-se ainda diferenças na resposta dos isolados portadores do *lukFS-PV*, relativamente à combinação das penicilinas com os inibidores de  $\beta$ -lactamases. Os resultados mostram que a combinação Ampicilina/Sulbactamo é mais eficiente contra os PVL+ (29% de

isolados resistentes) do que com a combinação Amoxicilina/Ácido clavulânico em que a quantidade de isolados resistentes ascende aos 57%. Para a Oxacilina observou-se uma percentagem de resistência de 43% das estirpes PVL+ (Tabela 17).

Relativamente aos isolados PVL-, observou-se que estes apresentam percentagens de frequência muito elevadas. A menor percentagem obtida foi de 54% para a combinação Amoxicilina/Ácido clavulânico. Verificou-se também uma percentagem de 100% para os antimicrobianos Ampicilina e Penicilina (Figura 25).

Tabela 17. Percentagens de isolados PVL- e PVL+ resistentes aos agentes antimicrobianos da classe das Penicilinas.

Isolados	Agente antimicrobiano				
	Penicilinas			Penicilina + Inibidor da $\beta$ -lactamase	
	AMP	P	OX	AMC	AMS
PVL-	90% (56/62)	86% (88/102)	55% (56/102)	54% (55/102)	50% (51/102)
PVL+	100% (6/6)	100% (7/7)	43% (3/7)	57% (4/7)	29% (2/7)

Legenda: AMP- Ampicilina; P- Benzilpenicilina/Penicilina G; OX- Oxacilina; AMC- Amoxicilina/Ácido clavulânico; AMS- Ampicilina/Sulbactamo; PVL- - Isolados não portadores do gene *lukFS-PV* ; PVL+ - Isolados portadores do gene *lukFS-PV*.

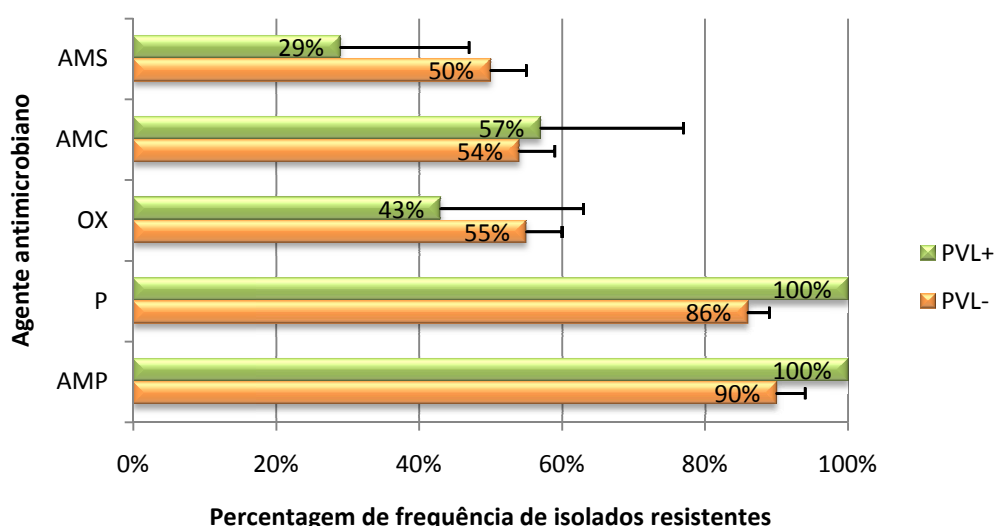


Figura 25. Percentagens de isolados PVL- e PVL+ resistentes aos agentes antimicrobianos da classe das Penicilinas. Penicilinas: AMP- Ampicilina; P- Benzilpenicilina/Penicilina G; OX- Oxacilina; Penicilina com inibidor da  $\beta$ -lactamase: AMC- Amoxicilina/Ácido clavulânico; AMS- Ampicilina/Sulbactamo; PVL- - Isolados não portadores do gene *lukFS-PV*; PVL+ - Isolados portadores do gene *lukFS-PV*.

Para um nível de confiança de 95%, existe evidência estatística, que permite aceitar a hipótese de que a média dos isolados PVL- resistentes para os agentes antimicrobianos Ampicilina, Penicilina e Amoxicilina/Ácido clavulânico é menor que a média dos isolados PVL+ resistentes. Para os agentes antimicrobianos Oxacilina e Ampicilina/Sulbactamo aceita-se a hipótese que a média dos isolados PVL- resistentes é maior que a média dos isolados PVL+ resistentes.

### 3.2.2.2. Cefalosporinas, Cefamicinas e Carbapenemos

Os resultados seguintes indicam que a quantidade de isolados PVL+ resistentes a este grupo de antimicrobianos varia entre 29% de estirpes resistentes às Cefalosporinas, Cefuroxima, Cefotaxima e ao carbapenemo Imipenemo até 57% de estirpes resistentes à cefalosporina Cefaclor e à Cefamicina Cefoxitina (Tabela 18).

Relativamente aos isolados PVL- observou-se que estes apresentam, excepto no caso do antimicrobiano Cefaclor, percentagens de frequência de isolados resistentes maiores que os isolados PVL+ (Figura 26).

**Tabela 18.** Percentagens de isolados PVL- e PVL+ resistentes aos agentes antimicrobianos das classes das Cefamicinas e Carbapenemos e Glicopéptidos.

<i>Isolados</i>	<b>Agente antimicrobiano</b>					
	<i>Cefalosporinas</i>				<i>Cefamicinas</i>	<i>Carbapenemos</i>
	<b>CXM</b>	<b>CEC</b>	<b>CTX</b>	<b>CRO</b>	<b>FOX</b>	<b>IPM</b>
<i>PVL-</i>	53% (54/102)	53% (54/102)	52% (53/102)	56% (57/102)	58% (58/102)	45% (46/102)
<i>PVL+</i>	29% (2/7)	57% (4/7)	29% (2/7)	43% (3/7)	57% (4/7)	29% (2/7)

**Legenda:** CXM- Cefuroxima; CEC- Cefaclor; CTX- Cefotaxima; CRO- Ceftriaxona; FOX- Cefoxitina; IPM- Imipenemo; PVL- - Isolados não portadores do gene *lukFS-PV* ; PVL+ - Isolados portadores do gene *lukFS-PV*.

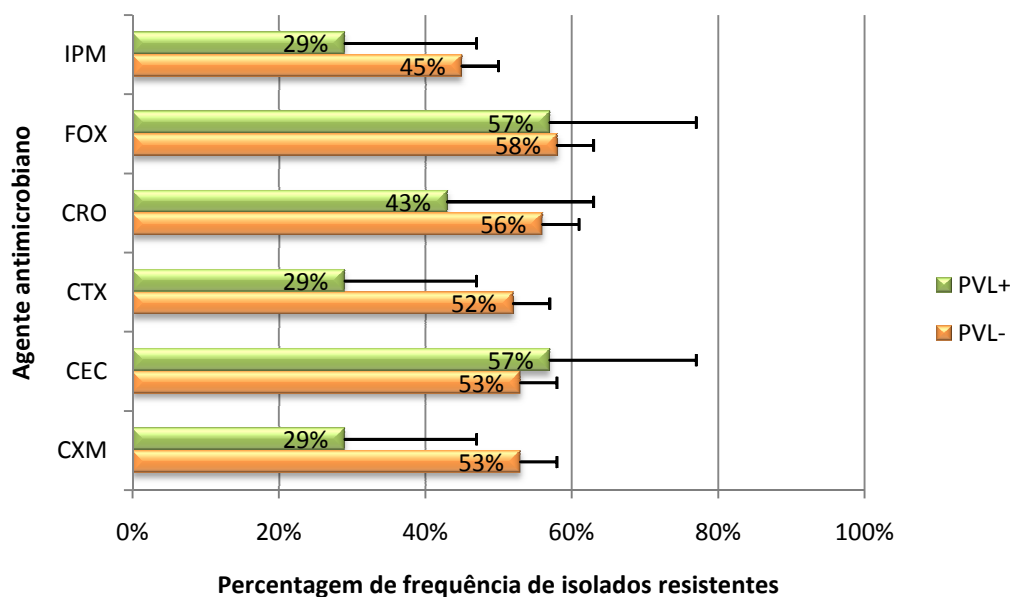


Figura 26. Percentagens de isolados PVL- e PVL+ resistentes aos agentes antimicrobianos das classes das Cefalosporinas, Cefamicinas e Carbapenemos. Cefalosporinas: CXM- Cefuroxima; CEC- Cefaclor; CTX- Cefotaxima; CRO- Ceftriaxona; Cefamicinas: FOX- Cefoxitina; Carbapenemos: IPM- Imipenemo; PVL- - Isolados não portadores do gene *lukFS-PV*; PVL+ - Isolados portadores do gene *lukFS-PV*.

Para um nível de confiança de 95%, existe evidência estatística, que permite aceitar a hipótese de que a média dos isolados PVL- resistentes para quase todos os agentes antimicrobianos é maior do que a média dos isolados PVL+ resistentes. A única exceção, observa-se no caso do antimicrobiano Cefaclor, onde se aceita a hipótese de que a média dos isolados PVL- resistentes é menor que a média dos isolados PVL+ resistentes.

### 3.2.2.3. Glicopéptidos

Os resultados obtidos indicam que a frequência de isolados PVL+ resistentes para a classe dos Glicopéptidos é de 29% para ambos os agentes antimicrobianos (Tabela 19 e Figura 27).

No que concerne aos isolados PVL- observaram-se percentagens de frequência de isolados resistentes iguais para ambos os agentes antimicrobianos utilizados (1%).

Tabela 19. Percentagens de isolados PVL- e PVL+ resistentes aos agentes antimicrobianos da classe dos Glicopéptidos.

Isolados	Agente antimicrobiano Glicopéptidos	
	TEC	VA
PVL-	1% (1/102)	1% (1/102)
PVL+	29% (2/7)	29% (2/7)

Legenda: TEC- Teicoplanina; VA- Vancomicina; PVL- - Isolados não portadores do gene *lukFS-PV*; PVL+ - Isolados portadores do gene *lukFS-PV*.

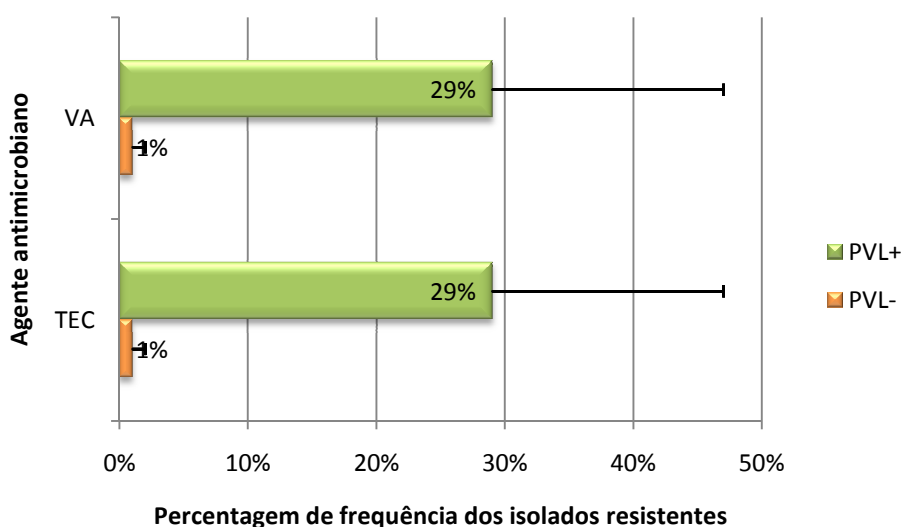


Figura 27. Percentagens de isolados PVL- e PVL+ resistentes aos agentes antimicrobianos dos Glicopéptidos. TEC- Teicoplanina; VA- Vancomicina; PVL- - Isolados não portadores do gene *lukFS-PV*; PVL+ - Isolados portadores do gene *lukFS-PV*.

Para um nível de confiança de 95%, existe evidência estatística, que permite aceitar a hipótese de que a média dos isolados PVL- resistentes para todos os agentes antimicrobianos deste grupo é menor do que a média dos isolados PVL+ resistentes.

#### 3.2.2.4. Aminoglicosídeos, Macrolídeos, Tetraciclínas e Oxazolidinonas

Os resultados seguintes mostram uma ampla resposta aos antimicrobianos, reflectindo-se em diferentes percentagens de isolados PVL+ resistentes, consoante a classe de antimicrobianos utilizados. Observou-se que todos os isolados PVL+ são sensíveis às classes dos Aminoglicosídeos e Oxazolidinonas. Relativamente aos Macrolídeos, observou-se uma

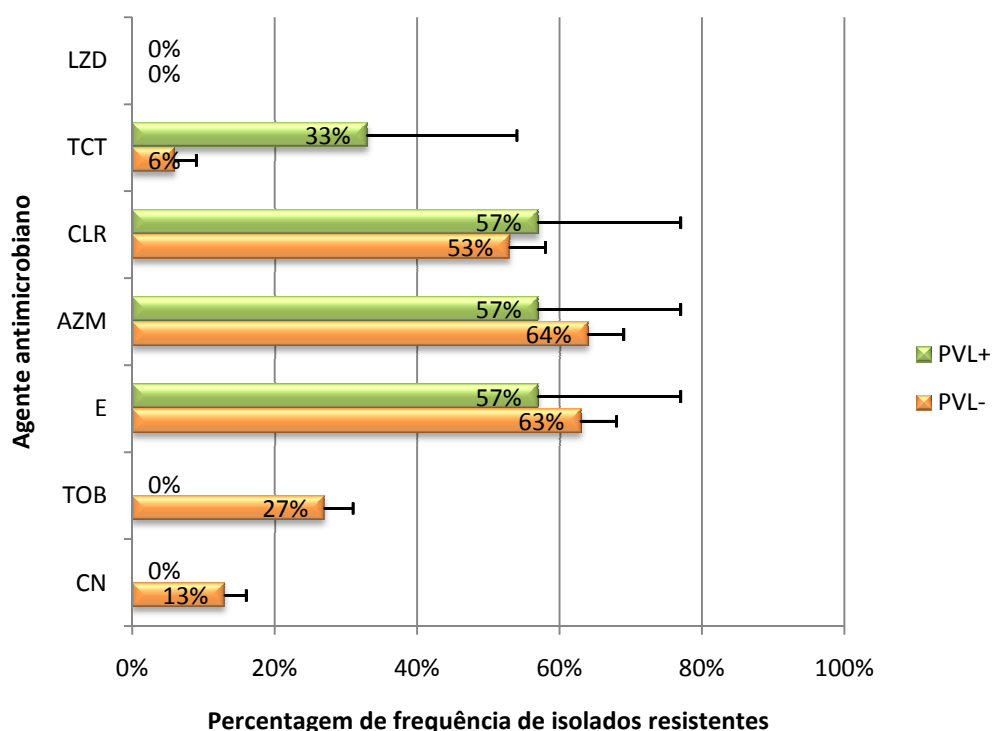
percentagem de 57% de isolados PVL+ resistentes a qualquer dos Macrolídeos estudados. No caso das Tetraciclina, a frequência de isolados PVL resistentes foi de 33% (Tabela 20).

Relativamente aos isolados PVL-, observou-se que estes apresentam, excepto nos casos dos antimicrobianos Claritromicina e Tetraciclina, percentagens de frequência de isolados resistentes maiores que os isolados PVL+ (Figura 28).

**Tabela 20.** Percentagens de isolados PVL- e PVL+ resistentes aos agentes antimicrobianos das classes dos Aminoglicosídeos, Macrolídeos, Tetraciclina e Oxazolidinonas.

Isolados	Agente antimicrobiano						
	Aminoglicosídeos		Macrolídeos			Tetraciclina	Oxazolidinonas
	CN	TOB	E	AZM	CLR	TCT	LZD
PVL-	13%	27%	63%	64%	53%	6%	0%
	(13/101)	(28/102)	(64/102)	(65/102)	(54/102)	(4/62)	(0/102)
PVL+	0%	0%	57%	57%	57%	33%	0%
	(0/7)	(0/7)	(4/7)	(4/7)	(4/7)	(2/6)	(0/7)

Legenda: CN- Gentamicina; TOB- Tobramicina; E- Eritromicina; AZM- Azitromicina; CLR- Claritromicina; TCT- Tetraciclina; LZD- Linezolide; PVL- - Isolados não portadores do gene *lukFS-PV*; PVL+ - Isolados portadores do gene *lukFS-PV*.



**Figura 28.** Percentagens de isolados PVL- e PVL+ resistentes aos agentes antimicrobianos das classes dos Aminoglicosídeos, Macrolídeos, Tetraciclina e Oxazolidinonas. Aminoglicosídeos: CN- Gentamicina; TOB- Tobramicina; Macrolídeos: E- Eritromicina; AZM- Azitromicina; CLR- Claritromicina; Tetraciclina: TCT- Tetraciclina; Oxazolidinonas: LZD- Linezolide; PVL- - Isolados não portadores do gene *lukFS-PV*; PVL+ - Isolados portadores do gene *lukFS-PV*.

Para um nível de confiança de 95%, existe evidência estatística, que permite aceitar a hipótese de que a média dos isolados PVL- resistentes para quase todos os agentes antimicrobianos é maior do que a média dos isolados PVL+ resistentes. As únicas exceções observam-se nos casos dos antimicrobianos Claritromicina e Tetraciclina, onde se aceita a hipótese de que a média dos isolados PVL- resistentes é menor que a média dos isolados PVL+ resistentes.

### 3.2.2.5. Quinolonas e Ansamicinas

A percentagem de isolados PVL+ resistentes às Quinolonas varia entre 14% no caso da Levofloxacina e da Moxifloxacina e 57% no caso da Norfloxacina. No que concerne ao representante das Ansamicinas, a percentagem de isolados PVL+ resistentes à Rifampicina é de 29% (Tabela 21).

Relativamente aos isolados PVL-, observou-se que estes apresentam, excepto nos casos dos antimicrobianos Norfloxacina e Rifampicina, percentagens de frequência de isolados resistentes maiores que os isolados PVL+ (Figura 29).

Tabela 21. Percentagens de isolados PVL- e PVL+ resistentes aos agentes antimicrobianos das classes das Quinolonas e Ansamicinas.

<i>Isolados</i>	<b>Agente antimicrobiano</b>				
	<i>Quinolonas</i>				<i>Ansamicinas</i>
	<b>LEV</b>	<b>MXF</b>	<b>CIP</b>	<b>NOR</b>	<b>RD</b>
<i>PVL-</i>	38% (39/102)	33% (34/102)	41% (42/102)	51% (52/101)	6% (6/102)
<i>PVL+</i>	14% (1/7)	14% (1/7)	29% (2/7)	57% (4/7)	29% (2/7)

Legenda: LEV- Levofloxacina; MXF- Moxifloxacina; CIP- Ciprofloxacina; NOR- Norfloxacina; RD- Rifampicina; SXT- Trimetoprim/Sulfametoxazole; F- Nitrofurantoina; PVL- - Isolados não portadores do gene *lukFS-PV*; PVL+ - Isolados portadores do gene *lukFS-PV*.

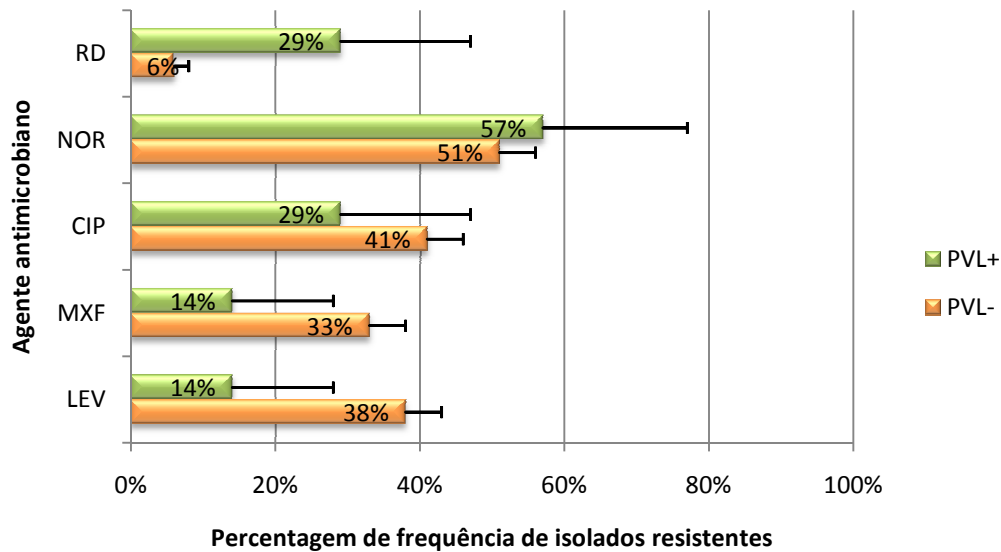


Figura 29. Percentagens de isolados PVL- e PVL+ resistentes aos agentes antimicrobianos das classes das Quinolonas e Ansamícinas. Quinolonas: LEV- Levofloxacina; MXF- Moxifloxacina; CIP- Ciprofloxacina; NOR- Norfloxacina; Ansamícinas: RD- Rifampicina; PVL- - Isolados não portadores do gene *lukFS-PV*; PVL+ - Isolados portadores do gene *lukFS-PV*.

Para um nível de confiança de 95%, existe evidência estatística, que permite aceitar a hipótese de que a média dos isolados PVL- resistentes a quase todos os agentes antimicrobianos, é maior do que a média dos isolados PVL+ resistentes. As únicas exceções observam-se nos casos dos antimicrobianos Norfloxacina e Rifampicina, onde se aceita a hipótese que a média dos isolados PVL- resistentes é menor que a média dos isolados PVL+ resistentes.

### 3.2.2.6. Nitrofuranos e Sulfonamidas

Os resultados para os Nitrofuranos e Sulfonamidas, indicam que para a Nitrofurantoina a percentagem de isolados PVL+ resistentes a este antimicrobiano é de 29%. Para as Sulfonamidas verificou-se que todos os isolados PVL+ são sensíveis (Tabela 22).

Relativamente aos isolados PVL-, observou-se que estes apresentam uma percentagem de isolados resistentes de 1% para a Nitrofurantoina e de 10% para o Trimetoprim/Sulfametoxazole (Figura 30).

Tabela 22. Percentagens de isolados PVL- e PVL+ resistentes aos agentes antimicrobianos das classes dos Nitrofuranos e Sulfonamidas.

Isolados	Agente antimicrobiano	
	Nitrofuranos	Sulfonamidas
	F	SXT
PVL-	1% (1/101)	10% (10/102)
PVL+	29% (2/7)	0% (0/7)

Legenda: F- Nitrofurantoina; SXT- Trimetoprim/Sulfametoxazole; PVL- - Isolados não portadores do gene *lukFS-PV*; PVL+ - Isolados portadores do gene *lukFS-PV*.

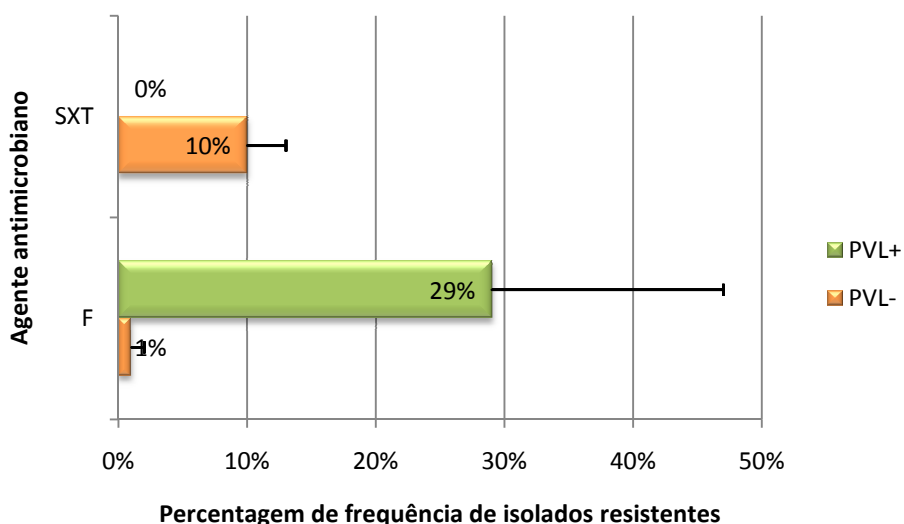


Figura 30. Percentagens de isolados PVL- e PVL+ resistentes aos agentes antimicrobianos das classes dos Nitrofuranos e Sulfonamidas. Nitrofuranos: F- Nitrofurantoina; Sulfonamidas: SXT- Trimetoprim/Sulfametoxazole; PVL- - Isolados não portadores do gene *lukFS-PV*; PVL+ - Isolados portadores do gene *lukFS-PV*.

Para um nível de confiança de 95%, existe evidência estatística, que permite aceitar a hipótese de que no caso da Nitrofurantoina a média dos isolados PVL- resistentes é menor que a média dos isolados PVL+ resistentes. No caso do Trimetoprim/Sulfametoxazole, é aceita a hipótese de que a média dos isolados PVL- resistentes é maior que a média dos isolados PVL+ resistentes.

### 3.2.2.7. Lincosamidas e resistência induzida pela Eritromicina

Apesar de a percentagem de isolados PVL+ resistentes à Clindamicina, 57%, ser igual à apresentada por estes à Eritromicina, apenas em 14% se observa resistência à Clindamicina induzida pelo Macrolídeo (Tabela 23 e Figura 31).

Tabela 23. Percentagens de isolados PVL- e PVL+ resistentes ao agente antimicrobiano da classe das Lincosamidas e resistência induzida desta pela Eritromicina.

Isolados	Agente antimicrobiano		
	Lincosamidas	Macrolídeo	Resistência DA induzida por E
	DA	E	
PVL-	47% (48/102)	63% (64/102)	36% (37/102)
PVL+	57% (4/7)	57% (4/7)	14% (1/7)

Legenda: DA- Clindamicina; E- Eritromicina; PVL- - Isolados não portadores do gene *lukFS-PV*; PVL+ - Isolados portadores do gene *lukFS-PV*.

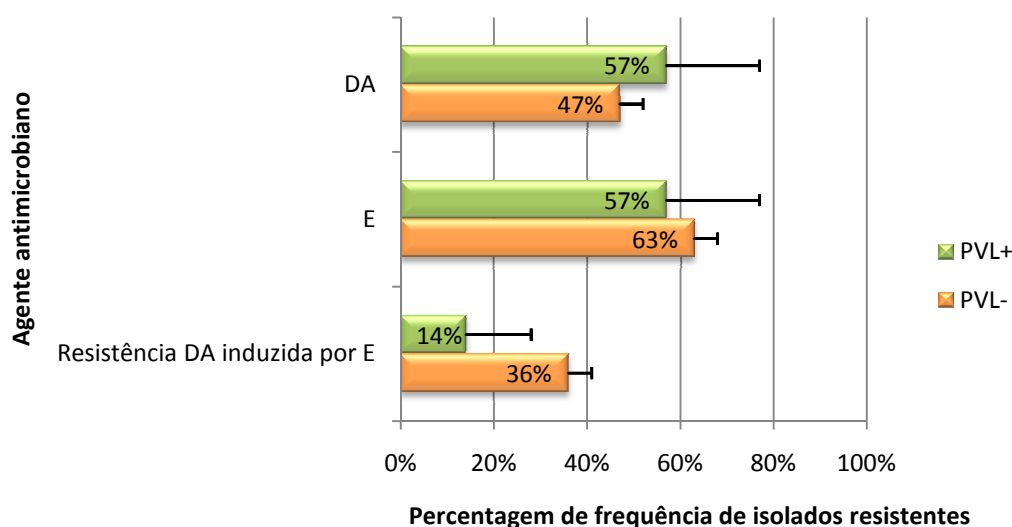


Figura 31. Percentagens de isolados PVL- e PVL+ resistentes ao agente antimicrobiano da classe das Lincosamidas e resistência induzida desta pela Eritromicina. DA- Clindamicina; E- Eritromicina; PVL- - Isolados não portadores do gene *lukFS-PV*; PVL+ - Isolados portadores do gene *lukFS-PV*.

Para um nível de confiança de 95%, existe evidência estatística, que permite aceitar a hipótese de que no caso da Clindamicina e Eritromicina, a média dos isolados PVL- resistentes é maior que a média dos isolados PVL+ resistentes. No caso da resistência induzida pela Eritromicina, é aceite a hipótese de que a média dos isolados PVL- resistentes é menor que a média dos isolados PVL+ resistentes.





CAPÍTULO **4**

---

**Discussão**



#### **CAPÍTULO 4:**

<b>4. Discussão.....</b>	<b>85</b>
4.1. Caracterização genética .....	85
4.2. Susceptibilidade a antimicrobianos .....	86
4.2.1.MSSA/MRSA.....	87
<b>4.2.1.1. Inibidores da síntese da parede celular .....</b>	<b>87</b>
<b>4.2.1.2. Inibidores da síntese proteica .....</b>	<b>87</b>
<b>4.2.1.3. Inibidores da síntese de DNA .....</b>	<b>89</b>
<b>4.2.1.4. Inibidores do ciclo de Krebs e da via de síntese do folato ou Inibidores do metabolismo celular .....</b>	<b>89</b>
4.2.2. PVL-/PVL+.....	91



## 4. Discussão

---

### 4.1. Caracterização genética

A frequência de isolados portadores do gene *mecA* apresenta uma preocupante tendência crescente por todo o mundo (26). No presente estudo, verificou-se que na amostra em estudo, cerca de 50% dos isolados eram portadores do gene *mecA*. Estes dados são coerentes com o estudo publicado em 2007 pela *European Antimicrobial Resistance Surveillance System* (52).

No que concerne aos isolados portadores do gene *lukFS-PV*, não se verificou uma frequência tão elevada como para o gene *mecA*. Assim, verificou-se que, apenas 6% dos isolados, são portadores deste gene. Este achado está de acordo com os dados documentados na literatura que descrevem um aumento crescente de estirpes *S. aureus* portadoras do gene *lukFS-PV*, apesar de estas não serem tão frequentes quanto as *S. aureus* portadoras do gene *mecA* (9; 23). Um factor que poderá ter contribuído para a baixa frequência dos isolados portadores do gene que codifica a proteína PVL no presente estudo, é o facto de o gene da PVL ser mais frequente em isolados causadores de infecção na comunidade. No entanto, os isolados utilizados são provenientes apenas de infecções causadas em ambiente hospitalar (9; 23; 28).

Relativamente à frequência dos isolados portadores dos genes *mecA* ou *lukFS-PV* no que concerne ao sexo do paciente observou-se que, para ambos os casos, observa-se uma maior incidência de isolados portadores destes genes em pacientes do sexo masculino. No entanto, até à data, não foram documentados na literatura dados que suportem a hipótese de os pacientes do sexo masculino terem maior predisposição para contrair infecções causadas pelas estirpes em questão.

A incidência de estirpes portadoras dos genes *mecA* ou *lukFS-PV* por faixa etária do paciente não foi determinada, para a população em estudo. Esta situação prende-se com o facto de não ter sido fornecida a data de nascimento destes pacientes, apesar de haver sido solicitada junto dos serviços de recolha das estirpes estudadas. No entanto, vários estudos apontam para uma maior incidência em idosos, sendo que, os recém-nascidos e as crianças jovens possam ser ligeiramente mais afectados que os adultos saudáveis (9; 35; 53).

## 4.2. Susceptibilidade a antimicrobianos

Como já foi mencionado anteriormente, a resistência aos agentes antimicrobianos varia no espaço e no tempo (32). Foram encontradas algumas diferenças relativamente ao perfil de susceptibilidade dos isolados MSSA e MRSA. Os resultados obtidos serão discutidos tendo em conta os seus mecanismos de acção.

A título de resumo, na tabela 24 é descrita a frequência de isolados resistentes em estudo relativamente a cada uma das diferentes classes de agentes antimicrobianos utilizada.

**Tabela 24. Grau de frequência de isolados resistentes relativamente à classe de agentes antimicrobianos utilizada.**

<i>Agentes antimicrobianos</i>	Frequência de isolados resistentes				
	[0-20%[	[20-40%[	[40-60%[	[60-80%[	[80-100%]
<i>Penicilinas</i>	MSSA	PVL+	PVL-		MRSA
<i>Cefalosporinas</i>	MSSA	PVL+	PVL-		MRSA
<i>Cefamicinas</i>		MSSA	PVL-		MRSA
<i>Carbapenemos</i>	MSSA	PVL+	PVL-		MRSA
<i>Glicopéptidos</i>	MSSA	PVL+			
	MRSA				
	PVL-				
<i>Aminoglicosídeos</i>	MSSA	MRSA			
	PVL-				
	PVL+				
<i>Macrolídeos</i>		MSSA	PVL-	MRSA	
			PVL+		
<i>Tetraciclina</i>	MSSA	PVL+			
	MRSA				
	PVL-				
<i>Oxazolidinonas</i>	MSSA				
	MRSA				
	PVL-				
	PVL+				
<i>Lincosamidas</i>		MSSA	PVL-	MRSA	
			PVL+		
<i>Quinolonas</i>	MSSA	PVL-	MRSA		
	PVL+				
<i>Ansamicinas</i>	MSSA	PVL+			
	MRSA				
	PVL-				
<i>Nitrofuranos</i>	MSSA	PVL+			
	MRSA				
	PVL-				
<i>Sulfonamidas</i>	MSSA				
	MRSA				
	PVL-				
	PVL+				

Legenda: MSSA- *Staphylococcus aureus* sensíveis à Meticilina MRSA- *Staphylococcus aureus* resistentes à Meticilina; PVL- - Isolados não portadores do gene *lukFS-PV*; PVL+ - Isolados portadores do gene *lukFS-PV*.

## 4.2.1.MSSA/MRSA

### 4.2.1.1. Inibidores da síntese da parede celular

No presente estudo observou-se uma elevada frequência de isolados portadores do gene *mecA* resistentes aos  $\beta$ -lactâmicos estudados: Penicilinas, Cefalosporinas, Cefamicinas e Carbapenemos. A percentagem destes MRSA resistentes aos  $\beta$ -lactâmicos foi  $\geq 82\%$  (Tabela 10 e 11). Este facto é justificado, pelo menos para maioria dos  $\beta$ -lactâmicos (Penicilinas) com o facto de estes isolados possuírem o gene *mecA* que codifica a PBP2a. Como já foi referido, esta proteína tem a capacidade de continuar a promover a síntese da parede celular quando as outras PBP se encontram inactivas pelos agentes antimicrobianos, conferindo assim, resistência nestes isolados. Relativamente aos demais  $\beta$ -lactâmicos (Cefalosporinas, Cefamicinas e Carbapenemos), poderão estar envolvidos outros mecanismos moleculares codificados na própria cassete *SSCmec* ou no plasmídeo que a transporta (9; 17).

No que concerne aos isolados MSSA, a percentagem de estirpes resistentes aos  $\beta$ -lactâmicos, foi para a maioria das classes, mais baixa ( $\leq 24\%$ ) do que para o observado nas estirpes de MRSA (Tabela 10 e 11). No entanto, no caso da Penicilina G e da Ampicilina observaram-se frequências de isolados MSSA resistentes na ordem dos 80%. Poderá questionar-se, neste caso, se os isolados resistentes possuem um gene *bla* que codifica a enzima  $\beta$ -lactamase, capaz de hidrolisar os agentes antimicrobianos em questão (9; 17).

Para a classe dos Glicopéptidos verificou-se uma frequência aparentemente muito baixa (4%), de isolados resistentes à Teicoplanina e à Vancomicina (Tabela 12). No entanto, este valor parece impressionante (e preocupante) se comparado com os últimos dados do EARSS que reportam um único caso de VRSA, em Portugal, até ao final do ano passado (52). A presença destas estirpes de *S. aureus* resistentes à Vancomicina vem corroborar a tendência crescente de disseminação da VRSA a nível mundial (27). Este dado deverá ainda ser confirmado com a detecção do gene *VanA*, responsável por conferir resistência à Vancomicina (1; 25). Finalmente, estas estirpes terão de ser reportadas, rapidamente, não apenas nos locais onde foi efectuado o estudo, de forma a prevenir uma eventual disseminação ou epidemia mas, também, aos sistemas de vigilância da susceptibilidade aos antimicrobianos nacionais e europeus.

### 4.2.1.2. Inibidores da síntese proteica

A frequência de isolados resistentes a antimicrobianos inibidores da síntese proteica varia consoante o tipo de isolados (MSSA/MRSA ou PVL-/PVL+) e o agente antimicrobiano estudado.

Rehm, et al. em 2008, descreveu, o aumento de isolados MRSA resistentes aos Aminoglicosídeos. Nesse estudo demonstrou que, num total de 43 pacientes com infecções causadas por isolados MRSA, apenas 14 foram curados com a administração de Aminoglicosídeos. Por sua vez, a susceptibilidade dos isolados MSSA aos Aminoglicosídeos manteve-se ainda elevada. Neste trabalho, tal como no estudo de Rehm, et al., também se podem retirar as mesmas ilações com os resultados obtidos. Observou-se uma maior quantidade de isolados MRSA resistentes aos Aminoglicosídeos do que os isolados MSSA em que a frequência de isolados resistentes era praticamente nula.

Os isolados multiresistentes são uma realidade cada vez importante no panorama clínico de actual. Num estudo realizado em Espanha, foram encontrados varios isolados MSSA e MRSA resistentes à classe dos Macrolídeos (54). Situação semelhante foi encontrada no presente estudo em que a frequência de isolados resistentes para ambos os isolados MSSA e MRSA é relativamente elevada encontrando-se entre os 35 e 50%, e 72 e 78%, respectivamente (Tabela 13).

Vários estudos actuais, demonstram que há um grande número de isolados MSSA e MRSA resistentes às Lincosamidas. Esta resistência é mediada pelo gene *erm* que leva a uma alteração do local de ligação das Lincosamidas nos ribossomas (55). No presente estudo foram também encontradas elevadas taxas de frequência de isolados MSSA e MRSA resistentes à Clindamicina, agente antimicrobiano representante da classe das Lincosamidas (Tabela 16).

Apesar de estruturalmente diferentes, os agentes antimicrobianos pertencentes às classes dos Macrolídeos e Lincosamidas estão relacionados através de um mecanismo de acção particular. Este mecanismo foi observado, também, no presente estudo. Alguns dos isolados, tanto MSSA como MRSA, apresentaram um tipo de resistência à Clindamicina em que esta foi induzida por um Macrolídeo, a Eritromicina (Tabela 16). Este tipo de resistência ocorre quando o mRNA responsável pela modificação do local de ligação dos agentes antimicrobianos que se encontra inactivo, se torna activo na presença de um indutor. Este indutor é neste caso outro agente antimicrobiano, a Eritromicina. Os isolados portadores do gene *erm* indutivo, são resistentes ao indutor e mantêm-se susceptíveis aos agentes antimicrobianos não indutores (55; 56).

Recentemente, foram também identificados isolados MRSA portadores dos genes *tet(K)*, *tet(L)* e/ou *tet(M)*, que conferem resistência aos agentes antimicrobianos da classe das Tetraciclina (57). No presente estudo foram encontrados alguns isolados MRSA resistentes a este grupo de antimicrobianos, no entanto, essa frequência é relativamente baixa (Tabela 13). Desta forma, apesar de já terem sido encontradas isolados resistentes às Tetraciclina, estes genes ainda não se encontram muito disseminados na população de *S. aureus* estudada.

A Linezolide, pertencente à classe das Oxazolidinonas continua a ser um agente antimicrobiano muito poderoso para o tratamento de infecções causadas por isolados MSSA e MRSA (58; 59). De acordo com os estudos recentes também se observou uma completa susceptibilidade à Linezolide. tanto nas estirpes MSSA, como nas estirpes MRSA em estudo (Tabela 13).

#### **4.2.1.3. Inibidores da síntese de DNA**

A resistência aos agentes antimicrobianos da classe das Quinolonas é um marco de referência nas infecções causadas por MRSA. No entanto, nem sempre foi assim. A Ciprofloxacina foi inicialmente utilizada como um agente antimicrobiano contra os isolados MRSA. Mas, nos últimos anos, a tendência inverteu-se, tendo sido documentados vários isolados com resistência a este agente antimicrobiano, bem como aos restantes pertencentes a esta classe (60). No presente estudo observou-se que aproximadamente 50% dos isolados MRSA e 20% dos isolados MSSA eram resistentes a esta classe de agentes antimicrobianos (Tabela 14). O mecanismo pelo qual é conferida a resistência é um mecanismo de efluxo pelo qual o antimicrobiano é removido da célula da bactéria (1).

A Rifampicina é um agente antimicrobiano utilizado contra as infecções causadas por *S. aureus*. Devido à constante diminuição da susceptibilidade dos isolados a este agente antimicrobiano, este tem sido utilizado em combinação com outros, nomeadamente a Linezolide (61; 62). No presente estudo, não se observou uma tão elevada quantidade de isolados resistentes, nem em MSSA, nem em MRSA, como tem sido documentado. Pelo contrário, a percentagem de isolados resistentes para ambos os casos foi muito baixa: 6% para os isolados MSSA e 9% para os isolados MRSA (Tabela 14).

#### **4.2.1.4. Inibidores do ciclo de Krebs e da via de síntese do folato ou Inibidores do metabolismo celular**

Vários estudos indicam que tanto a Nitrofurantoína, como o Trimetoprim/Sulfametoxazole são agentes antimicrobianos bastante eficazes no tratamento de infecções causadas por *S. aureus*. Apenas para o caso do Trimetoprim/Sulfametoxazole é que existem casos documentados de isolados resistentes. Nestes casos, o Trimetoprim/Sulfametoxazole é utilizado em combinação com outros agentes antimicrobianos, nomeadamente com a Rifampicina. Esta combinação terapêutica tem como objectivo diminuir a quantidade de isolados resistentes a esta sulfonamida (63; 64; 65). No presente estudo, os resultados obtidos

foram coerentes com os estudos indicados, observando-se uma frequência de isolados resistentes aos antimetabólicos (nitrofuranos e sulfonamidas) praticamente nula para ambos os tipos, tanto em MSSA, como em MRSA. A única exceção foi uma susceptibilidade reduzida nos isolados MRSA, onde se verificou uma frequência de isolados resistentes de 17% ao Trimetoprim/Sulfametoxazole (Tabela 15).

A tabela 25 indica o volume de consumo de agentes antimicrobianos em Portugal durante o ano de 2007 por substância activa. O mais vendido aparenta ser o Clavamox® ou Augmentin® (nome comercial para a Amoxicilina/Ácido clavulânico) com um volume de vendas de mais do dobro que o segundo antimicrobiano mais vendido. De facto, o número total de embalagens de antimicrobianos vendidas foi de 11401734, o que significa que o Clavamox® ou Augmentin® por si só representa 26% do total de vendas.

**Tabela 25. Consumo de 2007, em volume, de antimicrobianos, por substância activa, em Ambulatório, no âmbito do Mercado Total. Dados gentilmente fornecidos pela INFARMED.**

Substância Activa	Classe do antimicrobiano	Embalagens
Amoxicilina + Ácido clavulânico	β-lactâmico	2.959.307
Azitromicina	Macrólido	1.429.667
(...)		
Ciprofloxacina	Quinolona	986.004
Claritromicina	Macrólido	685.776
Sulfametoxazole + Trimetoprim	Sulfonamida	426.327
(...)		
Ceftriaxona	β-lactâmico	282.021
(...)		
Cefuroxima	β-lactâmico	220.646
(...)		
Moxifloxacina	Quinolona	165.453
Levofloxacina	Quinolona	165.255
(...)		
Cefaclor	β-lactâmico	155.952
Norfloxacina	Quinolona	154.873
(...)		
Eritromicina	Macrólídeo	87.590
(...)		
Clindamicina	Lincosamida	66.083
(...)		
Gentamicina	Aminoglicosídeo	63.410
(...)		
Benzilpenicilina sódica + Clemizol-penicilina	β-lactâmico	23.052
(...)		
Rifampicina	Ansamicina	10.122
Cefotaxima	β-lactâmico	9.657
(...)		
Ampicilina	β-lactâmico	4.012
(...)		
Tetraciclina	Tetraciclina	337
(...)		
<b>Total</b>		<b>11.401.734</b>

No presente estudo foram analisadas as frequências de isolados MSSA e MRSA resistentes a vários agentes antimicrobianos. Após o tratamento dos resultados e análise interpretativa dos mesmos verificou-se que, no geral os isolados MRSA possuíam uma média de frequência de isolados resistentes maior comparativamente com a dos isolados MSSA. Esta situação pode ser explicada pelo facto de que os isolados MRSA adquiriram resistência à maioria dos antimicrobianos de primeira linha. Além de disso, a sua propagação aumenta diariamente, sendo lícito supor que os mecanismos moleculares inerentes à troca de genes entre espécies (transferência horizontal) e aquisição de novos genes de resistência do meio (transformação), sejam mais frequentes nestas estirpes (1; 2; 7).

#### **4.2.2. PVL-/PVL+**

No estudo em que se compararam as médias de frequência dos isolados resistentes PVL- e PVL+ podem tirar-se algumas ilações. Na maior parte dos casos apresentados, as frequências dos isolados MSSA e PVL resistentes encontram-se relativamente próximas. Nos casos em que se verificou maior discrepância entre as frequências dos isolados resistentes (por exemplo com as Penicilinas), prende-se com o facto de alguns dos isolados possuírem simultaneamente o gene *lukFS-PV*, o gene *mecA*. Outro factor que influenciou as elevadas percentagens de isolados PVL+ resistentes é o facto de o número de isolados PVL- e PVL+ serem significativamente diferentes (aproximadamente 7 para 102). Assim, não é possível estabelecer uma relação entre a susceptibilidade aos antimicrobianos e o facto dos isolados possuírem, ou não, o gene codificante da proteína PVL. De facto, actualmente não se encontram publicados na literatura, dados que indiquem a relação entre a presença do gene *lukFS-PV* e a resistência aos agentes antimicrobianos.







CAPÍTULO **5**

---

**Conclusão**



**CAPÍTULO 5**

**5. Conclusão: .....99**



## 5. Conclusão

---

Durante os seis meses em que o presente estudo foi realizado, 113 estirpes de *S. aureus* foram isoladas em dois centros hospitalares da região Norte de Portugal. Desses 113 isolados comprovou-se que o gene *mecA* se encontrava em aproximadamente 50% dos isolados. Por sua vez o gene *lukFS-PV* apenas se encontrava em 6% da amostra. Estes resultados são concordantes com vários estudos e relatórios que demonstram que, actualmente o gene *mecA*, se encontra bastante difundido na comunidade de *S. aureus*. No que concerne ao gene *lukFS-PV*, a sua frequência é ainda baixa. Este facto é também suportado por vários estudos que demonstram que apesar de várias estirpes portadoras deste gene terem sido encontradas por todo o mundo, a sua frequência é ainda baixa.

No que concerne aos perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos utilizados no presente estudo, as frequências observadas variam desde uma quase total frequência de isolados resistentes, 100%, a uma total ausência destes, 0%.

Assim, observou-se que para classes como os  $\beta$ -lactâmicos, Macrolídeos, Quinolonas e Lincosamidas, uma grande quantidade de estirpes MSSA e MRSA resistentes. No entanto, para classes como as Ansamicinas, Nitrofuranos e Tetraciclina a quantidade de isolados de *S. aureus* resistentes a estas era muito baixa. No caso das Oxazolinidonas (Linezolid), realça-se o facto de não ter sido observada nenhuma estirpe resistente.

Em relação aos Glicopéptidos, verificou-se que quase todos os isolados em estudo eram susceptíveis à Teicoplanina e à Vancomicina. No entanto, este facto é preocupante porque até ao final de 2008 apenas havia sido reportado um caso de VRSA, e no período a que se refere o presente estudo encontraram-se, apenas em dois hospitais do norte do país, 3 isolados. Assim, pode concluir-se que o actual receio mundial de uma epidemia global de estirpes VISA ou VRSA tem razão de ser. Desta forma, não devem ser descuidados os cuidados básicos de forma a prevenir o alastramento desta estirpe além de que, as instituições responsáveis devem ser imediatamente informadas.

Verificou-se de um modo geral, que para os agentes antimicrobianos em estudo, os isolados MRSA eram, proporcionalmente, mais frequentes do que os isolados MSSA. Deste modo, pode-se concluir que a hipótese proposta para o presente estudo está correcta. Tal hipótese deve-se ao facto de os isolados MRSA terem adquirido resistência à maioria dos antimicrobianos de primeira linha e à frequência dos genes que lhes confere essa resistência estarem largamente disseminados pela comunidade de *S. aureus*. Assim, estes isolados podem adquirir mais facilmente novas resistências através de diversos mecanismos genéticos

(transformação, transfecção, conjugação) do que as estirpes MSSA. Esta facilidade é justificada pelo facto de os genes de resistência aos antimicrobianos se encontrarem dentro de cassetes moleculares ladeadas por sequências genéticas móveis (transposões, sequências de inserção) que possuem elevada taxa de recombinação. Estes mecanismos são desencadeados, em grande parte, pela pressão selectiva provocada pela terapêutica antimicrobiana.

Em termos de mecanismos moleculares responsáveis pelo aumento de resistência aos antibióticos deve ser tida em conta não só a presença de genes responsáveis pela aquisição de resistência a um determinado antimicrobiano, mas também, a presença de elementos genéticos móveis como transposões e sequências de inserção. Além disso, a rápida capacidade de mutação dos genomas microbianos e a rápida fixação dessas mutações também contribui para este aumento.

A resistência a antimicrobianos tem várias implicações. As pessoas infectadas com microrganismos resistentes, como por exemplo o MRSA, enfrentam taxas de mortalidade mais altas. Isto deve-se, em parte, ao facto de uma infecção de um microrganismo resistente estar associada ao risco de a terapia antimicrobiana inicial ser inapropriada. Para além disso, o acrescido risco de morte pode reflectir o facto de o microrganismo causador da infecção possuir mais factores de virulência. Além da mortalidade, os microrganismos resistentes contribuem para elevados custos a nível hospitalar. As infecções com MRSA, por exemplo, levam a um prolongamento do internamento hospitalar. Em outras palavras, o MRSA encontra-se associado a resultados desfavoráveis de mortalidade e morbilidade.

A um nível local, são necessários esforços para melhorar a preparação e a divulgação de antibiogramas. Os clínicos devem possuir acesso à informação local para assegurar que estão a tomar as decisões apropriadas aquando do início da terapia antimicrobiana. Dada a variabilidade dos padrões de prescrição de hospital para hospital e até entre os clínicos do mesmo hospital, é irracional concluir que as tendências de aquisição de resistências a nível nacional possam ser aplicadas a nível local. Consequentemente, sem informação epidemiológica, local e precisa, os clínicos deixam de ter uma importante ferramenta para a sua selecção de antimicrobianos para o tratamento inicial. Desta forma, os estudos epidemiológicos das resistências aos antimicrobianos, devem ser exaustiva e frequentemente realizadas ao nível local.

Ambientes hospitalares e lares actuam como incubadoras que aumentam a entropia do sistema sanitário no sentido em que, aumentam as trocas de material genético. Se é verdade que algumas destas circunstâncias não podem ser alteradas facilmente, também é verdade que os hábitos de prescrição e consumo podem-no ser mais facilmente. Assim, microbiólogos, epidemiologistas, médicos e educadores devem unir esforços no sentido de desenvolver e

implementar estratégias na saúde pública e de educação para a saúde de forma a abrandar o aumento e propagação da preocupante e ameaçadora resistência aos antimicrobianos.







## 6. Bibliografia

---

1. **Walsh, C.** (2003) *Antibiotics: actions, origins, resistance*. Washington, DC: ASM Press.
2. **Bryskier, A.** (2005) *Antimicrobial agents: Antibacterials and antifungals*. Washington ASM Press.
3. **Persing, D.** (2004) *Molecular microbiology: diagnostic principles and practice*. Washington, DC : ASM Press.
4. **Greenwood, D., Finch, R., Davey, P. et al.** (2007) *Antimicrobial Chemotherapy*. New York: Oxford University Press.
5. **Weber, C.** (2008) *Update on methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA)*. Urologic Nursing, Vol. 28 (2), pp. 143-145.
6. **Decker, C.** (2008) *Pathogenesis of MRSA infections*. Disease a Month, Vol. 54 (12), pp. 774-779.
7. **Lencastre, H., Oliveira, D. e Tomasz, A.** (2007) *Antibiotic resistant Staphylococcus aureus: a paradigm of adaptive power*. Current Opinion in Microbiology, Vol. 10, pp. 428–435.
8. **Enright, M.** (2003) *The evolution of a resistant pathogen – the case of MRSA*. Current Opinion in Pharmacology, Vol. 3, pp. 474–479.
9. **Boyle-Vavra, S. e Daum, R.** (2007) *Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus: the role of Pantón–Valentine leukocidin*. Laboratory Investigation, Vol. 87, pp. 3–9.
10. **Corriere, M. e Decker, C.** (2008) *MRSA: An evolving pathogen*. Disease a Month, Vol. 54 (12), pp. 751-755.
11. **Gordon, R. e Lowy, F.** (2008) *Pathogenesis of methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection*. Clinical Infection Diseases, Vol. 46 (5), pp. 350–359.
12. **Matouskova, I. e Janout, V.** (2008) *Current knowledge of methicillin-resistant Staphylococcus aureus and community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc, Czech Republic, Vol. 152 (2), pp. 191-202.
13. **Moreillon, P., Que, Y. e Bayer, A.** (2002) *Pathogenesis of streptococcal and staphylococcal endocarditis*. Infectious Disease Clinics of North America, Vol. 16, pp. 297–318.
14. **Donlan, R. e Costerton, J.** (2002) *Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms*. Clinical Microbiololy Review, Vol. 15, pp. 167–193.
15. **O’Riordan, K. e Lee, J.** (2004) *Staphylococcus aureus capsular polysaccharides*. Clinical Microbiology Reviews, Vol. 17, pp. 218–234.

16. **Novick, R.** (2003) *Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence*. *Molecular Microbiology*, Vol. 48, pp. 1429–49.
17. **Hawkey, P.** (2008) *Molecular epidemiology of clinically significant antibiotic resistance genes*. *British Journal of Pharmacology*, Vol. 153, pp. 406-413.
18. **Safo, M., Zhao, Q., Ko, T. et al.** (2005) *Crystal structures of the Blal repressor from Staphylococcus aureus and its complex with DNA: insights into transcriptional regulation of the bla and mec operons*. *The Journal of Bacteriology*, Vol. 187, pp. 1833–1844.
19. **Mckinney, T., Sharma, V., Craig, W. et al.** (2001) *Transcription of the gene mediating methicillin resistance in Staphylococcus aureus (mecA) is repressed but not coinduced by cognate mecA and beta-lactamase regulators*. *The Journal of Bacteriology*, Vol. 183, pp. 6862-6868.
20. **Zhang, Y., Hackbarth, C., Chansky, K. et al.** (2001) *A proteolytic transmembrane signaling pathway and resistance to beta-lactams in staphylococci*. *Science*, Vol. 291, pp. 1962-1965.
21. **Shukla, S.** (2005) *Community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus and its emerging virulence*. *Clinical Medicine & Research*, Vol. 3 (2), pp. 57-60.
22. **Kuroda, M., Ohta, T., Uchiyama, I. et al.** (2001) *Whole genome sequencing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. *Lancet*, Vol. 357, pp. 1225-1240.
23. **Maltezou, H. e Giamarellou, H.** (2006) *Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, Vol. 27, pp. 87–96.
24. **Deurenberg, R., Vink, C., Kalenic, S. et al.** (2007) *The molecular evolution of methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology and Infection*, Vol. 13, pp. 222-235.
25. **Appelbaum, P.** (2007) *Microbiology of antibiotic resistance in Staphylococcus aureus*. *Clinical Infectious Diseases*, Vol. 45 (3), pp. 165–170.
26. **Appelbaum, P.** (2006) *MRSA - The tip of the iceberg*. *Clinical Microbiololy Infections*, Vol. 12 (2), pp. 3-10.
27. **Hughes, D.** (2003) *Exploiting genomics, genetics and chemistry to combat antibiotic resistance*. *Nature Reviews: Genetics*, Vol. 4, pp. 432-441.
28. **Levenhagen, K.** (2008) *Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus: an emerging concern for physical therapists: Discussion*. *Physiotherapy Research International*, Vol. 13(1), pp. 9–17.
29. **Kwon, N., Park, K., Moon, J. et al.** (2005) *Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) characterization and molecular analysis for methicillin-resistant Staphylococcus aureus and novel SCCmec subtype IVg isolated from bovine milk in Korea*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Vol. 56, pp. 624-632.

30. **Yamada, T., Tochimaru, N., Nakasuji, S. et al.** (2005) *Leukotoxin family genes in Staphylococcus aureus isolated from domestic animals and prevalence of lukM–lukF-PV genes by bacteriophages in bovine isolates*. *Veterinary Microbiology*, Vol. 110, pp. 97-103.
31. **Diep, B. e Otto, M.** (2008) *The role of virulence determinants in community-associated MRSA pathogenesis*. *Trends in Microbiology*, Vol. 16 (8), pp. 361-369.
32. **Livermore, D. e Pearson, A.** (2007) *Antibiotic resistance: location, location, location*. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, Vol. 13, pp. 7–16.
33. **Shorr, A.** (2007) *Epidemiology of Staphylococcal resistance*. *Clinical Infectious Diseases*, Vol. 45, pp. S171–176.
34. **Siegel, J., Rhinehart, E., Jackson, M. et al.** (2008) *Management of multidrug-resistant organisms in healthcare settings*. [Citação: 4 de Fevereiro de 2009.] <http://v\www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/ar/mdroGuideline2006.pdf>.
35. **Gleeson, T.** (2008) *Prevention and control of methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. *Disease a month*, Vol. 54(12), pp. 793-800.
36. **McClure, J., Conly, J., Elsayed, V. et al.** (2006) *Novel multiplex PCR assay for detection of the Staphylococcal virulence marker Panton-Valentine leukocidin genes and simultaneous discrimination of methicillin-susceptible from -resistant Staphylococci*. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 44 (3), pp. 1141–1144.
37. **Zhang, K., Sparling, K., Chow, B. et al.** (2004) *New quadriplex PCR assay for detection of Methicillin and Mupirocin resistance and simultaneous discrimination of Staphylococcus aureus from Coagulase-negative Staphylococci*. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 42 (11), pp. 4947-4955.
38. **Brody, J. e Kern, S.** (2004) *History and principles of conductive media for standard DNA electrophoresis*. *Analytical Biochemistry*, Vol. 333, pp. 1-13.
39. **Shieh, B., Chuang, W. e Li, C.** (1998) *Dye-induced denaturation of DNA dissolved in water*. *Biotechniques*, Vol. 24, pp. 60-62.
40. **Sambrook, J. e Russel, D.** (2001) *Molecular cloning: A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
41. **Liu, Q. e Sommer, S.** (1999) *pK-Matched running buffers in gel electrophoresis*. *Analytical Biochemistry*, Vol. 270, pp. 112-122.
42. **Ebeling, W., Hennrick, N., Klockow, M. et al.** (1974) *Proteinase K from Tiritirachium album Limer*. *European Journal of Biochemistry*, Vol. 47, pp. 91-87.
43. **Raines, R.** (1998) *Ribonuclease A*. *Chemical Reviews*, Vol. 98, pp. 1045-1065.
44. **Borst, P.** (2005) *Ethidium DNA agarase gel electrophoresis: how it started*. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life*, Vol. 57, pp. 745-747.

45. **Joyce, M. e Woods, C.** (2004) *Antibacterial susceptibility testing in the clinical laboratory*. Infectious Disease Clinics of North America, Vol. 18, pp. 401-434.
46. **Pfaller, M., Jones, R. e Microbiology Resource Committee, College of American Pathologists.** (2006) *Performance accuracy of antibacterial and antifungal susceptibility test methods: report from the College of American Pathologists Microbiology Surveys Program (2001-2003)*. Archives of Pathology and Laboratory Medicine, Vol. 130, pp. 767-778.
47. **CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute.** (2005) *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Fifteenth informational supplement. CLSI document M100-S15 (ISBN 1-56238-556-9)*. Clinical and Laboratory Standards Institute, Vol. 25 (1).
48. **Finegold, S., Meroueh, S. e Mobashery, S.** (2005) *Bacterial resistance to beta-lactam antibiotics: Compelling opportunism, compelling opportunity*. Chemical Reviews, Vol. 105, pp. 395-424.
49. **MacFaddin, J.** (1985) *Media for isolation-cultivation-identification-maintenance of medical bacteria*. Baltimore: Williams and Wilkins.
50. **Pegg, D.** (2007) *Principles of cryopreservation*. Methods in Molecular Biology, Vol. 368, pp. 39-57.
51. **Bryskier, A.** (1999) *Antimicrobial Agents: Antibacterials and antifungals*. Washington: ASM Press,.
52. **EARSS, European Antimicrobial Resistance Surveillance System.** (2007) [Citação: 26 de Junho de 2009.] <http://www.ricm.nl/earss>. [Online].
53. **Graffunder, E., Preston, K., Evans, A. et al.** (2005) *Risk factors associated with extended-spectrum beta-lactamase-producing organisms at a tertiary care hospital*. Antimicrobial Chemotherapy, Vol. 56, pp. 139-145.
54. **Gaite, F., Saenz, A., Vidal, M. et al.** (2008) *New therapeutic options for the treatment of multiresistant bacteria in the ICU*. Revista Española de Quimioterapia, Vol. 21(1), pp. 9-13.
55. **Ciraj, A., Vinod, P., Sreejith, G. et al.** (2009) *Inducible clindamycin resistance among clinical isolates of staphylococci*. Indian Journal of Pathology and Microbiology, Vol. 52 (1), pp. 49-51.
56. **Babel, B. e Decker, C.** (2008) *Microbiology and Laboratory Diagnosis of MRSA*. Disease a Month, Vol. 54:1212, pp. 769-773.
57. **Kadlec, K. e Schwarz, S.** (2009) *Identification of a novel Trimethoprim resistance gene, dfrK, in a methicillin-resistant Staphylococcus aureus ST398 strain and its physical linkage to the Tetracycline resistance gene tet(L)*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Vol. 53 (2), pp. 776-778.
58. **Carmonaa, P., Romáa, e., Montea, E. et al.** (2003) *Papel de linezolid en terapéutica antimicrobiana*. Enferm Infecc Microbiol Clin, Vol. 21(1), pp. 30-41.

59. **Samra, Z., Ofer, O. e Shmueli, H.** (2005) *Susceptibility of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus to Vancomycin, Teicoplanin, Linezolid, Pristinamycin and Other Antibiotics*. Israel Medical Association Journal, Vol. 7 (3), pp. 148-150.
60. **Liu, M., Otsuka, N., Noyori, K. et al.** (2009) *Synergistic Effect of Kaempferol Glycosides Purified from Laurus nobilis and Fluoroquinolones on Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*. Biological & Pharmaceutical Bulletin, Vol. 32 (3) , pp. 489-492.
61. **Tsaganos, T., Skiadas, I, Kartoukas, P. et al.** (2008) *Efficacy and pharmacodynamics of Linezolid, alone and in combination with Rifampicin, in an experimental model of methicillin-resistant Staphylococcus aureus endocarditis*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, Vol. 62, pp. 381–383.
62. **Perlroth, J., Kuo, M., Tan, J. et al.** (2008) *Adjunctive use of Rifampin for the treatment of Staphylococcus aureus Infections*. Archives of Internal Medicine, Vol. 168 (8), pp. 805-819.
63. **Fung, S., Louie, M. e Simor, A.** (2002) *Combined topical and oral antimicrobial therapy for the eradication of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) colonization in hospitalized patients*. The Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology, Vol. 13 (5), pp. 287-292.
64. **Ellisson III, R., Judson, F., Peterson, C. et al.** (1984) *Oral Rifampin and Trimethoprim/Sulfamethoxazole Therapy in Asymptomatic Carriers of Methicillin -Resistant Staphylococcus aureus Infections*. Western Journal of Medicine, Vol. 140, pp. 735-740.
65. **Polyzou, A., Slavakis, A., Pournaras, S. et al.** (2001) *Predominance of a methicillin-resistant Staphylococcus aureus clone susceptible to erythromycin and several other non-beta-lactam antibiotics in a Greek hospital*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, Vol. 48, pp. 231-234.
66. **Fernandes, R.** (2008) *Drug resistance in the Enterobacteriaceae family - Epidemiological, biochemical and molecular studies on beta-lactamases*. Tese de Doutorado.

