

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

**CARACTERIZAÇÃO DA VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA DE *Staphylococcus* spp.
ISOLADOS DE PACIENTES ONCOLÓGICOS E NÃO ONCOLÓGICOS DE DOIS
HOSPITAIS DA CIDADE DO RECIFE-PE.**

MARCELLE AQUINO RABELO

Recife-PE

2017

MARCELLE AQUINO RABELO

**CARACTERIZAÇÃO DA VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA DE *Staphylococcus* spp.
ISOLADOS DE PACIENTES ONCOLÓGICOS E NÃO ONCOLÓGICOS DE DOIS
HOSPITAIS DA CIDADE DO RECIFE-PE.**

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor na área de Concentração em Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Maria Amélia Vieira Maciel

Co-orientadora: Prof^ª. Dra. Nilma Cintra Leal

Recife-PE

2017

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

R114c Rabelo, Marcelle Aquino.
Caracterização da virulência e resistência de *Staphylococcus* spp. isolados de pacientes oncológicos e não oncológicos de dois hospitais da cidade do Recife-PE / Marcelle Aquino Rabelo. – 2017.
188 f.: il. tab.; quad.; 30 cm.

Orientadora: Maria Amélia Vieira Maciel.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical. Recife, 2017.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Staphylococcus. 2. Antimicrobianos. 3. Oncologia. 4. Resistência. 5. Virulência. I. Maciel, Maria Amélia Vieira (Orientadora). II. Título.

618.9883 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2017-109)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE (CCS)

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL (PPGMEDTROP)

MARCELLE AQUINO RABELO

**CARACTERIZAÇÃO DA VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA DE *Staphylococcus* spp.
ISOLADOS DE PACIENTES ONCOLÓGICOS E NÃO ONCOLÓGICOS DE DOIS
HOSPITAIS DA CIDADE DO RECIFE-PE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Medicina Tropical.

Aprovada em: 17/02/2017.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Líbia Cristina Rocha Vilela Moura (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^ª. Dr^ª. Janete Magali de Araújo (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Paulo Sérgio Ramos de Araújo (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^ª. Dr^ª. Carina Lucena Mendes (Examinadora Externa)
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

Prof. Dr. Felipe Lira de Sá Cavalcanti (Examinador Externo)
Universidade de Pernambuco

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

REITOR

Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Ernani Rodrigues de Carvalho Neto

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Nicodemos Teles de Pontes Filho

**COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM MEDICINA TROPICAL**

Valdênia Maria Oliveira de Souza

**VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM MEDICINA TROPICAL**

Maria Amélia Vieira Maciel

CORPO DOCENTE

Ana Catarina de Souza Lopes

Ana Lúcia Coutinho Domingues

Célia Maria Machado Barbosa de Castro

Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto

Fábio André Brayner dos Santos

Heloísa Ramos Lacerda de Melo

Maria Amélia Vieira Maciel

Maria de Fátima Pessoa Militão de Albuquerque

Maria Rosângela Cunha Duarte Coelho

Marli Tenório Cordeiro

Rejane Pereira Neves

Ricardo Arraes de Alencar Ximenes

Valdênia Maria Oliveira de Souza

Vera Magalhães de Silveira

Vláudia Maria Assis Costa

DOCENTES COLABORADORES

Líbia Cristina Rocha Vilela Moura

Virgínia Maria Barros de Lorena

Dedico,

Aos meus pais, Marcelo e Lúcia pelo amor,
compreensão, apoio e por se fazerem presentes em
todos os momentos.

Às minhas irmãs, Marília e Marluce que
incondicionalmente me incentivaram.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ofertar-me saúde todos os dias e por sustentar-me, dando-me forças, paciência e sabedoria para que eu não desanime diante dos desafios nessa jornada e na vida.

À minha mãe, Lúcia, pelo amor, carinho e apoio, e por se fazer sempre presente em minha vida.

Ao meu pai, Marcelo, pelo amor, dedicação, exemplo e por estar sempre junto a mim, ajudando e incentivando na conquista dos meus objetivos.

Às minhas irmãs, Marília e Marluce pelo apoio e amizade essenciais durante essa jornada.

Ao meu cunhado, Douglas, por sua amizade e disponibilidade indispensáveis durante essa jornada.

À Professora Amélia Maciel, pela confiança, orientação, ajuda inestimável, amizade e paciência que me dedicou durante todos esses onze anos de orientação e parceria.

À Dra Nilma Leal pela confiança, orientação, amizade e paciência depositados em todos esses anos.

A todos os meus amigos, especialmente Amanda, Armando, Camila, Jean, Jennifer, Gisely, Michelly (*in memoriam*) e Natália pelo companheirismo diário e por se fazerem presentes em todos os momentos, principalmente nos momentos mais difíceis.

Aos companheiros de mestrado e doutorado pela parceria, amizade e pelos momentos compartilhados.

A Adriane, Laura, Paula, Valdemir e todos os colegas do Laboratório de Microbiologia pela amizade e por compartilhar diariamente comigo de todas as descobertas e desafios desse estudo.

A Cynthia, Jussyêgles e Stephanie pela inestimável colaboração no estudo e principalmente pela amizade.

Aos curicas, Jailton e Lílian, pela sua amizade, parceria e apoio durante toda essa jornada.

Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Departamento de Microbiologia, possibilitou infra-estrutura para o desenvolvimento de algumas etapas deste trabalho.

Aos professores e ao Programa de Pós Graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco pelo empenho na condução do curso e por todos ensinamentos.

A CAPES pela bolsa de estudos concedida e a Facepe pelo apoio financeiro.

A Juliano Sálvio Cazuzu, chefe do laboratório do HC-UFPE, pela permissão ao acesso às amostras relevantes para o trabalho.

A Henrique e Maria do Carmo do laboratório de bacteriologia do HC-UFPE, pelo auxílio na coleta de algumas amostras do trabalho apresentado.

A Jesuíta e Fernanda do laboratório de bacteriologia do CIAC, pelo auxílio na coleta de algumas amostras do trabalho apresentado

A Dr. Paulo Sérgio, Candida, Carlos Alexandre (Seu Mano), Ismar Ramos e equipe do CCIH/HCP pela sua colaboração no acesso aos prontuários dos pacientes de oncologia.

À Dona Djanira e Dona Jussara que me receberam diariamente no laboratório de microbiologia e sempre cuidaram carinhosamente de tudo e de todos no departamento.

Aos professores e funcionários da Disciplina de Microbiologia e Imunologia, que de alguma maneira contribuíram para o desenvolvimento da minha pesquisa.

A Walter Galdino pela amizade e disponibilidade com todos.

A todos os colegas do Cerpe-IMIP pelo apoio, amizade e incentivo durante o período de convívio.

A todos os colegas do LANAGRO-PE, especialmente do Laboratório de Microbiologia dos Alimentos e Água, pelo incentivo e compreensão indispensáveis nessa caminhada.

A Vítor Rocha, LANAGRO-PE, pelo apoio, amizade, incentivo e sua colaboração na tradução do artigo.

A Dra Alzira Almeida, CPqAM/FIOCRUZ-PE, pelas sugestões e revisão dos manuscritos.

A todos que direta ou indiretamente estiveram ao meu lado, me ajudando a alcançar mais este objetivo. Meu muito obrigada!

“Foi o tempo que dedicaste à tua rosa que a fez tão importante”

(Antoine de Saint-Exupéry)

RESUMO

Staphylococcus spp. é considerado um dos agentes de maior impacto para as infecções associadas aos cuidados em saúde e também uma das principais causas de complicações infecciosas em pacientes com câncer. A gravidade das infecções estafilocócicas está relacionada à presença de fatores de resistência e de virulência, os quais favorecem a evasão bacteriana do sistema de defesa do hospedeiro. Com objetivo de comparar isolados de *Staphylococcus* spp. de pacientes oncológicos e não oncológicos de dois hospitais da cidade do Recife, durante o ano de 2013, foram realizados testes de susceptibilidade antimicrobiana e reações em cadeia da polimerase (PCR) para identificar a ocorrência de genes de resistência (*mecA*, *blaZ*, *ermA* e *ermC*) e virulência (*icaAD* e *hlg*). Também, identificou-se a resistência à vancomicina em *Staphylococcus* spp., através de métodos fenotípicos e os fatores de risco mais prevalentes para infecção em pacientes oncológicos. Observou-se um maior percentual de isolados sensíveis aos antimicrobianos testados. Em relação ao fármaco vancomicina, foram identificados 27,3% de isolados resistentes pela técnica do *screening*. No hospital oncológico foram positivos, 50% e 77,7% respectivamente para o gene *blaZ* e *mecA*. Observou-se percentuais de isolados positivos de 25%, 42,8%, 32,1% e 70%, respectivamente para *icaAD* e *hlg* no hospital universitário e hospital oncológico. No hospital oncológico, observou-se um isolado de fenótipo constitutivo positivo para o gene *ermC*. Após a realização dos testes de associação estatísticos, não foi observada diferença estatisticamente significativa na presença dos genes de resistência quando comparou-se os dois hospitais. No grupo de pacientes oncológicos, observou-se diferença significativa quando comparados os indivíduos infectados com *Staphylococcus* spp. que albergavam o gene *mecA* e os indivíduos infectados com *Staphylococcus* spp. sem o gene *mecA* em relação a contagem de neutrófilos no período da infecção. Em relação aos genes de virulência, foi possível observar diferença estatisticamente significativa entre os dois hospitais. Assim, não existe diferença significativa na presença de genes de resistência quando se compara grupos de pacientes, entretanto observa-se diferenças significativas em relação à presença dos genes relacionados à virulência entre diferentes grupos, o que pode estar associado às características dos pacientes e suas internações. Desta forma, concluiu-se que o monitoramento antimicrobiano é essencial para o tratamento das infecções em cada hospital e a condição do paciente parece estar ligada ao potencial patogênico do microrganismo.

Palavras-chave: *Staphylococcus*. Antimicrobianos. Oncologia. Resistência. Virulência.

ABSTRACT

Staphylococcus spp. is one of the major infection-associated agent within health care and one of principal cause of complication in cancer patients. The severity of staphylococcal infections is related to the presence of resistance and virulence factors, which favor bacterial evasion of the host defense system. In order to compare isolates of *Staphylococcus* spp. of oncological and non-oncological patients from two hospitals in the city of Recife, during the period of 2013, antimicrobial susceptibility and polymerase chain reaction (PCR) tests were performed to identify the occurrence of resistance genes (*mecA*, *blaZ*, *ermA* and *ermC*) and virulence genes (*icaAD* and *hlg*). Resistance to vancomycin was identified by phenotypic methods in *Staphylococcus* spp. and the most prevalent risk factors for infection in cancer patients. A higher percentage of antimicrobial susceptible isolates was observed. Regarding the vancomycin drug, 27.3% of resistant isolates were identified by the screening technique. At the oncology hospital they were positive, 50% and 77.7% respectively for the *blaZ* and *mecA* gene. Percentage of positive isolates of 25%, 42.8%, 32.1% and 70%, respectively, found for *icaAD* and *hlg* in the university hospital and oncology hospital, respectively. A positive constitutive phenotype isolate for the *ermC* gene was observed at the oncology hospital. After performing the statistical association tests, no statistically significant difference was observed in the presence of resistance genes when comparing the two hospitals. In the group of cancer patients, a significant difference was observed when compared to individuals infected with *Staphylococcus* spp. that harbored the *mecA* gene and individuals infected with *Staphylococcus* spp. without the *mecA* gene in relation to the neutrophil count at the time of infection. Regarding the virulence genes, it was possible to observe a statistically significant difference between the two hospitals. Thus, there is no significant difference in the presence of resistance genes when comparing groups of patients, however, there are significant differences regarding the presence of virulence-related genes between different groups, which may be associated to the characteristics of the patients and their hospitalizations. In conclusion, antimicrobial monitoring is essential for the treatment of infections in each hospital and the patient's condition appears to be linked to the pathogenic potential of the microorganism.

Keywords: *Staphylococcus*. Antimicrobials. Oncology. Resistance. Virulence.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Fotografia de colônias de <i>Staphylococcus aureus</i> em Ágar Sangue (à esquerda) e microscopia óptica (à direita) mostrando o agrupamento em cachos e os cocos Gram positivos.....	21
Figura 2: Cronologia da resistência a antibióticos dos <i>S. aureus</i>	24
Figura 3: Principais mecanismos de resistência aos betalactâmicos em Gram positivos.....	28
Figura 4: Complexo do gene <i>mec</i> , <i>mecR1</i> (indutor) e <i>mecI</i> (repressor).....	30
Figura 5: Sistema de transdução de sinal provocando a síntese de betalactamase.....	32
Figura 6: Ilustração de alguns dos tipos de <i>SCCmec</i> e sua estrutura.....	34
Figura 7: Regulação da expressão do gene <i>ermC</i> em organismos resistentes à eritromicina.....	40
Figura 8: Mecanismo de resistência à vancomicina em cepas VRSA.....	44
Figura 1: Gel de agarose 2% representativo da amplificação da PCR do tipo de <i>ccr</i> . Amostras positivas para <i>mecA</i>	89

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Algumas enzimas e toxinas produzidas por <i>S. aureus</i> relacionadas aos mecanismos de patogenicidade e de resistência a esse patógeno.....	47
Tabela 2: Sequência de <i>primers</i> utilizados para as reações de PCR multiplex para determinação do <i>ccr complex</i>	64
Tabela 3: Componentes para mistura de uma reação de PCR multiplex para <i>ccr complex</i>	64
Tabela 1: Sequência de <i>primers</i> utilizados para reações de PCR multiplex para determinação do complexo <i>ccr</i> (Kondo et al., 2007).....	81
Tabela 2: Distribuição dos isolados de <i>Staphylococcus spp.</i> por amostra e hospital de origem.....	82
Tabela 3: Susceptibilidade antimicrobiana de isolados de <i>Staphylococcus spp.</i> de Hospital Universitário e Hospital Oncológico.....	83
Tabela 4: Susceptibilidade antimicrobiana à oxacilina e vancomicina em isolados de <i>Staphylococcus spp.</i> de hospital universitário e hospital oncológico.....	84
Tabela 5: Resultados das PCR para os genes <i>ermA</i> e <i>ermC</i> para os dois hospitais.....	85
Tabela 6: Resultados de PCR para os genes <i>blaZ</i> , <i>mecA</i> , <i>icaAD</i> e <i>hlg</i> para os dois hospitais.....	86
Tabela 1: Distribuição dos isolados de <i>Staphylococcus spp.</i> por tipo de amostra e por espécie.....	102
Tabela 2: Susceptibilidade antimicrobiana de <i>Staphylococcus spp</i> provenientes de pacientes oncológicos.....	103
Tabela 3: Resultados das PCR para os genes <i>blaZ</i> e <i>mecA</i>	103
Tabela 4: Variáveis clínicas e demográficas dos pacientes do hospital do câncer no ano de 2013.....	104

LISTA DE QUADROS

	Página
Quadro 1: Tipos de <i>SCCmec</i> atualmente identificados em cepas de <i>S. aureus</i> .(O gene <i>ccr</i> ou o complexo <i>ccr</i> estão indicados entre parêntesis).....	33
Quadro 2: Definição e categorização das variáveis do estudo.....	56
Quadro 3: Variáveis independentes.....	57
Quadro 4: Produtos de PCR em eletroforese em gel de agarose 2%	65
Quadro 1: Produtos de PCR de eletroforese em gel de agarose 2%.....	81
Quadro 2: Resultados para o valor de p para comparações entre as PCR para os genes de resistência para os dois hospitais.....	87
Quadro 3: Resultados do valor de p para comparações entre PCR dos genes de virulência para os dois hospitais.....	88
Quadro 1: Características das amostras do hospital do câncer no ano de 2013, relacionadas ao perfil de susceptibilidade à vancomicina.....	106

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

6-APA: Ácido 6-aminopenicilânico

Ágar Casoy: Ágar Triptona de Soja

ATCC: American Type Culture Collection

BHI: Infusão de cérebro e coração

bp: pares de base

CA-MRSA: MRSA Associado à Comunidade

CEP: Comitê de Ética em Pesquisa

CCIH: Comissão de Controle de Infecção Hospitalar

ccrs: cassette chromosome recombinases

CCS: Centro de Ciências da Saúde

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

D-Ala-D-Ala: D-alanina-D-alanina

D-Ala-D-lac: D-alanina-D-lactato

DNA: Ácido Desoxirribonucléico

DNase: Desoxirribonuclease

dNTP: Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

EDTA: Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

GISA: *S. aureus* com resistência intermediária aglicopeptídeos

GRSA : *S. aureus* resistente a glicopeptídeos

HC: Hospital das Clínicas de Pernambuco

HCA-MRSA: MRSA Associado aos Cuidados em Saúde

HCl: Ácido Clorídrico

HCP: Hospital do Câncer de Pernambuco

hGISA: *S. aureus* com resistência heterogênia a glicopeptídeos

IS: Segmento de Inserção

kb: kilobase

MgCl₂: Cloreto de Magnésio

MLSB₁: Resistência induzível aos Macrolídeos, Lincosamidas e Estreptograminas B

MLSB₂: Resistência constitutiva aos Macrolídeos, Lincosamidas e Estreptograminas B

MRSA: *Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina

MSSA: *Staphylococcus aureus* Sensível à Meticilina

NaCl: Cloreto de sódio

NCTC: National Collection of Type Cultures

OFR: *Open Frame Reading*

PBP: Proteína ligadora de Penicilina

PCR: Reação em cadeia da Polimerase

PNAG: *N*-acetil-glicosamina polimérica

PVL: Leucocidina de Panton-Valentine

RNA: Ácido Ribonucleico

rRNA: RNA ribossomal

RNase: Ribonuclease

SDS: Dodecil Sulfato de Sódio

SCCmec: *Staphylococcal Cassete Chromosome mec*

SCoN: *Staphylococcus* coagulase negativa

STE: SDS+Tris-HCl+EDTA

TBE: Tris-borato-EDTA

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TE: Tris-HCl+EDTA

Tn: Transposon

TSS: Síndrome do choque tóxico

TSSTs: Toxinas da Síndrome do Choque Tóxico

UFPE: Universidade Federal de Pernambuco

UV: Ultravioleta

VISA: *S. aureus* com resistência intermediária à vancomicina

VRSA: *S. aureus* vancomicina-resistente

VRE: Enterococos resistentes à vancomicina

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1 Características gerais do gênero <i>Staphylococcus</i>	20
2.2 Colonização e infecção relacionadas ao <i>Staphylococcus</i> spp.	22
2.3 Mecanismos de resistência de estafilococos aos antimicrobianos	24
2.4 Mecanismos de resistência aos antibióticos betalactâmicos em <i>Staphylococcus</i> spp.	26
2.5 Resistência aos macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas B em <i>Staphylococcus</i> spp.	37
2.6 Resistência à vancomicina em <i>Staphylococcus</i> spp.	42
2.7 Patogenicidade e virulência dos <i>Staphylococcus</i> spp.	46
2.8 Infecção por <i>Staphylococcus</i> spp. em pacientes oncológicos	50
3 OBJETIVOS	53
3.1 Objetivo geral	53
3.2 Objetivos específicos	53
4 MATERIAIS E MÉTODOS	54
4.1 Desenho do estudo	54
4.2 Locais do estudo	54
4.3 População alvo	55
4.4 Critérios de inclusão e exclusão	55
4.5 Tipo de amostragem e definição do tamanho da amostra	55
4.6 Definição, categorização e caracterização das variáveis do estudo	55
4.7 Definição de termos	58
4.8 Coleta de dados	58
4.9 Técnicas laboratoriais empregadas	59
4.9.1 Coleta dos isolados bacterianos.....	59
4.9.2 Reisolamento e identificação do <i>Staphylococcus</i> spp.....	59
4.9.3 Susceptibilidade aos antimicrobianos.....	60
4.9.4 <i>Screening</i> de Oxacilina.....	60
4.9.5 <i>Screening</i> de Vancomicina.....	60
4.9.6 Microdiluição em caldo de vancomicina.....	61

4.9.7 Extração de DNA total.....	61
4.9.8 Identificação do gene <i>mecA</i> por PCR.....	62
4.9.9 Identificação do gene da betalactamase (<i>blaZ</i>) por PCR.....	63
4.9.10 Determinação do tipo de <i>SCCmec</i>	63
4.9.11 Detecção dos genes <i>ermA</i> e <i>ermC</i> pela técnica da PCR.....	65
4.9.12 Detecção dos genes <i>icaA</i> e <i>icaD</i>	66
4.9.13 Detecção do gene <i>hlg</i>	66
4.9.14 Preservação das amostras.....	67
4.9.15 Análise dos dados.....	67
4.9.16 Considerações éticas.....	67
5 RESULTADOS.....	69
PATOGENICIDADE E RESISTÊNCIA DE <i>Staphylococcus</i> spp. DE PACIENTES ONCOLÓGICOS E NÃO ONCOLÓGICOS DE DOIS HOSPITAIS DA CIDADE DE RECIFE-PE.....	69
RESISTÊNCIA À VANCOMICINA E FATORES DE RISCO DE INFECÇÃO POR <i>Staphylococcus</i> spp. EM PACIENTES ONCOLÓGICOS DA CIDADE DE RECIFE-PE.....	90
6 CONCLUSÕES.....	107
REFERÊNCIAS.....	109
APÊNDICES.....	133
Apêndice A (PATHOGENICITY AND RESISTANCE OF <i>Staphylococcus</i> spp. IN ONCOLOGIC AND NON ONCOLOGIC PATIENTS IN TWO HOSPITALS OF RECIFE CITY/PE.....	133
Apêndice B (VANCOMYCIN RESISTANCE AND <i>Staphylococcus</i> spp. INFECTION RISK FACTORS IN ONCOLOGIC PATIENTS OF THE CITY OF RECIFE-PE).....	157
ANEXOS.....	182
Anexo A- Questionário de pesquisa.....	182
Anexo B – Aprovação do Comitê de Ética Hospital das Clínicas de Pernambuco.....	184
Anexo C – Carta de anuência ULAB-HC.....	185
Anexo D – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética Hospital do Câncer de Pernambuco.....	186

1 INTRODUÇÃO

As infecções bacterianas são uma das principais causas de complicações em pacientes com cânceres hematológicos e neutropenia induzida por quimioterapia e as bacteremias são a principal causa de morte, seja diretamente ou por interferir no cronograma da quimioterapia (BUCANEVE et al., 2005; PAUL et al., 2010; MONTASSIER et al., 2013; QUILES et al., 2015). Os fatores de risco para infecção neste grupo de pacientes são mais expressivos, pois além do imunocomprometimento causado pela própria patologia, eles são submetidos a tratamento cirúrgico, quimioterápico e/ou radioterápico, sendo a neutropenia um dos maiores riscos para infecção nesta população (CAVALCANTE, 2000; COSTA, ATTA, SILVA, 2015).

Staphylococcus aureus e *Staphylococcus coagulase negativo* (SCoN) são os microrganismos mais frequentemente isolados no ambiente hospitalar, com 30% cada um, em infecções de pacientes adultos em uso de cateter vascular central (BUSTAMANTE; ESPÍNOLA, 2007; MULDREW et al., 2008; SCHAEFER et al., 2009) e a taxa de infecção em pacientes pediátricos é de 1,82 por 1000 dias de uso de cateter vascular central. Com respeito às infecções da corrente sanguínea nos pacientes em tratamento com drogas antineoplásicas, a taxa por 1000 dias de neutropenia ascende a 3,67% (BUSTAMANTE; ESPÍNOLA, 2007). Em relação a isto, Kabalan et al (2010) relataram que nos pacientes com neutropenia severa existe maior ocorrência de infecções por SCoN.

Esse patógeno se destaca por sua facilidade de propagação, principalmente no ambiente intra-hospitalar, relacionada à aquisição de resistência aos antimicrobianos e pela sua capacidade de causar vários tipos de infecções como foliculites, furúnculos, impetigo, até infecções sistêmicas potencialmente fatais (SOUSA et al., 2011; JENKINS et al., 2015).

Além disto, essa bactéria pode evadir-se do sistema imune do hospedeiro devido a existência de vários fatores de virulência. Diversos estudos apresentam o gene *hlg* produtor da gama-hemolisina, uma toxina, e o gene *ica*, produtor de biofilme, considerados fatores de virulência, entre estirpes isoladas de pacientes com infecções relacionadas a cateteres (LISA, 2004; NININ et al., 2006). Entretanto essas comparações não foram realizadas em pacientes de centros de oncologia. A produção de biofilme pode permitir que estes isolados colonizem o cateter e outros dispositivos, evadindo-se do sistema imunológico e ação dos antimicrobianos, o que pode levar a um aumento da frequência de bacteremia e falso-negativas (CAFISO et al., 2004; OTTO, 2004; FOKA et al., 2006). Thuler et al.(1999) realizaram um estudo em um

hospital de oncologia do Rio de Janeiro sugerindo que as linhagens *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) são mais virulentas do que *Staphylococcus aureus* sensíveis à meticilina (MSSA) em pacientes com câncer apenas através da análise das manifestações clínicas.

Ressalta-se que os centros de terapia intensiva concentram as maiores taxas de incidência de infecções hospitalares e de emergência de resistência microbiana, devido ao internamento de pacientes graves. Esses pacientes, na maioria das vezes, utilizam antimicrobianos de largo espectro e são submetidos a inúmeros procedimentos invasivos (CATANEO et al., 2011), porém alguns estudos demonstraram que pacientes neutropênicos de baixo risco não necessitam hospitalização e antibioticoterapia de amplo espectro prolongados para infecções invasivas bacterianas (SANTOLAYA et al., 2004; CAGOL, 2009), reforçando a importância da caracterização adequada dos perfis de resistência das estipes bacterianas.

Portanto, a importância desse microrganismo reside em seu perfil de resistência aos antimicrobianos, associada à virulência mediada por suas toxinas, seu caráter invasivo e possibilidade de colonização em superfícies bióticas e abióticas (LE LOIR, BARON, GAUTIER, 2003; WISPLINGHOFF et al., 2004; BLOMQUIST et al., 2015; JENKINS et al., 2015). A presença desses fatores de virulência está relacionada à diversidade de manifestações clínicas (LE LOIR, BARON, GAUTIER, 2003; LIM et al., 2012; JENKINS et al., 2015), porém em relação aos pacientes de oncologia, isto não está totalmente esclarecido.

Diante disto, o presente trabalho se propõe a caracterizar *Staphylococcus* spp. isolados de pacientes oncológicos e não oncológicos de dois hospitais da cidade do Recife-PE, em relação à susceptibilidade aos diversos antimicrobianos, especialmente aos betalactâmicos, macrolídeos, lincosamidas, estreptograminas e glicopeptídeos, e alguns de seus genes de resistência (*blaZ*, *mecA*, *ermA* e *ermC*), além da caracterização do tipo de *SCCmec* e a presença de genes de virulência (*hlg* e *icaAD*). O presente estudo objetiva também verificar a associação dos dados obtidos com as características clínicas e de internamento dos pacientes oncológicos.

Assim, a análise genética e microbiológica, seguidos de investigação das características clínicas dos pacientes, favorece o conhecimento das linhagens bacterianas através de fatores de resistência e virulência, fornecendo dados de interesse epidemiológico, chamando atenção para as medidas de uso racional de antimicrobianos e tratamento das infecções nos hospitais em estudo.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Características gerais do gênero *Staphylococcus*

O gênero *Staphylococcus* pertence à família Staphylococcaceae e possui 49 espécies, algumas delas podendo ser isoladas de amostras biológicas humanas. Está dividido em dois grandes grupos: *Staphylococcus* coagulase positivo, cujo principal representante é o *Staphylococcus aureus* e o grupo dos *Staphylococcus* coagulase negativos (SCoN). Dentre os SCoN mais frequentemente associados a infecções humanas encontramos *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus warneri* e *Staphylococcus saprophyticus* (KONEMAN et al., 2008; EUZÉBY, 2015).

Geralmente, essas bactérias fazem parte da microbiota da pele humana normal e de outros sítios anatômicos, porém *S. aureus* está frequentemente relacionado com diversas infecções em seres humanos, principalmente em ambiente nosocomial, sendo considerada a espécie de maior interesse médico (CASSETARI, STRABELLI, MEDEIROS, 2005; GORDON; LOWY, 2008; KONEMAN et al., 2008; SOARES et al., 2008; KLUYTMANS; STRUELENS, 2009).

Staphylo vem do grego *staphylé* – cacho de uvas e no exame microscópico, os estafilococos podem apresentar-se como células esféricas, de aproximadamente 0,5 a 1,5µm de diâmetro, agrupadas em diversas formas, desde isoladas, aos pares, tétrades, em cadeias curtas, ou com aspecto semelhante a um cacho de uvas, devido à sua divisão celular, que ocorre em três planos perpendiculares. São bactérias imóveis e não formadores de esporos, geralmente não capsulados, anaeróbias facultativas, com metabolismo fermentativo (TRABULSI et al., 2002; SILVA et al., 2007; KONEMAN et al., 2008), sendo consideradas Gram positivas devido ao fato de sua parede celular, composta em 90% por peptidoglicano, reter o cristal violeta durante a coloração de Gram (Figura 1). No diagnóstico laboratorial, apresentam atividade da catalase positiva distinguindo-se desta forma do gênero *Streptococcus*, que são catalase negativo (TORTORA, FUNKE, CASE, 2005; SILVA et al., 2007; KONEMAN et al., 2008).

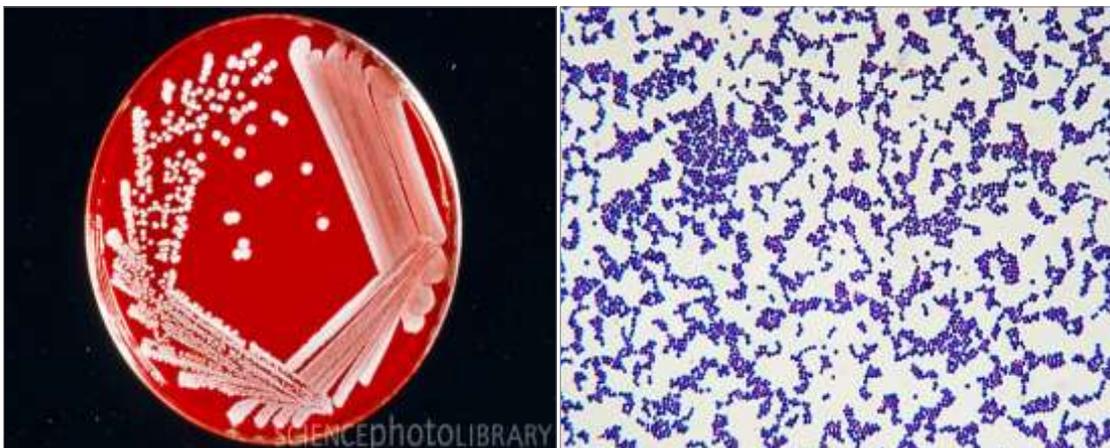
As amostras de *Staphylococcus* spp. crescem em meios comuns, caldo ou ágar simples, pH=7, com temperatura ótima de 37°C. As colônias formadas em placa, após 18-24 horas de incubação, apresentam-se arredondadas, lisas e brilhantes (Figura 1). A coloração dessas colônias varia desde o acinzentado até o amarelo-ouro, e normalmente é possível observar um

halo de hemólise em torno das colônias quando o cultivo é feito em placas de Ágar Sangue (TRABULSI et al., 2002; CASSETARI, STRABELLI, MEDEIROS, 2005; SILVA et al., 2007; KONEMAN et al., 2008). Apesar do crescimento em anaerobiose, *S. aureus* e *S. epidermidis* crescem melhor aerobicamente, inclusive a presença de oxigênio é necessária para a produção de pigmento nas colônias (KONEMAN et al., 2008).

Um meio importante para a identificação do *S. aureus* é o Ágar Manitol Salgado, seletivo para essa espécie, uma vez que *S. aureus* consegue fermentar o manitol, produzindo ácido lático. Essa espécie se desenvolve também na presença de 7,5% de NaCl, que estimula a produção de coagulase, enzima que caracteriza a espécie (CASSETARI, STRABELLI, MEDEIROS, 2005; KONEMAN et al., 2008). De acordo com a capacidade de coagular o plasma, os estafilococos são divididos em coagulase positivos e coagulase negativos (KONEMAN et al., 2008).

Desta forma, *S. aureus* podem ser identificados através das provas da catalase, coagulase, fermentação do manitol, além da prova da Desoxirribonuclease (DNase), que consiste na adição de ácido clorídrico sobre as colônias crescidas em meio contendo DNA, para posterior visualização de halo em torno das mesmas. *S. epidermidis* normalmente é diferenciado laboratorialmente das demais espécies de coagulase negativos presentes em amostras clínicas humanas, através da prova da novobiocina, na qual apresenta sensibilidade à droga (KONEMAN et al., 2008).

Figura 1: Fotografia de colônias de *Staphylococcus aureus* em Ágar Sangue (à esquerda) e microscopia óptica (à direita) mostrando o agrupamento em cachos e os cocos Gram positivos.



Disponível em <http://www.sciencephoto.com>, acesso 24/10/2015.

2.2 Colonização e infecção relacionadas ao *Staphylococcus* spp.

Staphylococcus aureus é referido como uma bactéria comum da microbiota humana, colonizando as narinas de forma intermitente em 30% da população e de forma persistente cerca de 20%. A maioria dos portadores são assintomáticos e o processo de infecção normalmente está associado a algum fator que diminui a resposta imunológica do indivíduo, como doenças ou procedimentos médicos invasivos (GORDON; LOWY, 2008; JENKINS et al., 2015).

Os estafilococos são considerados um problema crescente nas unidades hospitalares e, nos últimos anos, tem sido referido como um dos principais agentes de bacteremia, frequentemente adquirida no ambiente hospitalar (KLUYTMANS; STRUELENS, 2009; JENKINS et al., 2015). É um patógeno que se destaca por sua facilidade de propagação, relacionada à aquisição de resistência aos antimicrobianos. Sua importância clínica decorre da capacidade de causar vários tipos de infecções como foliculites, furúnculos, impetigo, até infecções sistêmicas potencialmente fatais (SOUSA et al., 2011; JENKINS et al., 2015).

Essas infecções graves podem gerar consequências preocupantes, principalmente no que diz respeito à antibioticoterapia e prognóstico do paciente (FELTEN et al., 2002; KLUYTMANS, BELKUM, VERBRUGH, 1997; SILVA et al., 2007). As doenças provocadas por *S. aureus* podem ser decorrentes da invasão direta dos tecidos, de bacteremia primária ou, exclusivamente, ser devido às toxinas que ele produz. A bacteremia por *S. aureus* é uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo (DAS et al., 2007; SANGAPPA, THIAGARAJAN, 2012).

Este patógeno pode ser encontrado colonizando a pele úmida em diferentes regiões como nariz, períneo e axilas, que aliado a fatores de virulência determina sua patogenicidade em infecções frequentemente agudas e piogênicas (CORBELLA et al., 1997; GORDON; LOWY, 2008; JENKINS et al., 2015). De acordo com a localização e outras características, essas infecções podem receber diferentes designações, como foliculite (infecção do folículo piloso), carbúnculo, furúnculos localizados na região cervical posterior, hordéolo (terçol) e impetigo (CORBELLA et al., 1997; SANTOS et al., 2007).

A capacidade de causar infecções invasivas como bacteremia, pneumonia, osteomielite e endocardite é considerada uma característica relevante para esses microrganismos (COELLO et al., 1997; FLOCK et al., 1996; SOUSA et al., 2011; JENKINS et al., 2015) e se tratando de infecções relacionadas ao uso de dispositivos invasivos como cateteres,

Staphylococcus coagulase negativo tem papel de destaque (MACK et al., 2002; O'GARA, 2007).

As infecções estafilocócicas eram inicialmente controladas com o uso da penicilina, porém alguns anos após a descoberta desse antibiótico, já em 1942, foram relatados casos de cepas resistentes à penicilina, devido à produção de enzimas denominadas betalactamases. Em 1959, isolou-se ácido 6-aminopenicilânico (6-APA), tornando possível a produção de penicilinas semi-sintéticas. Modificações na cadeia desse precursor da penicilina resultaram na proteção do anel betalactâmico contra a ação dessas enzimas, estando a oxacilina e a meticilina entre os primeiros agentes antimicrobianos com essas características. Esses fármacos apresentavam melhor desempenho que a penicilina sobre *S. aureus* (MARANAN et al., 1997; KIM, 2009; SANGAPPA, THIAGARAJAN, 2012; TANG, APISARNTHANARAK, HSU, 2014; JENKINS et al., 2015).

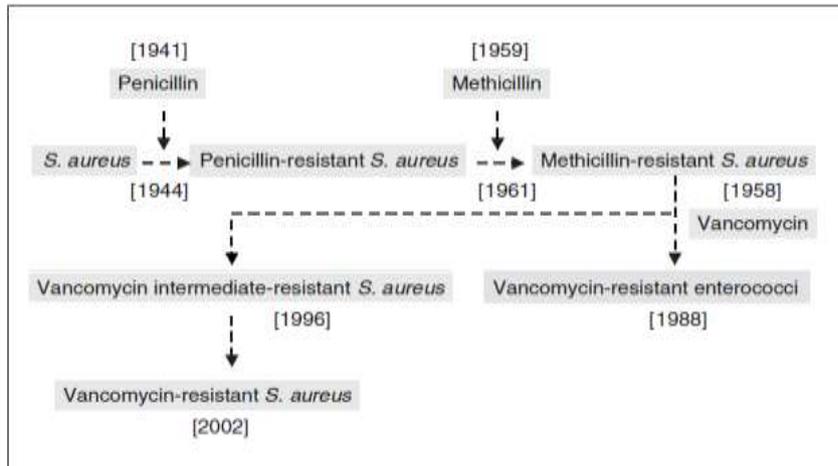
Em 1961, no Reino Unido, ocorreram os primeiros relatos de cepas isoladas de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA), que rapidamente emergiram em outros países europeus, onde ocorreram surtos de infecções hospitalares provocados por este microrganismo, ocorrendo também, relatos de MRSA isolados no Japão, Austrália e Estados Unidos. A cronologia da resistência a antibióticos em *S. aureus* está resumida na Figura 2. Diante disto, os MRSA passaram a ser considerados como um importante problema clínico, por se tratarem de um dos principais causadores de infecções, de tratamento cada vez mais difícil, especialmente em pacientes graves, devido às limitadas opções terapêuticas (RUBIN et al., 1999; ENRIGHT et al., 2002; TVERDEK, CRANK, SEGRETI, 2008).

No Brasil, a frequência de isolamento de *S. aureus* e sua relação com infecções hospitalares atingem valores elevados. Em muitos hospitais brasileiros, a prevalência de isolamento de cepas de MRSA varia de 40 a 80% (OLIVEIRA et al., 2001; TRINDADE et al., 2005; SANTOS et al., 2010; JONES et al., 2013; ALMEIDA et al., 2014; BRAGA et al., 2014; SILVEIRA et al., 2015) e os dados do Programa de Vigilância a Antimicrobianos mostram que MRSA corresponde a 31% da causa de infecções nosocomiais e comunitárias, sendo considerado o mais comum dentre os patógenos mais prevalentes (GALES et al., 2009; JONES et al., 2013; ALMEIDA et al., 2014).

Além de ter-se estabelecido mundialmente como o principal patógeno hospitalar, MRSA está se tornando cada vez mais prevalente em infecções de origem comunitária (O'BRIEN et al., 1999; BHATTACHARYA et al., 2007; JONES et al., 2013; JENKINS et al., 2015). O primeiro caso de infecção potencialmente fatal por MRSA de origem

comunitária no Brasil foi descrito em uma criança do Rio de Janeiro por ROZENBAUM et al (2009) e dados a respeito da prevalência de infecções desse tipo ainda são considerados escassos.

Figura 2: Cronologia da resistência a antibióticos dos *S. aureus*.



Fonte: KIM, 2009.

2.3 Mecanismos de resistência de estafilococos aos antimicrobianos

A resistência adquirida aos antimicrobianos pode ocorrer através de dois grandes mecanismos: mutação num *loci* cromossomal ou por transferência horizontal de elementos genéticos móveis, ou seja, por aquisição de genes de resistência presentes anteriormente em outros microrganismos através de mecanismos de transdução, transformação ou conjugação (ITO et al., 2003)

As mutações geralmente são espontâneas e aleatórias, envolvendo polimorfismos de único nucleotídeo numa taxa de 10^{-9} e 10^{-10} por gene (TANG, APISARNTHANARAK, HSU, 2014). Consequentemente, alvos da droga podem ser alterados, enzimas capazes de inativar antibióticos podem ser expressas, podem ocorrer alterações nos sistemas de efluxo e mecanismos de absorção podem ser perdidos. Em algumas circunstâncias, as mutações ocorrem nos genes reguladores ou as alterações não resultam em perdas de todas as funções da proteína. Esta via de desenvolvimento da resistência é frequentemente considerada de menor importância, como mutações pontuais e cumulativas, geralmente necessária para a resistência fenotípica, embora seja possível que o estirpe portadora do alelo mutado se torne o organismo predominante sob pressão seletiva, como a utilização de antimicrobianos (TANG, APISARNTHANARAK, HSU, 2014).

Em contraste, a transferência horizontal de genes é a principal forma de propagação rápida e ampla de resistência a antimicrobianos. Genes de resistência a estes fármacos são transportados por elementos genéticos móveis, tais como transposons e os plasmídeos (material genético extracromossômico que pode conter uma variedade de genes de resistência). Estes atuam como vetores para a transferência dentro da mesma espécie ou de espécies diferentes através processos de conjugação, transformação e transdução. Sítios de atividade da droga (alvo) podem ser alterados por modificação enzimática (por exemplo, a metilação de rRNA 16S na resistência aos aminoglicosídeos), por mutações genômicas (por exemplo, DNA girase na resistência à quinolonas), e/ou metabolicamente (por exemplo, resistência à sulfonamida). Por outro lado, o antimicrobiano pode submeter-se a inativação enzimática (por exemplo, a acetilação de aminoglicosídeos) e degradação (por exemplo, betalactâmicos por betalactamases), reduzida acessibilidade na entrada na célula bacteriana (por exemplo, perda de porina) e/ou aumento da expulsão (por exemplo, bomba de efluxo) (ITO et al., 2003; TANG, APISARNTHANARAK, HSU, 2014).

Em *Staphylococcus*, a resistência a quase todas as novas classes de antibióticos é mediada principalmente por determinantes adquiridos através de transferência horizontal de genes. A aquisição de material genético de outro microrganismo oferece a possibilidade de adquirir resistência a múltiplos antibióticos (PANTOSI, SANCHINI, MONACO, 2007; TANG, APISARNTHANARAK, HSU, 2014).

Dentre os diversos mecanismos de resistência encontrados em *Staphylococcus*, os mais comuns são a resistência aos macrolídeos, aminoglicosídeos, betalactâmicos e glicopeptídeos.

A resistência aos macrolídeos, lincosaminas e estreptograminas B pode ocorrer por três mecanismos:

1. Modificações no alvo de ligação no ribossomo, que confere resistência cruzada aos macrolídeos, lincosaminas e estreptograminas B, sendo codificado pelos genes *ermA* ou *ermC*;
2. Efluxo ativo, que confere resistência aos macrolídeos e estreptograminas B, codificado pelos genes *mrsA*;
3. Inativação das drogas (LIVERMORE, WINSTANLEY, SHANNON, 2001; SANGAPPA, THIAGARAJAN, 2012).

No que se refere aos aminoglicosídeos, o principal mecanismo de resistência é a inativação das drogas por enzimas celulares modificadoras de aminoglicosídeos. Essas

enzimas modificadoras são codificadas por diversos *loci* distintos e já caracterizadas em *Staphylococcus*. As enzimas de maior importância clínica codificadas por essas regiões são a acetiltransferase (AAC), a adeniltransferase (ANT) e fosfotransferase (APH). Os aminoglicosídeos, modificados em grupos aminos pela enzima AAC ou em grupos hidroxila pela enzima ANT ou APH, perdem a habilidade de se ligar aos ribossomos e assim não inibem mais a síntese protéica de células bacterianas (ITO et al., 2003; TANG, APISARNTHANARAK, HSU, 2014).

2.4 Mecanismos de resistência aos antibióticos betalactâmicos em *Staphylococcus* spp.

Antibióticos betalactâmicos, nas bactérias Gram positivas, exercem atividade bactericida por ligação covalente e inativação de enzimas conhecidas como proteínas ligadoras de penicilina (PBP), resultando em interferência na síntese e remodelação do peptidoglicano bacteriano. Essas enzimas são responsáveis por catalisar um estágio da biossíntese do peptidoglicano, um componente da parede celular. Essa ligação resulta em um complexo estável do antibiótico com uma ou mais dessas enzimas, impedindo a formação peptidoglicano, o que por sua vez, leva à morte celular (LYON; SKURRAY, 1987; GIESBRECHT et al., 1998; LOWY, 2003; SANGAPPA, THIAGARAJAN, 2012; TANG, APISARNTHANARAK, HSU, 2014).

Em MRSA, existem dois mecanismos de resistência a betalactâmicos: 95% dos isolados resistentes produzem uma enzima betalactamase (penicilinase) codificada pelo gene *blaZ*, que cliva hidroliticamente betalactâmicos da classe da penicilina; e o segundo mecanismo envolve isolados de MRSA contendo o gene *mecA* que codifica a PBP2a (SANGAPPA, THIAGARAJAN, 2012; TANG, APISARNTHANARAK, HSU, 2014).

S. aureus produz quatro PBPs envolvidas na síntese da parede celular. Além dessas PBPs, uma outra PBP foi descoberta em MRSA, a qual foi chamada PBP2' ou PBP2a porque está localizada entre a PBP1 e a PBP2 quando separadas por eletroforese (ITO; HIRAMATSU, 1998; TANG, APISARNTHANARAK, HSU, 2014).

Dessa forma, a resistência à metilina em *S. aureus* é determinada, na grande maioria das vezes, pela presença de um gene localizado no cromossomo, o gene *mecA*, que é responsável pela síntese da PBP2a ou PBP2' (CHAMBERS, 1997; LOWY, 2003; SCHITO, 2006; TANG, APISARNTHANARAK, HSU, 2014). Este gene é amplamente distribuído entre *S. aureus* e entre as espécies de *Staphylococcus* coagulase negativo (ITO et al., 2001;

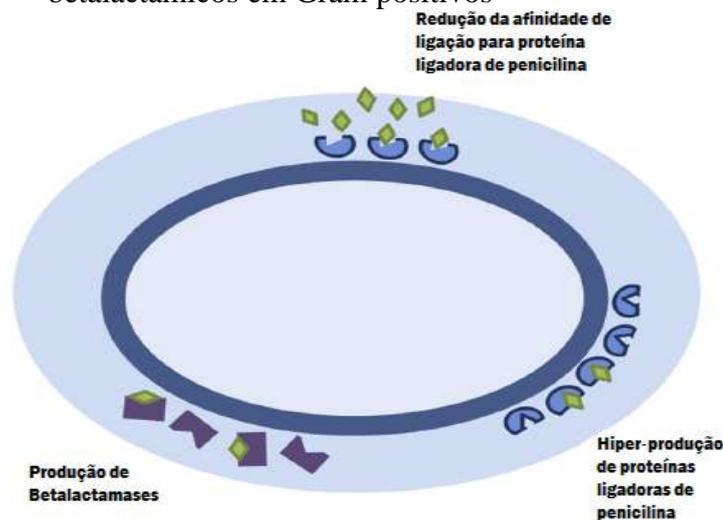
JONES et al., 2013) e sabe-se que a PBP2a tem baixa afinidade não só para a metilina como para os outros antibióticos betalactâmicos e atua como um substituto para as outras PBPs, permitindo assim a sobrevivência das bactérias na presença de altas concentrações destes fármacos (SCHITO, 2006; TANG, APISARNTHANARAK, HSU, 2014). Esta baixa afinidade confere aos MRSA capacidade de crescimento em presença de antibióticos betalactâmicos, ou seja, a bactéria torna-se resistente a todos os antibióticos dessa classe, inclusive carbapenemas, cefalosporinas e monobactâmicos, restando poucas opções terapêuticas (CHAMBERS, 1997; ITO; HIRAMATSU, 1998; HIRAMATSU, ITO, HANAKI, 1999; MARTINEAU et al., 2000; DAUM et al., 2002; SANGAPPA, THIAGARAJAN, 2012; TANG, APISARNTHANARAK, HSU, 2014).

O gene *mecA* que codifica a PBP2a está localizado num elemento genético móvel específico conhecido como *Staphylococcal Cassette Chromosome mec* (SCC*mec*), que pode conter também outros genes de resistência a antimicrobianos, integrado no cromossomo utilizando recombinases (*ccrAB* ou *ccrC*) transportados no próprio elemento SCC*mec* (LOWY, 2003; SANGAPPA, THIAGARAJAN, 2012; TANG, APISARNTHANARAK, HSU, 2014). Este gene também está presente em *Staphylococcus coagulase negativo* resistentes à metilina e não está presente em cepas susceptíveis a este antimicrobiano. Acredita-se que este gene tenha sido adquirido de espécies que não têm relação próxima (ITO; HIRAMATSU, 1998; ENRIGHT et al., 2002). Segundo o Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), *S. aureus* resistentes à metilina podem parecer sensíveis *in vitro* a outros betalactâmicos, combinações de betalactâmicos e inibidores de betalactamases, carbapenêmicos e cefalosporinas, mas são ineficazes *in vivo* (CLSI, 2014).

Outros mecanismos de resistência dos estafilococos aos betalactâmicos considerados mais raros e com menor importância clínica já foram descritos. São alguns fatores cromossômicos, cuja atividade afeta o nível da resistência, e muitos destes genes estão envolvidos na biossíntese da parede celular (GIESBRECHT et al., 1998; TANG, APISARNTHANARAK, HSU, 2014). Em alguns desses casos, o mecanismo de resistência à metilina está associado com a hiper-produção de β -lactamase, PBPs alteradas (1, 2 e 4) e hiper-produção de PBP4, sendo possível observar na Figura 3, um resumo dos principais mecanismos de resistência aos betalactâmicos (MCDUGAL; THORSNSBERRY, 1986; TOMASZ et al., 1989; HACKBARTH et al., 1995; YOSHIDA et al., 2003). Essa hiperprodução de betalactamases é independente do gene *mecA* e promove o chamado fenótipo “borderline” (MARTINEAU et al., 2000). Esses isolados que elevam muito a

produção de betalactamases e/ou com PBPs modificadas, em geral, apresentam resistência fenotípica limítrofe ou de baixo grau (MARANAN et al., 1997; TANG, APISARNTHANARAK, HSU, 2014). Já foi relatada a existência de um homólogo do *mecA*, descrito primeiramente em *Staphylococcus* isolado de gado, o CC130, em isolados clínicos na Inglaterra e Dinamarca (CUNY et al., 2011).

Figura 3: Principais mecanismos de resistência aos betalactâmicos em Gram positivos



Fonte: TANG et al., 2014.

A *fem* (factor essencial para a resistência à meticilina) ou *aux* fatores (auxiliares), incluindo *llm*, *fntA* e *sigB*, também foram identificados por alterar a expressão de resistência. Estes genes estão localizados em DNA cromossômico separado do elemento *mec* e estão também envolvidos na síntese do peptidoglicano (TANG, APISARNTHANARAK, HSU, 2014). Dessa forma, genes como *femA*, *femB* e *mecR1* podem contribuir também para resistência MRSA (BERGER-BÄCHI, 1995; TANG, APISARNTHANARAK, HSU, 2014). Os genes *femA* e *femB* não tem envolvimento na síntese da PBP2a, mas estão envolvidos na ligação cruzada dos precursores da cadeia peptidoglicano-pentaglicina. A disfunção do *femA* ou *femB* diminui o conteúdo de glicina nos precursores do peptidoglicano e confere susceptibilidade à meticilina. A presença do *femA* é também necessária para o aumento da atividade autolítica nas cepas contendo *mecA* (BERGER-BÄCHI, ROHRER, 2002).

Alguns pesquisadores têm proposto métodos de laboratório que visam otimizar o tempo de análise e obter resultados mais precisos a respeito do estado de colonização por MRSA (BENICIO; REIS; PIMENTA, 2003; HULETSKY et al., 2005) e segundo alguns

autores, a expressão fenotípica da resistência depende de condições de crescimento tais como: temperatura, osmolaridade, suplementos nos meios de cultura, como por exemplo NaCl ou glicose (TENOVER et al., 1999; FERREIRA et al., 2003).

Com a evolução das técnicas de clonagem e sequenciamento, toda região do cromossomo em torno do gene *mecA*, em poucos anos, foi analisada, descrita e classificada, sendo então, encontradas duas regiões essenciais e comuns a todos os estafilococos resistentes à meticilina. Estas regiões foram denominadas como complexo do gene *mec* e complexo do gene *ccr*. As sequências entre os complexos, ou depois deles foram classificadas como regiões “junkyard” (sobras) ou região J (KATAYAMA, ITO, HIRAMATSU, 2001; SANGAPPA, THIAGARAJAN, 2012).

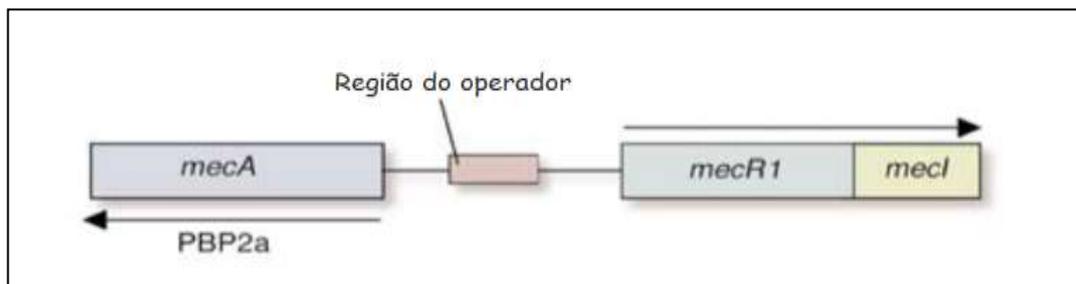
Este *SCCmec* corresponde a um elemento de 21 a 67kb de DNA, caracterizado pela presença de genes que codificam as recombinases *ccrA*, *ccrB* e *ccrC*, complexo *mec* e contendo segmentos de DNA associados, como sequências de inserção (*IS431*) e transposons (*Tn554*), que contêm genes de resistência a outros antimicrobianos (HIRAMATSU, et al., 2001; SANGAPPA, THIAGARAJAN, 2012).

O tipo de *SCCmec* é definido pela combinação do tipo de gene das *ccrs* (*cassette chromosome recombinase*), recombinases (*ccrA* e *ccrB* ou *ccrC*) responsáveis pela mobilidade do elemento e a classe do complexo do gene *mecA*. A função dessas recombinases é garantir a mobilidade dos *SCCmec* excisando precisamente o elemento do cromossomo e integrando em um sítio específico de um cromossomo receptor. O *SCCmec* é integrado no genoma no sítio *attB_{SCC}* (*SCCmec attachment site*) localizado na *ofrX*, uma sequência aberta de leitura (OFR) com função desconhecida (ITO et al., 2001; KATAYAMA et al., 2003; ITO et al., 2004; SANGAPPA, THIAGARAJAN, 2012).

Quatro classes principais do complexo gene *mecA* foram identificadas com o uso dos *primers* específicos através da técnica de PCR utilizando o DNA cromossômico, de cepas de várias espécies de estafilococos meticilina resistentes, como alvo. O complexo *mec* contém os genes reguladores da expressão do gene *mecA*, que são o *mecI* e *mecRI* (Figura 4). Estes genes reguladores estão situados no elemento *SCCmec* do cromossomo bacteriano, logo após o promotor do gene *mecA*. Estes genes podem estar íntegros ou truncados a esta característica pode estar associada a alterações estruturais do complexo *mec* que ocorreram pelo movimento ou inclusão de sequências de inserção (*IS*) (KATAYAMA, ITO, HIRAMATSU, 2001; SANGAPPA, THIAGARAJAN, 2012).

Alguns estudos demonstraram que algumas cepas de *S. epidermidis* com a sequência intacta do gene *mecI*, apresentavam baixos níveis de resistência à meticilina. Experimentos também sugerem que a inativação por deleção (ou mutação *in vivo*) do gene *mecI* pode tornar a cepa capaz de expressar altos níveis de resistência à meticilina, indicando claramente o papel repressor do gene *mecI* na expressão da resistência (SUZUKI et al., 1993; DICKINSON, ARCHER, 2000).

Figura 4: Complexo do gene *mec*, *mecR1* (indutor) e *mecI* (repressor).



Fonte: Lowy, 2003.

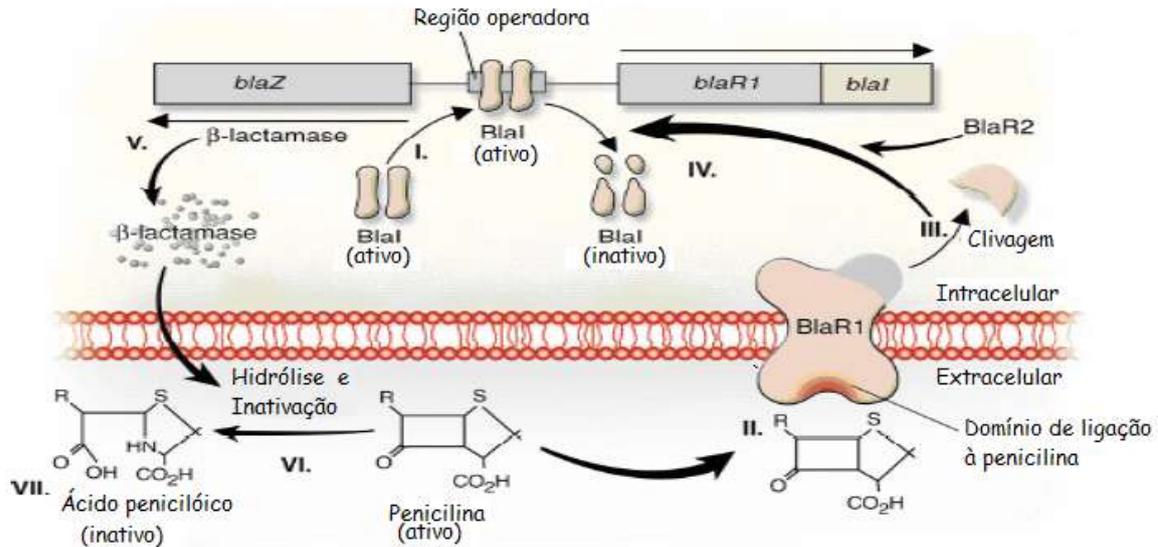
O gene da betalactamase é conhecido como gene *bla* e é geneticamente e bioquimicamente distinto do gene da PBP2a (*mecA*), porém ambos são regulados por sistema indutor e repressor semelhantes. Tanto o gene *bla* quanto o gene *mec* podem controlar a produção da PBP2a e da betalactamase devido à homologia dos dois sistemas regulatórios (KATAYAMA et al., 2003).

Os genes estruturais *mecA* e *blaZ*, que codificam as PBPs e betalactamases, respectivamente, são controladas por *mecR1* e *blaR1* que são transcritos de forma divergente dos genes estruturais, a partir de uma sobreposição de região do promotor / operador. Ambos contêm sensor-transdutores (*mecR1* / *blaR1*), sensor de quinase ancorados à membrana, que atuam como ativadores de transcrição e um segundo componente, atua como repressor (*mecI* / *blaI*). Devido à semelhança estrutural e funcional de *mecR1* e *blaR1*, ambos os repressores atuam como homodímeros e ligam a regiões operadoras de *mecA* / *mecR1* e *blaZ* / *blaR1*. *mecR1* e *blaR1* são proteínas que atravessam a membrana em vários domínios, cada um composto de um C-terminal extracitoplasmático, e um domínio N-terminal transmembranar, composto de quatro α -hélices transmembranares e um domínio metaloprotease intracelular (SANGAPPA, THIAGARAJAN, 2012).

Os antibióticos betalactâmicos se ligam ao domínio extracelular das proteínas *blaR1 / mecR1* e acila o sítio ativo de serina, resultando em alterações na conformação do domínio C-terminal de ligação a penicilina. O domínio do sensor ativado de *blaR1 / mecR1* desencadeia a ativação do domínio citoplasmático de metaloprotease de zinco por indução de clivagem autocatalítica. Finalmente, a forma ativa de *blaR1 / mecR1*, juntamente com um cofator desconhecido cliva os repressores *blaI / mecI*, permitindo a transcrição dos genes *bla* e *mec*. Este processo não só permite a transcrição de *blaZ / mecA*, mas também resulta na transcrição de *blaI / mecI* e *blaR1 / mecR1*. Enzimas lactamases, que são expressos nos arredores, hidrolisam o antibiótico (sinal), por conseguinte, a expressão de enzimas lactamase é eficientemente concluída. Clivagem autoproteolítica de *mecR1 / blaR1* é um processo irreversível (DEURENBERG; STOBBERINGH, 2008; SANGAPPA, THIAGARAJAN, 2012).

Assim, a fim de manter o seu reabastecimento contínuo na presença de antibióticos betalactâmicos, as sínteses estáveis do sensor-transdutor são principalmente necessárias para diminuir a ligação do repressor proporcionalmente. *blaR2*, um fator genético desconhecido foi mostrado estar envolvido na regulação do gene *blaZ*. Em estirpes de *S. aureus* que abrigam plasmídeos de penicilinase, a expressão continuada de betalactamases foi observada a partir do plasmídeo de origem *bla*, isto é, *blaZ*, *blaI*, e *blaR1*. *In vivo* demonstrou-se que os genes reguladores de *mec* e *bla* são intercambiáveis. Em *S. aureus*, *blaR1* e *mecR1* partilham identidade de sequência significativa com 34% de comprimento total de proteínas, 43% dos domínios do sensor e 33% de domínios de protease. A indução do gene *mec* pelo sistema *mecR1*-regulados é mais lenta em comparação com o sistema *blaR1*-controlado, tomando horas em vez de minutos. O bloqueio da via regulamentar *mecR1* pode ser uma nova estratégia para combater infecções por MRSA. O sistema de transdução de sinal de disparo síntese *mecA* é ativado em presença de antibióticos beta-lactâmicos que se liga ao sensor / transdutor *mecR1* que ativa o seu domínio citoplásmico de metaloprotease de zinco por indução de clivagem autocatalítica. Ativado *mecR1* cliva então *mecI*, juntamente com um cofator desconhecido (*macR2*), permitindo a transcrição do gene *mecA* (SANGAPPA, THIAGARAJAN, 2012). Este processo está resumido na Figura 5 para o sistema *bla*.

Figura 5: Sistema de transdução de sinal provocando a síntese de betalactamase.



Fonte: SANGAPPA, THIAGARAJAN, 2012.

Desta forma, o gene *mecI*, quando presente, reprime a transcrição do gene *mecA* e do par de genes *mecR1-mecI* na ausência de antibióticos betalactâmicos, através da ligação à região operadora destes genes no DNA bacteriano. Isso significa que quando não houver antibióticos desta classe no meio ambiente a que a bactéria está exposta, não ocorrerá transcrição do gene *mecA* até a proteína PBP2a, nem transcrição dos genes reguladores do *mecA*. Isso acontece por questão de economia energética para a célula bacteriana. Porém, na presença de um antibiótico betalactâmico, o *mecR1*, proteína transmembrana sinalizadora sensível a betalactâmicos, é autoclivado cataliticamente e o domínio metaloprotease, que está localizado na parte citoplasmática dessa proteína se torna ativo. Essa metaloprotease cliva a proteína *mecI*, que por sua vez estava ligada à região operadora do *mecA* permitindo assim a transcrição do gene e assim a produção da proteína PBP2a (DEURENBERG; STOBBERINGH, 2008; SANGAPPA, THIAGARAJAN, 2012).

Em relação ao complexo do gene *ccr*, sabe-se que ele é composto por quatro tipos de genes de cada enzima recombinase. A enzima *ccrA* do complexo apresenta os alótipos: *ccrA1*, *ccrA2*, *ccrA3* e *ccrA4*; e a enzima *ccrB*, os alótipos *ccrB1*, *ccrB2*, *ccrB3*, *ccrB4* e *ccrC* (ITO et al., 2004; HIRAMATSU et al., 2013).

Os tipos de *SCCmec* são classificados de acordo com a combinação entre o complexo do gene *mec* e o complexo do gene *ccr*. Os tipos de *SCCmec* descritos até o momento,

apresentam as combinações descritas na Quadro 1 e sua estrutura encontra-se esquematizada na Figura 6.

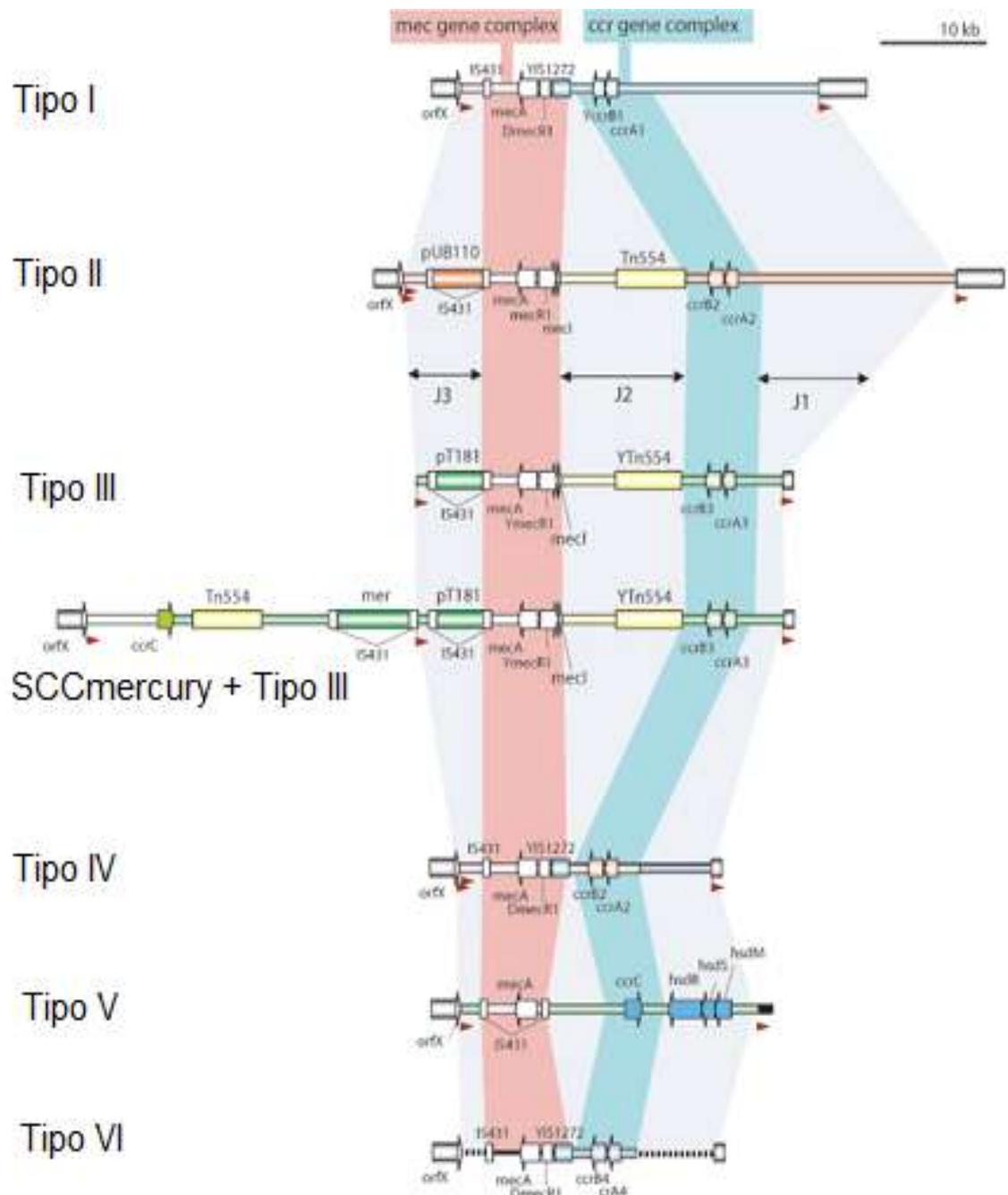
Finalmente cada *SCCmec* é classificado em subtipos baseado na constituição da sequência das regiões J que não pertence ao complexo do gene *mec* nem ao complexo do gene *ccr* (KATAYAMA, ITO, HIRAMATSU, 2000; ITO et al., 2001; ITO et al., 2004; HIRAMATSU et al., 2013).

Quadro 1: Tipos de *SCCmec* atualmente identificados em cepas de *S. aureus*.(O gene *ccr* ou o complexo *ccr* estão indicados entre parêntesis).

Tipo de <i>SCCmec</i>	Complexos do gene <i>ccr</i>	Complexos do gene <i>mec</i>	Cepas
I	1 (A1B1)*	B	NCTC10442, COL
II	2 (A2B2)	A	N315, Mu50, Mu3, MRSA252, JH1, JH9
III	3 (A3B3)	A	85/2082
IV	2 (A2B2)	B	CA05, MW2, 8/6-3P, 81/108, 2314, cm11, JCSC4469, M03-68, E-MRSA-15, JCSC6668, JCSC6670
V	5 (C1)	C2	WIS(WBG8318), TSGH17, PM1,
VI	4 (A4B4)	B	HDE288
VII	5 (C1)	C1	JCSC6082
VIII	4 (A4B4)	A	C10682, BK20781
IX	1(A1B1)	C2	JCSC6943
X	7(A1B6)	C1	JCSC6945
XI	8(A1B3)	E	LGA251

Disponível em http://www.sccmec.org/Pages/SCC_TypesEN.html, acesso 25/11/15.

Figura 6: Ilustração de alguns dos tipos de *SCCmec* e sua estrutura.



Disponível em <http://www.staphylococcus.net/> acesso em 25/11/15.

Foi demonstrado que os genes das recombinases codificados no elemento *SCCmec*, *ccrA* e *ccrB* são suficientes para transferir o elemento de um plasmídeo para um cromossomo em um sítio específico e com orientação específica (ROBINSON, ENRIGHT, 2003).

As infecções por MRSA são classificadas como de origem hospitalar e *S. aureus* resistente a meticilina de origem comunitária (Community-Associated MRSA, CA-MRSA) associado principalmente a infecções graves em crianças na comunidade sem fatores de risco e sem hospitalização prévia (KUINT et al., 2007). O CA-MRSA diferencia-se do MRSA hospitalar (Health-Care-Associated MRSA, HCA-MRSA) nas seguintes características: são isolados de pacientes hospitalizados nas primeiras 72 horas e sem histórico de hospitalização prévia recente, sensibilidade a maioria dos agentes antimicrobianos como clindamicina, sulfazotrim e rifampicina, cromossomo *mec* tipo IV ou V e presença dos genes que expressam a Leucocidina de Panton-Valentine (PVL) (ITO et al., 2001; NAIMI et al., 2003; ITO et al., 2004; FRIDKIN et al., 2005; HISATA et al., 2005; DAUM, 2007; HIRAMATSU et al., 2013).

Onze tipos diferentes de *SCCmec*, que diferem em estrutura e tamanho, foram descritos (ITO et al., 2001; ITO et al., 2003; TAKANO et al., 2007; CONCEIÇÃO et al., 2010; ZONG et al., 2011). Quatro tipos de elementos *SCCmec* (tipos I, II, III e VI) são associados a infecções nosocomiais. Os tipos IV e V são amplamente disseminados entre cepas comunitárias (HISATA et al., 2005), ou seja, enquanto os HCA-MRSA carregam *SCCmec* dos tipos I a III e VI, os CA-MRSA estão mais associados aos tipos IV, V e VII (ITO et al., 2004; TAKANO et al., 2007). Os tipos IV e V são elementos genéticos menores e com mais mobilidade que os outros. Esses tipos carregam menos genes determinantes de resistência que os tipos I, II e III. Por isso, os CA-MRSA caracteristicamente tendem a ser menos multirresistentes que os HCA-MRSA, mantendo em geral sensibilidade à clindamicina, por exemplo (ITO et al., 2001; NAIMI et al., 2003; ITO et al., 2004; FRIDKIN et al., 2005; DAUM, 2007). Os *SCCmec* tipos I, II e III, associados a cepas de origem hospitalar, têm como característica a resistência a múltiplos antimicrobianos além dos betalactâmicos, como os macrolídeos, aminoglicosídeos, tetraciclina, rifampicina e quinolonas (HIRAMATSU et al., 2013).

O *SCCmec* tipo I com cerca de 34 kb, foi detectado na cepa NCTC10442, correspondente ao primeiro MRSA isolado em 1961, no Reino Unido, o tipo II (52 kb) foi identificado em uma cepa de MRSA, isolada no Japão em 1982, denominada N315, e o tipo III (66 kb) foi identificado em uma cepa de MRSA, isolada em 1985 na Nova Zelândia,

denominada de 82/2082. Posteriormente, foi identificado, em duas cepas associadas a infecções comunitárias, o menor elemento *mec*, o tipo IV (20 a 24 kb), que confere aos MRSA um perfil de sensibilidade diferente dos outros três tipos (DUARTE; DE LENCASTRE, 2002; OKUMA et al., 2002).

O elemento tipo V (28kb) foi descrito a partir do cromossomo de uma cepa de MRSA, de origem comunitária, isolada na Austrália, denominada WIS (WBG8318). Este elemento foi estruturalmente similar ao *SCCmec* tipo IV (ITO et al., 2004). Os *SCCmec* tipo IV e V não possuem nenhum outro determinante de resistência a antimicrobianos além do gene *mecA*, o que explica uma das principais características dos isolados comunitários de MRSA, a sensibilidade a diversos antimicrobianos não betalactâmicos (DUARTE; DE LENCASTRE, 2002; ENRIGHT et al., 2002; OKUMA et al., 2002; ITO et al., 2004). O *SCCmec* tipo VI, é considerado de origem hospitalar e apresenta similaridade com o *SCCmec* tipo IV em tamanho, porém é definida pelo tipo de *ccr* apresentada (OLIVEIRA, MILHEIRIÇO, DE LENCASTRE, 2006; CONCEIÇÃO et al., 2010)

O *SCCmec* tipo VII foi descrito em cepa de *S. aureus* comunitário em Taiwan, apresentando cerca de 49 kb (HIGUCHI et al., 2008), já o tipo VIII foi descrito em cepa epidêmica Canadense, com 32 kb (ZHANG et al., 2009). Os tipos IX, X e XI foram descritos em um trabalho realizado no oeste da China, porém esses novos tipos ainda não estão bem caracterizados (ZONG et al., 2011).

Estudo sobre o *SCCmec* tipo IV demonstrou que os SCoN são reservatórios de resistência e que a transmissão ocorreu dos SCoN para os *S. aureus*. Até a década de 70, isolados clínicos de *S. aureus* não apresentavam *SCCmec* tipo IV, sendo encontrado apenas em *S. epidermidis*. Apenas na década de 80, foram relatados isolados de *S. aureus* com este tipo de elemento móvel (WISPLINGHOFF et al., 2003). Existem várias linhas de evidência sobre a origem do *SCCmec*, mas se sabe que a resistência à meticilina é altamente prevalente em isolados de *S. epidermidis*, em cerca de 70%, e menos comum em *S. aureus*, sugerindo que *S. epidermidis* é o reservatório para *SCCmec* (WIELDERS et al., 2001).

Desta forma, *SCCmec* servem como veículo para trocas úteis a uma melhor sobrevivência dos estafilococos em vários ambientes, além de conter genes de resistência a outros antibióticos e outros genes e pseudogenes que codificam enzimas com diversas funções (HIRAMATSU et al., 2004).

Em relação às betalactamases, quando estafilococos são expostos a antibióticos betalactâmicos, elas são sintetizadas. A classificação das betalactamases é baseada nas características bioquímicas, funcionais e moleculares da enzima. Os critérios utilizados para a classificação funcional incluem o substrato antimicrobiano, o perfil de inibição enzimático, a taxa de hidrólise (V_{max}), a afinidade de ligação (K_m), o peso molecular da proteína e a composição de aminoácidos (BUSH, JACOBY, MEDEIROS, 1995). Segundo a classificação de Bush, Jacob e Medeiros, as betalactamases estafilocócicas pertencem ao grupo 2a (classe A de Ambler), porque hidrolisam as penicilinas mais rápido que as cefalosporinas (VOLADRI, KERNODLE, 1998).

Quatro tipos de produtos de *blaZ* (A, B, C e D) foram distinguidos por sorotipagem e diferenças na hidrólise em substratos selecionados de betalactâmicos. Os tipos A, C e D são geralmente localizados em plasmídeos, enquanto o tipo B é normalmente encontrado no cromossoma (OLSEN, CHRISTENSEN, AARESTRUP, 2006).

As betalactamases agem de duas diferentes formas na destruição do anel betalactâmico: o primeiro mecanismo, representado pelas classes A, C e D baseia-se na ação catalítica de um resíduo de serina ativo presente nas betalactamases. O resíduo serina reage, irreversivelmente, com o grupo carbonil do anel betalactâmico o que resulta em seu rompimento e inativação (TANG, APISARNTHANARAK, HSU, 2014). O segundo mecanismo representado pela classe B é constituído pelas metalo-betalactamases que requerem um íon metálico divalente, geralmente o zinco, ligado ao resíduo de histidina, cisteína ou ambos, para reagir com o grupo carbonil da ligação amida de diversas penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos (SANGAPPA, THIAGARAJAN, 2012).

2.5 Resistência aos macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas B em *Staphylococcus* spp.

Dentre as opções terapêuticas para as infecções estafilocócicas estão macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas (LINA et al., 1999b; ADALETI et al., 2010; SANGAPPA, THIAGARAJAN, 2012).

Os macrolídeos são assim denominados por conterem um anel de lactona de muitos membros (anel de 14, 15 ou 16 membros) ao qual se ligam um ou mais desoxiaçúcares. Os macrolídeos comercialmente disponíveis têm um anel de lactona de 14 membros (claritromicina, diritromicina, eritromicina e roxitromicina) ou de 15 membros (azitromicina).

Os macrolídeos com anel de lactona de 16 membros (josamicina, midecamicina, miocamicina, rokitamicina e espiramicina) estão disponíveis em alguns países ou na prática veterinária (tilosina) (CHAMBERS, 2010). Estas classes diferem em suas propriedades farmacocinéticas e em suas respostas aos mecanismos de resistência bacteriana (LECLERCQ, 2002).

As lincosamidas (lincomicina e clindamicina) são derivados alquil de prolina e são desprovidos de um anel de lactona (LECLERCQ, 2002). A clindamicina é usada no tratamento de infecções de pele e tecidos moles causadas por estafilococos e como alternativa para pacientes com alergia à penicilina (ADALETI et al., 2010), sua boa absorção oral faz dele opção importante na terapia ambulatorial ou como seguimento após terapia intravenosa (SADERI; EMADI; OWLIA, 2011).

As estreptograminas constituem um grupo de antimicrobianos formados por uma mistura de duas classes de componentes diferentes quimicamente, designados estreptograminas A e B. Quinupristina-dalfopristina é uma estreptogramina semi-sintética injetável, resultante da mistura de quinupristina e dalfopristina (na proporção 30:70), que por sua vez, são derivados semi-sintéticos de pristinamicina IA (PIA: estreptogramina B) e pristinamicina IIA (PIIA: estreptogramina A), agem em sinergia e são produzidas pelo mesmo microrganismo (LINA et al., 1999b; ADALETI et al., 2010). Uma vez que as estreptograminas A e B são quimicamente distintas e têm diferentes sítios de ligação, os mecanismos de resistência dessas duas estreptograminas são diferentes. Tem sido relatada a existência, em estafilococos de resistência a cada componente das estreptograminas (LINA et al., 1999b; ADALETI et al., 2010; SADERI; EMADI; OWLIA, 2011).

Os macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas B são antimicrobianos quimicamente distintos, mas têm efeito inibitório similar na síntese protéica bacteriana (ADALETI et al., 2010; SANGAPPA, THIAGARAJAN, 2012). Os macrolídeos são agentes bacteriostáticos que inibem a síntese protéica pela ligação reversível à subunidade ribossomal 50S dos microrganismos sensíveis (SANGAPPA, THIAGARAJAN, 2012).

A resistência aos antibióticos macrolídeos em *S. aureus* é geralmente causada por modificação ribossomal mediada por metilases 23S RNAr codificadas por *erm* genes, ou por efluxo ativo do agente antimicrobiano através de uma bomba ATP-dependente codificada pelo gene *msrA*. Esta bomba dependente de energia expelle efetivamente macrolídeos da célula bacteriana antes que eles possam se ligar ao seu alvo no ribossomo. Este mecanismo

cria resistência aos macrolídeos e às estreptograminas B, mas não às lincosamidas (ADALETI et al., 2010).

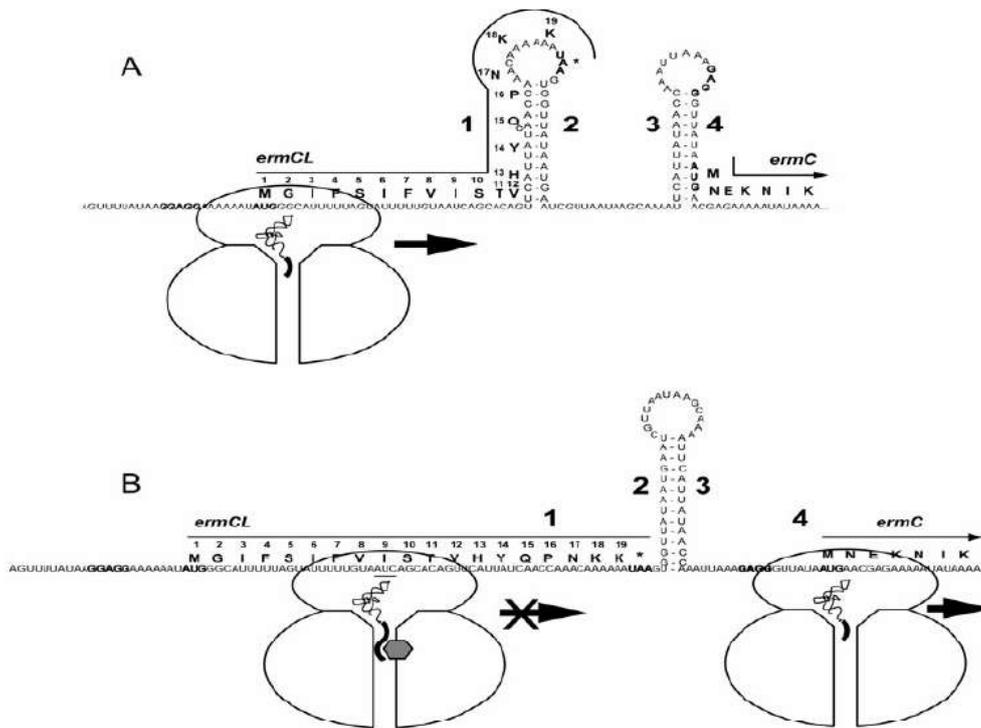
O segundo mecanismo de resistência aos macrolídeos em estafilococos consiste na modificação do local de ligação do antimicrobiano no ribossomo. Esse mecanismo é mediado pelos genes *erm* (erythromycin ribosome methylase) que codificam enzimas chamadas metilases RNAr 23S, que são responsáveis pela metilação do RNAr 23S (SANGAPPA, THIAGARAJAN, 2012). A modificação pelas metilases reduz a ligação dos macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas B no ribossomo bacteriano, uma vez que há sobreposição dos sítios de ligação destas classes de antimicrobianos no RNAr 23S, resultando em resistência aos macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas B que é comumente denominada “resistência MLS_B” (LECLERCQ, 2002; ADALETI et al., 2010; SANGAPPA, THIAGARAJAN, 2012).

Os antibióticos MLS_B bloqueiam a formação de ligação peptídica, e também a tradução, sobrepondo-se a locais de ligação, no domínio V do centro de peptidil transferase, que está próximo a RNAr 23S. A metilação e dimetilação de RNAr ribossomal por metiltransferases é um mecanismo comum da resistência aos antibióticos em MLS_B em isolados clínicos. Existe um tipo de metiltransferases, a Erm metiltransferase, que modifica o resíduo de adenina do domínio V A2058 do RNAr 23S. Assim, a resistência a lincosamidas, fenicóis, estreptogramina A e oxazolidinonas é conferida por metiltransferase. A dimetilação influencia no fenótipo resistente MLS_B, expandindo-o para resistência a cetolídeos. A metilação aumenta a resistência cruzada a macrolídeos, estreptograminas B e lincosamidas (SANGAPPA, THIAGARAJAN, 2012).

A ligação de estreptogramina B, lincosamida e macrolídeo ao ribossomo, que modifica principalmente A2058 em 23S, é impedida por metiltransferase do tipo Erm, conferindo assim resistência a MLS_B. Em *S. aureus* e outras bactérias, a expressão de genes *ermC*, induzida por macrolídeos, está sob o controle de um 19-codon ORF, *ermCL* (sufixo "L" para o líder), presente 60 bp acima de *ermC*. Na ausência de antibióticos, *ermCL* é traduzido de forma constitutiva e a tradução de *ermC* é atenuada, porque suas sequências de ligação aos ribossomos (RBS) (mostrado em negrito na Figura 7) são sequestradas na estrutura secundária do mRNA (Sessão A, Figura 7). Após a indução, na presença de uma eritromicina (hexágono cinzenta, Figura 7), no 9^o códon do ribossoma, ocorre uma mudança na conformação do RNAm, permitindo a tradução dos *ermC*. Os números marcados em negrito (1-4 na Figura 7)

são segmentos de RNAm envolvidos na mudança da conformação (SANGAPPA, THIAGARAJAN, 2012).

Figura 7: Regulação da expressão do gene *ermC* em organismos resistentes à eritromicina



Fonte: SANGAPPA, THIAGARAJAN, 2012.

Na ausência de antibiótico, o segmento líder, *ermCL* do gene *ermC* é traduzido de forma constitutiva, mas a tradução gene *ermC* é atenuado por causa da apreensão de seus RBS em uma estrutura de haste-laçada. A fim de ativar a expressão de *ermC*, deve haver rearranjo da região reguladora da estrutura de mRNA em "induzido" forma conformação, que liberta a região de iniciação da tradução do gene *ermC*. Isso só é possível quando da vertente 1 do primeiro grampo sequestra no ribossomo, e permite vertente 2 para reparar a vertente 3, de modo que vertente 4, que contém RBS *ermC* pode ser liberado e traduzido (Sessão B, Figura 7) (LECLERCQ, 2002; SANGAPPA, THIAGARAJAN, 2012).

A expressão da resistência MLS_B pode ser constitutiva (MLS_{Bc}) ou induzível (MLS_{Bi}). Na resistência induzível, a bactéria produz RNAm inativo que é incapaz de codificar metilase. O RNAm torna-se ativo apenas na presença de um macrolídeo indutor. Contrariamente, na

expressão constitutiva, RNAm metilase ativo é produzido na ausência de um indutor. Na expressão induzível, a presença de um indutor leva a rearranjos do RNAm, o que permite que os ribossomos traduzam a sequência codificadora da metilase (LECLERCQ, 2002). Os determinantes *ermA* e *ermC* são predominantes nos estafilococos. Os genes *ermA* são mais difundidos nos isolados resistentes à meticilina e são transportados por transposons relacionados com Tn554, enquanto que os genes *ermC* são principalmente responsáveis pela resistência à eritromicina em isolados sensíveis à meticilina e são transportados por plasmídeos (LINA et al., 1999b; LECLERCQ, 2002). A resistência MLS_{Bc} pode ser detectada pelo teste de disco difusão na rotina laboratorial. Os isolados com esse tipo de resistência apresentam alto nível *in vitro* de resistência cruzada aos antimicrobianos macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas B (COUTINHO et al., 2010).

Os fenótipos de resistência conferidos pela expressão induzível de ambos determinantes (*ermA* e *ermC*) são similares e são caracterizados pela resistência dissociada aos antimicrobianos macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas B por causa de diferenças na capacidade de indução dos antimicrobianos (LECLERCQ, 2002). Os isolados com resistência MLS_{Bi} são resistentes aos macrolídeos de 14 membros e 15 membros, que são indutores e apresentam sensibilidade *in vitro* aos macrolídeos de 16 membros, lincosamidas e estreptograminas B (LECLERCQ, 2002; COUTINHO et al., 2010).

Em testes de disco difusão, uma zona em forma de D causada pela indução da produção de metilase pela eritromicina pode ser observada, quando um disco de eritromicina é colocado próximo de um disco de clindamicina ou de qualquer não indutor macrolídeo de 16 membros. Portanto, os isolados podem apresentar *in vitro* resistência à eritromicina e falsa sensibilidade à clindamicina, uma vez que o teste de disco difusão pode falhar na detecção da resistência MLS_{Bi}, quando os discos de eritromicina e clindamicina são colocados em posições não adjacentes (COUTINHO et al., 2010; CLSI, 2014). O problema criado pela resistência MLSB induzível em estafilococos consiste em não saber se os resultados de sensibilidade *in vitro* gerados para a clindamicina são confiáveis (COUTINHO et al., 2010).

De acordo com o CLSI (2014), a resistência induzível à clindamicina pode ser detectada usando um teste de aproximação de disco (teste D), colocando um disco de 2µg de clindamicina a uma distância de 15mm a 26mm da borda de um disco de eritromicina de 15µg, como parte de um teste de rotina de disco difusão. Após a incubação, os organismos que não apresentarem achatamento do halo de clindamicina devem ser relatados como sensíveis à clindamicina. Os organismos que apresentam achatamento do halo de

clindamicina adjacente ao disco de eritromicina (chamado de Halo “D”) indicam resistência induzível à clindamicina. Esses isolados devem ser relatados como “resistentes à clindamicina”, podendo-se incluir um comentário no sentido de que “Presume-se que este isolado é resistente com base na detecção de resistência induzível à clindamicina. Ainda assim, a clindamicina poderá ser eficaz em alguns pacientes” (CLSI, 2014).

2.6 Resistência à vancomicina em *Staphylococcus* spp.

Historicamente, tem sido observada uma resistência de maior relevância clínica adquirida contra os glicopeptídeos nos microrganismos *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* (Enterococos resistentes à vancomicina - VRE), informada pela primeira vez por pesquisadores no Reino Unido, em 1986. Desde então, vários fenótipos de resistência foram descritos, os quais podem ser diferenciados pela capacidade de transferência (ou seja, associação a plasmídeos), de indução e por ampliação da resistência. Os genes associados aos níveis mais elevados de resistência aos glicopeptídeos são *vanA*, *vanB* e *vanD*, que codificam uma ligase produtora de pentapeptídeos terminando em D-alanina-D-lactato (D-alaD-lac) (CASADEWALL, REYNOLDS, COURVALIN, 2001).

A antibioticoterapia contra infecções estafilocócicas é especialmente complicada quando a infecção é causada por um isolado resistente à meticilina. *S. aureus* resistentes à meticilina são geralmente resistentes a maioria dos outros antibióticos normalmente disponíveis (TANG, APISARNTHANARAK, HSU, 2014).

Os glicopeptídeos, vancomicina e teicoplanina, são fármacos de escolha no tratamento de infecções por MRSA. Os isolados clínicos de *Staphylococcus haemolyticus* foram as primeiras estirpes com relato de resistência à vancomicina. Em 1997, *S. aureus* com resistência intermediária à vancomicina (VISA) foi relatado no Japão. Subsequentemente vários casos de resistência à vancomicina foram relatados em diferentes partes do mundo. O primeiro isolado clínico de *S. aureus*, totalmente resistente à vancomicina (VRSA), foi isolado no EUA (HIRAO et al., 2012; SANGAPPA, THIAGARAJAN, 2012).

Há alguns anos, 29 novos agentes antimicrobianos como a linezolida, daptomicina e tigeciclina estão sendo testados, podendo auxiliar no combate ao *S. aureus* multiresistente (SCHITO, 2006). Alguns estudos indicam a existência de resistência cruzada entre a teicoplanina e a vancomicina. Porém o mesmo não ocorre com os β -lactâmicos, macrolídeos,

aminoglicosídeos, e os antibióticos tetraciclina, rifampicina ou cloranfenicol (CAVALCANTI et al., 2010).

Os estafilococos com resistência aos glicopeptídeos foram recentemente encontrados no Brasil, sendo registrado o isolamento de *S. aureus* com resistência à vancomicina em São Paulo (ROSSI et al., 2014; PANESSO et al., 2015).

Vancomicina e teicoplanina pertencem à classe de antibióticos glicopeptídeos e inibem principalmente a síntese da parede celular. Os glicopeptídeos são bactericidas e interferem na síntese da parede celular ligando-se à D-alanina-D-alanina (D-Ala-D-Ala) ao final das cadeias de pentapeptídeos que fazem parte da estrutura da parede celular bacteriana em crescimento. Essa ligação inibe a reação de transglicosilação e impede a incorporação de novas subunidades nessa parede. Uma vez que os glicopeptídeos atuam em um estágio mais precoce que os betalactâmicos, não é útil combiná-los (MIMS et al., 2005; HIRAO et al., 2012; SANGAPPA, THIAGARAJAN, 2012). A ligação de vancomicina para D-Ala-D-Ala do precursor peptidoglicano terminal extracelular obstrui as reações da síntese de parede celular de ligação à penicilina (SANGAPPA, THIAGARAJAN, 2012).

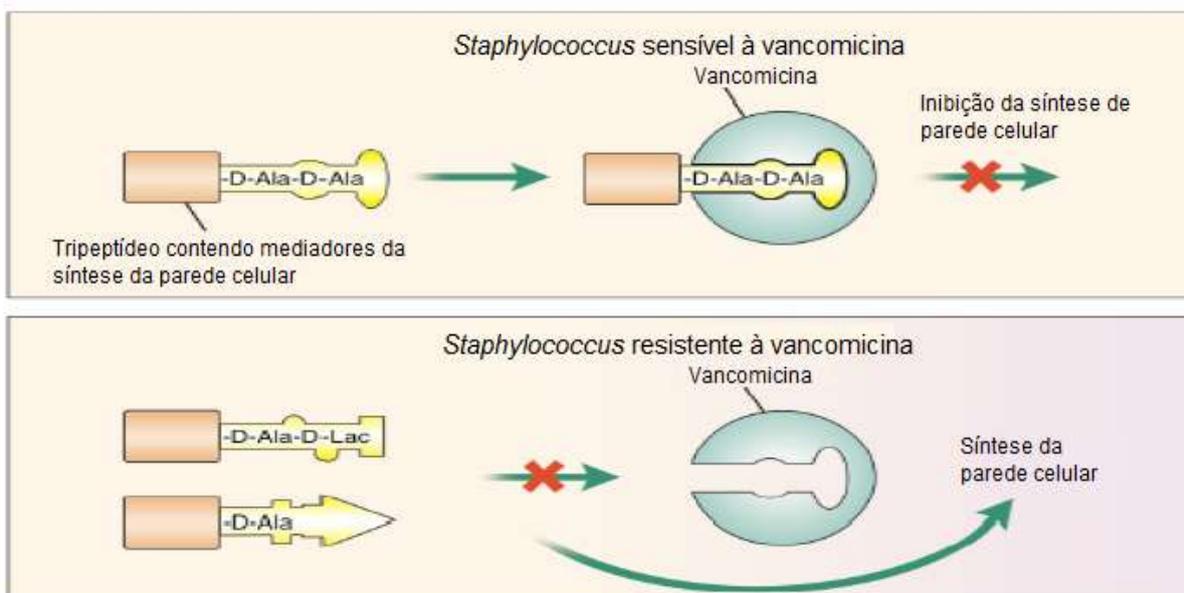
Dois mecanismos de resistência à vancomicina evoluíram em isolados de *S. aureus*. Em *Staphylococcus aureus* com resistência intermediária à vancomicina/glicopeptídeo (VISA/GISA) com MIC de 8-16 µg/L, a parede celular é composta de peptidoglicano mais espessa e inadequadamente reticulada. Este espessamento leva ao aumento no número de resíduos D-alanil-D-alanina, capazes de ligar-se à vancomicina na parte externa da parede celular, gerando menor disponibilidade do antimicrobiano na molécula alvo intracelular. Os isolados vancomicina resistentes possuem um mecanismo de disseminação muito mais eficiente do que os VISA (ZHU, CLARK, McDOUGAL, 2008).

Os glicopeptídeos são letais para a célula quando interagem com o local alvo da divisão celular. Mas, neste tipo de estrutura da parede celular, glicopeptídeos são apreendidos e impedidos de alcançar o local de divisão celular. Devido ao aumento do número de dipeptídeo livre D-Ala-D-Ala, moléculas de glicopeptídeo ligam no interior da camada exterior da parede celular. Como resultado, a sua taxa de difusão decresce. Isto indica a importância desta via aos glicopeptídeos para alcançar o local de síntese na ponta do septo e na fase de crescimento da célula. *Staphylococcus* com resistência heterogênea GISA (hGISA) não são altamente resistentes à vancomicina, mas são considerados como sendo os precursores de GISA porque eles podem evoluir à medida que uma subpopulação de uma maior resistência é submetida à presença de glicopeptídeos (SANGAPPA, THIAGARAJAN, 2012).

Um maior nível de resistência à vancomicina em *S. aureus* é atingido por transferência do operon *vanA* a partir de *E. faecalis* resistentes à vancomicina. O *van* operon contém Tn1546 como complexos de genes *vanRSHWXYZ*, em que os genes *vanA* e *vanH* são codificados por um peptídeo alterado (TENOVER et al., 2004; SANGAPPA, THIAGARAJAN, 2012).

Isto tem afinidade 1.000 vezes mais baixos no sentido de glicopeptídeos que não a D-Ala-D-Ala, mas ainda pode ser usada como um substrato para PBP. Os D, D-peptidases, atuam sobre precursores que terminam em D-Ala-D-Ala, são codificadas por genes *vanX* e *vanY* e também contribuem para a resistência a glicopeptídeos pela eliminação de terminais susceptíveis a partir da parede celular de estirpes resistentes. A função exata do gene *vanZ* é desconhecida e pode codificar para um fenótipo de baixo nível de resistência à teicoplanina. A resistência à vancomicina em VRSA é devido à transferência de operon *vanA* a partir de um *Enterococcus*. A Figura 8 explica a inibição da síntese da parede celular por vancomicina que se liga a precursores de parede celular, D-Ala-D-Ala em estirpes susceptíveis. Explica também a síntese de precursores modificados D-Ala-D-Lac por organismos resistentes que não se ligam à vancomicina, permitindo desse modo formação contínua de peptidoglicano (SANGAPPA, THIAGARAJAN, 2012). Assim, a resistência em *S. aureus* à vancomicina (VRSA) é causada pela alteração na parede celular do peptídeo terminal D-alanil-D-alanina para D-alanil-D-lactato, impedindo a inibição da síntese de parede celular pela vancomicina (SCHITO, 2006; SANGAPPA, THIAGARAJAN, 2012).

Figura 8: Mecanismo de resistência à vancomicina em cepas VRSA.



Fonte: SANGAPPA, THIAGARAJAN, 2012

O sistema de dois componentes *vanRS* regula a expressão do operon *van* em resposta à presença de glicopeptídeos. Este é um sensor/transdutor de proteína ligado à membrana com domínio citoplasmático C-terminal quinase consistindo de duas hélices, e um sensor de domínio de N-terminal. Na presença de antibiótico glicopeptídeo, autofosforilação do limite de membrana de VanS ocorre através de um sinal de indução não identificado, o qual ativa a fosforilação citoplasmática de VanR. O operon *vanA* é subsequentemente ativado por VanR fosforilada, que se liga a montante da região promotora *vanRS* com os genes estruturais que permite a transcrição de *vanHAX*. Quando glicopeptídeos estão ausentes, a enzima VanS age como uma fosfatase, desativando a VanR ativada, resultando na repressão da transcrição do *van* operon (SAHA et al., 2008; SANGAPPA, THIAGARAJAN, 2012).

O sensor-transdutor de VanS desempenha um papel duplo como um ativador (quinase) e desativador (fosfatase). Quando glicopeptídeos estão presentes no meio, por fosforilação de VanR ativa a transcrição de genes *vanRSHAX*. Ausência de glicopeptídeos no meio fosforila VanR por fosfato acetil celular e sua desativação também pela atividade de VanS-quinase, bloqueando a transcrição de genes *van* (SANGAPPA, THIAGARAJAN, 2012).

O gene *vanA* representa o mecanismo mais bem compreendido de resistência adquirida aos glicopeptídeos, sendo caracterizada pelo seu alto nível de indução de resistência à vancomicina e a teicoplanina e está associado a elementos passíveis de transposição relacionados à *Tn1546* (cerca de 11kb em tamanho) que podem ser de natureza cromossômica ou plasmidial (transferíveis). O gene *vanB* está associado à resistência de alto nível à vancomicina, mas não à teicoplanina (embora a resistência a essa substância possa ser induzida por exposição prévia à vancomicina). A resistência do tipo *vanB* pode estar ligada ao cromossomo ou ao plasmídeo e associada a um elemento de transposição de 34kb, o *Tn1549*. O gene *vanD* expressa a resistência moderada (MIMS et al., 2005).

Acredita-se que o doador do gene *vanA* ao *S. aureus* tenha sido o *Enterococcus faecalis*, através de transferência conjugativa de plasmídeo contendo o operon *vanA*. Este integra o Transposon *Tn1546* composto de *vanR*, *vanS*, *vanX*, *vanY* e *vanH*, presentes em um plasmídeo de 120 kb (TENOVER et al., 2004; SANGAPPA, THIAGARAJAN, 2012). Os genes *vanH*, *vanA* e *vanX* codificam proteínas necessárias para a expressão da resistência. VanH é um D-hidroxi-ácido desidrogenase que reduz o piruvato em D-lactato, os quais são utilizados pelo *vanA* ligase, que usa os resíduos de D-Lactato e D-Alanina para sintetizar o di-peptídeo D-alanina-D-lactato, o qual é incorporado no precursor do peptídeoglicano. O

vanX é uma di-peptidase requerida para a hidrólise do D-ala-D-ala e o vanY é uma D,D-carboxipeptidase que cliva o resíduo de D-ala do C-terminal dos precursores pentapeptídeos sintetizados usando dipeptídeos D-ala-D-ala que escaparam da hidrólise do vanX. A expressão do operon *vanA* é regulada por dois genes, *vanR* e *vanS*, localizados próximos do *vanH* que formam um sistema regulador de dois componentes (PÉRICHON, COURVALIN, 2004; SAHA et al., 2008).

2.7 Patogenicidade e virulência dos *Staphylococcus* spp.

O número de genes associados à virulência carregados por um isolado bacteriano é um produto da interação entre as taxas de aquisição do gene, o custo para manutenção biológica e a taxa de falência da cepa causadora da doença (PEACKOC et al., 2002; SPAAN et al., 2014; JENKINS et al., 2015). Desta forma, a maioria das infecções graves por *S. aureus* não pode ser explicada pela ação de somente um determinado fator de virulência, e sim pela ação de vários destes fatores durante o processo infeccioso. A sobrevivência e proliferação de um determinado patógeno no hospedeiro são favorecidas por mecanismos que permitem a evasão aos mecanismos imunes do hospedeiro. Assim, cepas que escapam mais eficientemente dos mecanismos de defesa do hospedeiro serão os tipos mais prevalentes encontradas. Existem evidências de que alguns tipos clonais são mais virulentos que outros e que estes aparecem com uma frequência maior entre isolados de doentes do que em portadores sadios (MELLES et al., 2004; SPAAN et al., 2014; BARBIERI et al., 2015; BLOMQUIST et al., 2015; SCHAEFFER et al., 2015).

A capacidade de *S. aureus* de evadir-se do sistema imune do hospedeiro é conferida pela existência de vários fatores de virulência, incluindo hemolisinas, lipases, várias proteases, moléculas de adesão, exotoxinas e enterotoxinas (ARCHER et al., 1998; SOMERVILLE et al., 2002; LISA, 2004; SANTOS et al., 2007; SPAAN et al., 2014), como pode ser observado na Tabela 1. Vários genes acessórios de *S. aureus* codificam fatores de virulência, tais como de enterotoxinas (*sea-sea*; *seg-ser*; *seu*), da toxina da síndrome do choque tóxico (*tst*), de toxinas esfoliativas A e B (*eta* e *etb*), de leucocidinas (*pvl*, *lukE-lukD*) (GORDON; LOWY, 2008; JENKINS et al., 2015). *S. aureus* produz citotoxinas ou hemolisinas que possuem atividade citotóxica contra leucócitos polimorfonucleares, plaquetas e eritrócitos. Dentre estas, está a gama toxina que possui ação pró-inflamatória e é capaz de lisar leucócitos e eritrócitos (CUNHA; CALSOLARI, 2008; SPAAN et al., 2014). Ela é

formada pela combinação de três proteínas codificadas pelo locus *hlgABC*, que também podem interagir com uma das proteínas da Leucocidina de Panton-Valentine (PVL), formando combinações de toxinas com atividade hemolítica e citotóxica (LINA et al., 1999a; NILSSON et al., 1999; SPAAN et al., 2014).

Tabela1. Algumas enzimas e toxinas produzidas por *S. aureus* relacionadas aos mecanismos de patogenicidade e de resistência a esse patógeno.

NOME	CLASSE	FUNÇÃO
Betalactamases	Enzima	Inativa os antibióticos betalactâmicos.
Coagulase	Enzima	Converte fibrinogênio em fibrina.
Hialuronidase	Enzima	Despolimeriza o ácido hialurônico.
Catalase	Enzima	Converte o peróxido de hidrogênio em oxigênio e água.
PVL	Toxina	Composta por dois componentes protéicos (S e F), que atuam sinergisticamente. Esta proteína altera a permeabilidade da membrana e ataca os leucócitos polimorfonucleares e macrófagos. Essa alteração permite a entrada de cátions, resultando na degranulação celular e induzindo a citólise.
Gama-toxina (gama-hemolisina)	Toxina	Apresenta atividade hemolítica.
Esfoliatina	Toxina	Promove a clivagem do extrato granuloso da epiderme, causando síndromes cutâneas severas (síndrome da pele escaldada e impetigo bolhoso).
Enterotoxinas (A, B, C, D e E)	Toxina	Toxinas protéicas pirogênicas, termoestáveis, responsáveis pela intoxicação alimentar.
TSST-1	Toxina	Provoca febre, choque e envolvimento de sistemas orgânicos múltiplos, incluindo erupção cutânea descamativa.

Fonte: SANTOS et al., 2007 modificado

Desta forma, a importância de *S. aureus* como patógeno reside na virulência mediada por suas toxinas, seu caráter invasivo e seu perfil de resistência aos antibióticos (LE LOIR, BARON, GAUTIER, 2003; WISPLINGHOFF et al., 2004; BLOMQVIST et al., 2015; JENKINS et al., 2015). A presença desses fatores de virulência é relacionada com uma diversidade de manifestações clínicas (LE LOIR, BARON, GAUTIER, 2003; LIM et al., 2012; JENKINS et al., 2015).

Com exceção da toxemia, as bases moleculares da patogenicidade de *S. aureus* são multifatoriais, dependendo da presença e também da expressão de vários genes acessórios (SUTRA, POUTEREL, 1993; JENKINS et al., 2015; SCHAEFFER et al., 2015). Alguns autores avaliaram exotoxinas estafilocócicas e fizeram sua associação com algumas síndromes estafilocócicas específicas e o número de genes de exotoxinas com o potencial virulento de certas linhagens estafilocócicas (PREVÓST et al., 1995; GRAVET et al., 1999; YAGI et al., 2004; LIM et al., 2012).

Classicamente, a análise do mecanismo de invasão de *S. aureus* revela que, no primeiro momento, essa bactéria adere à pele ou à mucosa para, em seguida, romper as barreiras do epitélio, comprometendo estruturas de ligações intercelulares, como desmossomos e junções de aderência (IWATSUKI et al., 2006; JENKINS et al., 2015; SCHAEFFER et al., 2015). Após a invasão do epitélio, ele utiliza diversas estratégias para permitir a sua sobrevivência e proliferação no organismo hospedeiro. Essas estratégias estão relacionadas com a opsonização do complemento, a neutralização da fagocitose e a inibição das respostas imunes humoral e celular (VELAZQUEZ-MEZA, 2005; BLOMQVIST et al., 2015; SCHAEFFER et al., 2015).

A capacidade de colonização e a patogenicidade do *S. aureus* são, portanto, uma consequência de seus fatores de virulência, os quais têm papel relevante na adesão celular, na captação de nutrientes e na sua evasão da resposta imunológica do hospedeiro (VELAZQUEZ-MEZA, 2005; BLOMQVIST et al., 2015; SCHAEFFER et al., 2015).

O principal fator de virulência dos SCoN está associado à formação do biofilme, o qual propicia a adesão às superfícies plásticas (biomateriais) ou a outros corpos estranhos. Tanto *S. aureus* quanto SCoN são capazes de produzir biofilme. Sabe-se que o desenvolvimento do biofilme ocorre em duas etapas, a primeira envolve uma rápida adesão da bactéria à superfície e a segunda etapa é acumulação, sendo mais prolongada, envolvendo a proliferação e a adesão intercelular formando várias camadas de bactérias (HUEBNER, GOLDMANN, 1999; BARBIERI et al., 2015). Essa adesão é mediada pela adesina intercelular *N*-acetil-

glicosamina polimérica (PNAG) que é sintetizada por enzimas codificadas por genes presentes no locus *ica*. Dentre esses estão o gene *icaR* que regula a síntese da PNAG e a proteína *icaA* que tem atividade de N-acetilglicosaminil-transferase, cujos substratos são os monômeros de N-acetilglicosamina. Além desses, existe *icaD* que promove a correta dobradura e inserção de *icaA* na membrana, sendo a ação conjunta de *icaA* e *icaD* responsável pela formação de oligômeros de N-acetilglicosamina. A proteína transmembrana *icaC* é responsável pelo alongamento dos oligômeros de N-acetilglicosamina formados e a translocação do polissacarídeo para a superfície da membrana. Na superfície, está presente a proteína *icaB* que promove a desacetilação da molécula poli-N-acetilglicosamina formada, inserindo cargas positivas, garantindo as propriedades de adesão (O'GARA, 2007; BARBIERI et al., 2015). Uma vez que este operon é ativado, quatro proteínas são transcritas *icaA*, *icaD*, *icaD* e *icaC*. A expressão de *icaA* isoladamente induz atividade enzimática baixa, no entanto, a expressão simultânea de *icaA* e *icaD* promove um aumento significativo na quantidade de polissacarídeo (BARBIERI et al., 2015).

O biofilme, completamente formado, é constituído por várias camadas de bactérias em um material extracelular amorfo (slime) que consiste da complexa mistura de vários açúcares, constituintes da parede celular e proteínas extracelulares, tendo como principal componente o ácido teicóico. Assim, os micro-organismos ficam protegidos contra os mecanismos de defesa imunes do hospedeiro e de agentes antimicrobianos, pelo bloqueio da penetração dos antimicrobianos na célula (CAFISO et al., 2004; MICHELIM et al., 2005). A quantidade do biofilme gerada pode estar relacionada com a habilidade dos SCoN em causar infecções (DE SILVA et al., 2002; SCHAEFFER et al., 2015).

S. aureus produz cinco diferentes toxinas que danificam membranas, quatro hemolisinas (alfa-, beta-, gama- e delta-hemolisina) e leucocidina. Alfa-toxina é uma toxina hemolítica de formação de poros, que provoca danos na membrana em muitos tipos de células de mamíferos. Beta-toxina é esfingomielinase C Mg^{2+} dependente, a qual degrada esfingomielinina no fosfolípido da camada exterior da membrana do eritrócito. Esta degradação não lisa as células, mas deixa vulnerável a agentes líticos. O locus gama-toxina ocorre em 99% das estirpes de *S. aureus*. O locus gama-toxina expressa três proteínas, dois componentes classe S (HlgA e HlgC) e uma classe F componente (HlgB). Assim, o locus Hlg pode expressar dois pares de proteínas funcionais, HlgA+HlgB e HlgC+HlgB, que exibem efeitos pró-inflamatórios (NILSSON et al., 1999; SPAAN et al., 2014).

2.8 Infecção por *Staphylococcus* spp. em pacientes oncológicos

As infecções bacterianas são uma das principais causas de complicações em pacientes com cânceres hematológicos e neutropenia induzida por quimioterapia e as bacteremias são a principal causa de morte, seja diretamente ou por interferir no cronograma da quimioterapia (BUCANEVE et al., 2005; PAUL et al., 2010; MONTASSIER et al., 2013; QUILES et al., 2015). Os fatores de risco para infecção neste grupo de pacientes são mais expressivos, pois além do imunocomprometimento causado pela própria patologia, eles são submetidos a tratamento cirúrgico, quimioterápico e/ou radioterápico, sendo a neutropenia um dos maiores riscos para infecção nesta população (CAVALCANTE, 2000; COSTA, ATTA, SILVA, 2015).

Complicações infecciosas acontecem em 60 a 100% dos pacientes após doses elevadas de quimioterapia, radioterapia ou transplante de células blásticas hematopoéticas autólogas, sendo comumente causadas por bactérias gram negativas (principalmente enterobactérias) e cocos gram positivos (enterococos, estafilococos e estreptococos). O curso das complicações infecciosas depende da doença, do estado de remissão, pré-tratamento e dos regimes de tratamento utilizados. Pacientes com neutropenia por um período superior a 10 dias são considerados de alto risco para a infecção (CATANEO et al., 2011).

Nas últimas décadas, o sucesso do tratamento de doenças malignas em crianças e adolescentes vem aumentando, com até 70-80% dos casos. No entanto, a imunossupressão resultante do tratamento torna estes pacientes mais suscetíveis a infecções, que são a principal causa de morte na população. Nestes pacientes, a bacteremia muitas vezes resulta de infecção com um ou mais microrganismos, predominantemente membros da Enterobacteriaceae, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus* e *Staphylococcus* (QUILES et al., 2015). Ao longo das últimas três décadas, a proporção de microrganismos gram positivos aumentou, por causa do uso generalizado de cateteres permanentes (FREIFELD et al., 2011; MONTASSIER et al., 2013).

Bacteremia continua a ser uma das principais causas de complicações com risco de vida em pacientes que recebem quimioterapia (FREIFELD et al., 2011). Por atrasos que causam e doses reduzidas de quimioterápicos, levando a hospitalizações mais longas, contribui ao tratamento abaixo do ideal, maior taxa de mortalidade e aumento os custos dos cuidados de saúde em pacientes com câncer (MONTASSIER et al., 2013).

Em estudo realizado em uma unidade de oncohematologia em Israel, pesquisou-se quadros de infecção em 271 pacientes neutropênicos febris (quadro inicial e subsequente de febre) e foi observado uma redução no padrão de susceptibilidade aos antimicrobianos nos isolamentos dos quadros subsequentes de febre, sugerindo que a exposição anterior aos antibióticos impacta significativamente a susceptibilidade aos antimicrobianos (RAM et al., 2012). Outro estudo sobre infecção em pacientes com câncer num período de 10 anos, revisando prontuários, observou que dos 337 microrganismos isolados os mais prevalentes foram micobactérias atípicas (16%), *S. aureus* meticilina resistentes (13%) e *Aspergillus* spp. (11%) (PONGAS et al., 2012).

Em relação ao uso de cateter vascular central, *S. aureus* e *Staphylococcus* coagulase negativo (SCoN) são os microrganismos mais frequentemente isolados, representando 30% cada um (BUSTAMANTE; ESPÍNOLA, 2007; MULDREW et al., 2008; SCHAEFER et al., 2009). Em pacientes pediátricos a taxa é de 1,82 por 1000 dias de uso. Com respeito às infecções da corrente sanguínea nos pacientes em tratamento com drogas antineoplásicas, a taxa por 1000 dias de neutropenia ascende a 3,67% (BUSTAMANTE; ESPÍNOLA, 2007) e nos pacientes com neutropenia severa existe maior ocorrência de infecções por SCoN (KABALAN et al., 2010).

Um estudo retrospectivo em um hospital de oncologia americano determinou a clonalidade entre grupos de isolados resistentes associando com os resultados clínicos sugestivos de infecção (MULDREW et al., 2008) e outro estudo realizado em um hospital de oncologia do Rio de Janeiro sugere que é maior a virulência de *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) que *Staphylococcus aureus* sensível à (MSSA) em pacientes com câncer (THULER et al., 1999).

Os centros de terapia intensiva concentram as maiores taxas de incidência de infecções hospitalares, e foram consideradas focos de emergência de resistência microbiana, devido à internação de pacientes graves, que na maioria das vezes, utilizam antimicrobianos de largo espectro e são submetidos a inúmeros procedimentos invasivos (CATANEO et al., 2011). Existem evidências de que pacientes neutropênicos de baixo risco não necessitam necessariamente hospitalização e antibioticoterapia de amplo espectro prolongados para infecções invasivas bacterianas. As estratégias para esse grupo incluem tratamentos antimicrobianos de curta duração com conseqüente redução do período de hospitalização e manejo ambulatorial com uso de antibióticos orais (SANTOLAYA et al., 2004; CAGOL, 2009).

Neste contexto, um estudo avaliou o desempenho de PCR em tempo real (qPCR), em amostras de sangue total, para a detecção de 17 microrganismos relevantes e 10 genes de resistência a antimicrobianos, causadores de bacteremia em crianças com câncer. Esse método foi considerado uma ferramenta precisa e sensível para o diagnóstico de bacteremia precoce nessa população (QUILES et al., 2015).

Baseado nessas evidências e na escassez de informações sobre infecções estafilocócicas em pacientes oncológicos, este trabalho procurou estimar a ocorrência e o impacto desta infecção correlacionando o perfil clínico-epidemiológico e molecular em dois hospitais da cidade do Recife, obtendo informações das possíveis linhagens bacterianas que circulam nestes hospitais, favorecendo futuros estudos sobre as cepas bacterianas que estão infectando os pacientes para sugerir diretrizes sobre o uso racional de antimicrobianos e medidas de controle e prevenção.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Comparar o perfil de susceptibilidade antimicrobiana e a distribuição dos genes de resistência à meticilina (*mecA* e *blaZ*) e aos macrolídeos lincosaminas e estreptograminas B (*ermA* e *ermC*), de *Staphylococcus* spp. isolados de pacientes oncológicos e não oncológicos de dois hospitais da cidade do Recife, durante o ano de 2013 e verificar a associação do perfil de resistência aos antimicrobianos que atuam na parede celular, os genes de resistência (*mecA* e *blaZ*) com as características clínicas, demográficas e de internamento nos pacientes de hospital oncológico.

3.2 Objetivos específicos

Nos isolados de *Staphylococcus* spp. de pacientes oncológicos e não oncológicos de dois hospitais da cidade do Recife, durante o ano de 2013:

- Descrever o perfil de susceptibilidade frente aos antimicrobianos.
- Detectar os genes *mecA*, *blaZ*, *ermA*, *ermC*, *icaAD* e *hlg*.
- Comparar o perfil de susceptibilidade antimicrobiana e distribuição dos genes de resistência (*mecA*, *blaZ*, *ermA* e *ermC*)
- Identificar o tipo de *SCCmec* dos isolados de pacientes não oncológicos

Nos isolados de *Staphylococcus* spp. de pacientes oncológicos da cidade do Recife, durante o ano 2013:

- Verificar a associação do perfil de resistência à oxacilina e vancomicina, genes de resistência (*mecA* e *blaZ*) com as características clínicas, demográficas e de internamento nos pacientes tais como gênero, idade, contagem total de leucócitos, contagem de neutrófilos, uso de antimicrobiano, evolução clínica (alta ou óbito) e acesso venoso (central e periférico).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Desenho do estudo

Foi realizado um estudo observacional com objetivo de comparar isolados de *Staphylococcus* spp. de pacientes oncológicos de um hospital de oncologia da cidade de Recife e isolados de *Staphylococcus* spp. de pacientes não oncológicos em um hospital universitário da cidade do Recife, durante o período de um ano.

Este estudo foi dividido em duas partes:

No primeiro momento, foram comparados perfil de susceptibilidade antimicrobiana, a distribuição de genes de resistência à meticilina, aos macrolídeos lincosaminas e estreptograminas B (*blaZ*, *mecA*, *ermA* e *ermC*) e de virulência (*icaAD* e *hlg*) de isolados de *Staphylococcus* spp. de pacientes oncológicos e não oncológicos.

No segundo momento foi verificada a associação do perfil de resistência à oxacilina e vancomicina, os genes de resistência (*mecA* e *blaZ*) com os níveis de neutropenia e uso de cateter vascular nos pacientes de hospital oncológico.

4.2 Locais do estudo

O estudo foi realizado com isolados bacterianos, provenientes de pacientes internados no Hospital das Clínicas vinculado à UFPE (HC-UFPE) e isolados bacterianos provenientes de pacientes internados no Hospital do Câncer de Pernambuco (HCP).

As amostras foram coletadas durante a rotina pela equipe médica e de enfermagem de cada hospital e processadas no setor de Bacteriologia dos mesmos. Cada isolado, após a identificação, foi transportado para o Laboratório de Bacteriologia da Disciplina de Microbiologia e Imunologia do Departamento de Medicina Tropical-UFPE, para a realização dos testes confirmatórios tradicionais de identificação e os demais testes propostos neste trabalho. Também foi utilizado o Laboratório do Departamento de Microbiologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ-PE (CPqAM/FIOCRUZ-PE), para suporte nos procedimentos de biologia molecular.

4.3 População alvo

Foram inseridos na pesquisa os isolados de *Staphylococcus* spp. procedentes de pacientes de ambos os sexos que estiveram internados no HC-UFPE e no HCP no ano de 2013.

4.4 Critérios de inclusão e exclusão

Foram incluídos, todos os pacientes de ambos os sexos, sem limite mínimo ou máximo de idade, internados no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco e no Hospital do Câncer de Pernambuco com culturas positivas para *Staphylococcus* spp. A inclusão desses pacientes se deu pela entrada de amostras dos mesmos nos laboratórios de bacteriologia dos hospitais estudados, ou seja, foram utilizadas amostras secundárias, cujos dados clínicos foram obtidos através de consulta a prontuário médico.

Foram excluídos os pacientes do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco admitidos no setor de oncologia e pacientes com culturas positivas para outros microrganismos.

4.5 Tipo de amostragem e definição do tamanho da amostra

Por se tratar de um estudo de caracterização e comparação de isolados bacterianos, foi selecionada uma amostra de conveniência, composta por uma cultura positiva para *Staphylococcus* spp. por cada paciente, obtida nos laboratórios dos respectivos hospitais estudados, pelo período de um ano.

4.6 Definição, categorização e caracterização das variáveis do estudo

Este estudo está dividido em duas etapas principais, e para estas, a maioria das variáveis estão categorizadas como “presente” e “ausente” e por questões didáticas, suas definições foram organizadas em um único quadro (Quadro1) e para a segunda etapa do estudo, todas foram consideradas variáveis dependentes. A caracterização da susceptibilidade antimicrobiana, sensibilidade à oxacilina, sensibilidade à vancomicina e do tipo de *SCCmec* é

apenas descritiva, portanto, não está incluída no quadro. Para a segunda etapa, as variáveis independentes foram agrupadas no Quadro 2.

Quadro 2: Definição e categorização das variáveis do estudo

VARIÁVEIS GENÉTICAS			
Variáveis	Definição conceitual	Definição operacional	Categorização
Gene <i>mecA</i>	Gene que codifica a PBP2a responsável pela resistência à meticilina.	Fragmento de 1.046pb detectado em gel de agarose após reação de PCR descrita por PETINAKI et al. (2001).	Presente Ausente
Gene <i>blaZ</i>	Gene que codifica a betalactamase estafilocócica.	Fragmento de 533pb detectado em gel de agarose após reação de PCR descrita por MILHEIRIÇO et al. (2011).	Presente Ausente
Gene <i>ermA</i>	Gene que codifica a alteração ribossômica que confere resistência aos macrolídeos, lincosaminas e estreptograminas tipo B (MLS _B).	Fragmento de 421pb detectado em gel de agarose após reação de PCR descrita por LINA et al. (1999b).	Presente Ausente
Gene <i>ermC</i>	Gene que codifica a alteração ribossômica que confere resistência aos macrolídeos, lincosaminas e estreptograminas tipo B (MLS _B).	Fragmento de 572pb detectado em gel de agarose após reação de PCR descrita por LINA et al. (1999b).	Presente Ausente
Gene <i>icaAD</i>	Gene que codifica a biossíntese da adesina intercelular polissacarídica (PIA) ou N-acetilglicosamina polimérica (PNAG) constituintes do biofilme maduro (PIA/PNAG).	Fragmento de 1.585pb detectado em gel de agarose após reação de PCR descrita por VASUDEVAN et al. (2003).	Presente Ausente
Gene <i>hlg</i>	Gene que codifica γ -toxina	Fragmento de 937pb detectado em gel de agarose após reação de PCR descrita por LINA et al., (1999a).	Presente Ausente

Quadro 3: Variáveis independentes.

VARIÁVEIS CLÍNICAS		
Variáveis	Definição	Categorização
Contagem total de leucócitos	Contagem total de leucócitos no período da infecção por <i>Staphylococcus</i> spp. (mm ³)	Trata-se de uma variável quantitativa contínua.
Contagem de neutrófilos	Contagem de neutrófilos no período da infecção <i>Staphylococcus</i> spp.	Trata-se de uma variável quantitativa contínua.
Níveis de neutropenia	Contagem de neutrófilos abaixo de 1.500/mm ³ (MS, 2010).	Leve (1.000-1.500/mm ³), Moderada (500-1.000/mm ³) Grave (<500/mm ³)
Uso de antimicrobiano nos últimos 3 meses	Uso de antimicrobiano nos últimos 3 meses antes do atual internamento	Sim Não
Uso de antimicrobiano	Uso de antimicrobiano durante o isolamento do patógeno	Sim Não
Evolução clínica	Resultado das mudanças no quadro clínico e semiologia do paciente.	Alta Óbito
Uso de ventilação mecânica	Consiste em um método de suporte para o tratamento de pacientes com insuficiência respiratória aguda ou crônica agudizada.	Sim Não
Uso de acesso venoso central	O posicionamento de um dispositivo apropriado de acesso vascular cuja extremidade atinja a veia cava superior ou inferior, independentemente do local da inserção periférica (ARAÚJO, 2003). No momento da coleta dos isolados de <i>Staphylococcus</i> spp.	Sim Não
Uso de acesso venoso periférico	Cateter com tamanho que varia entre 4 e 8 cm, indicado ao acesso venoso de curta permanência para a administração de drogas não irritantes e coleta de sangue (ARAÚJO, 2003). No momento da coleta dos isolados de <i>Staphylococcus</i> spp.	Sim Não
Uso de sonda vesical	Sonda introduzida até a bexiga com a finalidade de retirar a urina	Sim Não

	(ARAÚJO, 2003). No momento da coleta dos isolados de <i>Staphylococcus spp.</i>	
--	---	--

4.7 Definição de termos

- Pacientes oncológicos: são aqueles pacientes internados em um hospital da rede de assistência ao câncer, portadores de algum tipo de tumor.
- Pacientes não oncológicos: são aqueles pacientes internados em serviço hospitalar não especializado em câncer, não portador de neoplasias.
- Câncer: é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado (maligno) de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores (acúmulo de células cancerosas) ou neoplasias malignas. Por outro lado, um tumor benigno significa simplesmente uma massa localizada de células que se multiplicam vagarosamente e se assemelham ao seu tecido original, raramente constituindo um risco de vida. Os diferentes tipos de câncer correspondem aos vários tipos de células do corpo. Por exemplo, existem diversos tipos de câncer de pele porque a pele é formada de mais de um tipo de célula. Se o câncer tem início em tecidos epiteliais como pele ou mucosas ele é denominado carcinoma. Se começa em tecidos conjuntivos como osso, músculo ou cartilagem é chamado de sarcoma. Outras características que diferenciam os diversos tipos de câncer entre si são a velocidade de multiplicação das células e a capacidade de invadir tecidos e órgãos vizinhos ou distantes (metástases) (INCA, 2015).

4.8 Coleta de dados

Após recebimento da aprovação do Comitê de Ética em Pesquisas Envolvendo Seres Humanos da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE) e do Comitê de Ética do Hospital do Câncer de Pernambuco, as amostras de pacientes foram coletadas através de repiques das amostras bacteriológicas provenientes dos laboratórios de bacteriologia dos hospitais participantes do estudo.

As informações sobre os pacientes oncológicos foram adquiridas após a coleta do material bacteriológico através de revisão de prontuários retirados do serviço de arquivo médico, utilizando formulário específico da pesquisa elaborado pela pesquisadora (Anexo A), com o objetivo de padronizar essa coleta.

4.9 Técnicas laboratoriais empregadas

4.9.1 Coleta dos isolados bacterianos

Os isolados de *Staphylococcus spp.* obtidos no ano de 2013 foram provenientes de dois hospitais públicos do Recife, HCP e HC-UFPE, originadas de pacientes internados. Os mesmos foram fornecidos pelos responsáveis dos laboratórios de bacteriologia dos referidos hospitais, após a identificação bacteriana. Desta forma, a coleta da amostra foi de responsabilidade do hospital, porém, foram realizados testes confirmatórios de identificação da espécie bacteriana antes da continuidade dos testes propostos no estudo.

Os isolados bacterianos foram coletados através de repiques em meio Ágar Caseína de Soja (Casoy) e transportados para o Laboratório de Bacteriologia da Disciplina de Microbiologia e Imunologia do Departamento de Medicina Tropical-UFPE e incubados em estufa a 35°C por 24 horas para serem subsequentemente submetidas a novos procedimentos de identificação para confirmação taxonômica. Esses isolados foram originados de amostras de ponta de cateter, drenos, sangue, abscesso, ferida operatória e secreções diversas.

4.9.2 Reisolamento e identificação do *Staphylococcus spp.*

Após a incubação de 24hs em Ágar Casoy, as amostras foram inoculadas em Ágar sangue 5%, incubadas 24-48 horas, a 35°C. As colônias com características macroscópicas de pertencerem ao gênero *Staphylococcus* foram coradas pelo método de Gram, e quando confirmadas pela morfologia e coloração, submetidas à identificação através dos testes de Catalase, Coagulase, DNase e fermentação de Manitol (KONEMAN et al., 2008; CLSI, 2014).

4.9.3 Susceptibilidade aos antimicrobianos

Após identificação, foi realizado antibiograma dos isolados de *Staphylococcus* pela técnica de disco-difusão em Ágar Mueller-Hinton (CLSI, 2014) utilizando os seguintes antimicrobianos: penicilina 10U, oxacilina 1µg, vancomicina 30µg, gentamicina 10µg, clindamicina 2µg, sulfametaxazol-trimetropim 1,25/23,75µg, ciprofloxacina 5µg, cefoxitina 30µg, teicoplanina 30µg, eritromicina 15µg e tetraciclina 30µg. A leitura dos halos de inibição formados foi feita utilizando paquímetro, sendo os resultados expressos em milímetros com os padrões descritos no CLSI, 2014. Os discos de eritromicina e clindamicina foram posicionados aproximados a fim de verificar a existência de resistência induzida (teste D) (CLSI, 2014).

4.9.4 *Screening* de Oxacilina

Após a realização do antibiograma, foram feitos subcultivos em placas de Ágar nutriente, dos isolados que apresentaram resistência à oxacilina e/ou cefoxitina. Após crescimento, foi feita suspensão direta das colônias para obter uma turbidez equivalente a uma solução padrão 0,5 da escala de McFarland. Mergulhou-se uma alça de platina de 1µL nessa suspensão e procedendo com o inóculo em uma área com diâmetro de 10 a 15mm em placas contendo o meio Ágar Mueller Hinton com NaCl (4% v/v; 0,68 mol/L) acrescido de 6 µg/mL de oxacilina. Estas placas foram incubadas a 35 °C por 24 horas sendo considerados, após leitura dos resultados como: >1 colônia = resistente. Foram utilizadas como controles de qualidade as cepas padrão para MRSA e MSSA: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 – Sensível e *Staphylococcus aureus* ATCC 33591 – Resistente (CLSI, 2014).

4.9.5 *Screening* de Vancomicina

Todos os isolados foram submetidas à *screening* de vancomicina, devido a baixa sensibilidade do disco. Desta forma, essas amostras foram inoculadas em caldo BHI e incubadas por 48 horas a 35°C a fim de se obter uma turbidez equivalente a uma solução padrão 2 da escala de McFarland. Mergulhou-se uma alça de platina de 1µL nessa suspensão e procedendo com o inóculo em uma área com diâmetro de 10 a 15mm em placas contendo o meio Ágar BHI suplementado com 6 µg/mL de vancomicina (OXOID). Estas placas foram

incubadas a 35 °C por 24 e 48 horas sendo considerados, após leitura dos resultados como: >1 colônia = resistente (BURNHAM, WEBER, DUNNE, 2010; CLSI, 2014; HOWDEN et al., 2010).

Foi utilizado como controle de qualidade as cepas padrão: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 – Sensível e *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 – Resistente (CLSI, 2014).

4.9.6 Microdiluição em caldo de vancomicina

Os isolados identificados como resistentes à vancomicina pelo teste de *screening* foram submetidos a microdiluição em caldo para obtenção da concentração inibitória mínima (MIC). A partir de uma cultura em placa de ágar sangue incubada a 35°C por 18-24 horas, preparou-se uma suspensão bacteriana na escala 0,5 de McFarland. Essa suspensão foi preparada através da inoculação de 1 ou 3 colônias em caldo Mueller Hinton e incubação a 35°C por 18-24 horas. Após o tempo de incubação, foram preparadas as microplacas estéreis de 96 poços com fundo em "U", distribuindo-se 150µL de meio Mueller Hinton caldo + 150µL da solução mãe do sal do antimicrobiano na primeira fileira de poços e a partir dessa fileira é retirado 150µL e adicionado a fileira de poços seguinte e assim sucessivamente obtendo-se diluições seriadas (de 128µg/mL a 1 µg/mL). Posteriormente é realizada a distribuição de 15µL dos inóculos bacterianos nos poços da microplaca. Após a microplaca ser inoculada, incubou-se a 37°C por 24horas e por 48horas. A leitura foi feita em ambos os tempos, a fim de detectar o crescimento bacteriano de todas as populações bacterianas presentes no inóculo da microplaca. A leitura é visual e o MIC é determinado como a menor concentração que não apresenta turvação, ou crescimento bacteriano (CLSI, 2014).

Foi utilizado como controle de qualidade as cepas padrão: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 – Sensível e *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 – Resistente (CLSI, 2014).

4.9.7 Extração de DNA total

Para a extração do DNA das amostras de *Staphylococcus* foi utilizada a técnica de FREITAS et al. (2008), na qual o DNA é extraído a partir de 1mL de cultura bacteriana previamente crescida em caldo BHI a 37°C por 24h, centrifugada a 14,000rpm/4°C. Ao sedimento é adicionado 500µL de TE (Tris-HCl 10mM e EDTA 1mM), 10µL de lisozima (10mg/mL) e 10µL de proteinase K (5mg/mL). A suspensão é incubada a 60°C por 20 min

seguido da adição de 100µL de STE (2,5% SDS; 10mM Tris-HCl, pH 8; 0,25mM EDTA) e incubação por 15min a 60°C, seguido de 5min na temperatura ambiente e 5min no banho com gelo. A reação é neutralizada com 130µL de 7,5M de acetato de amônio, permanecendo no banho com gelo por 15min e depois centrifugada por 5min. Aproximadamente 700µL do sobrenadante é transferido para outro tubo e misturado ao mesmo volume de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1), seguido de centrifugação por 5min. O sobrenadante é transferido para um novo tubo e o DNA precipitado em aproximadamente 420µL de isopropanol a -70°C por 30min ou -20°C por 24h. Após centrifugação, o sobrenadante é descartado e o precipitado ressuspenso em 10µL de RNase (0,2mg/mL) e estocado a -20°C.

O DNA dos isolados após a extração foi quantificado utilizando nanodrop 2000 (Thermo Scientific).

4.9.8 Identificação do gene *mecA* por PCR

Os isolados que apresentaram resistência a oxacilina e/ou cefoxitina e/ou *screening* de oxacilina, foram submetidos a detecção do gene *mecA* por PCR.

Para a amplificação foram utilizados os *primers* P1, 5'-GGTCCCATTA ACTCTGAAG-3' e P3, 5'-AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC-3' descritos por PETINAKI, et al.(2001) que resultam em fragmentos de 1.046bp. As reações de PCR foram preparadas individualmente em um volume final de 25µL em cada tubo contendo: 20ng de DNA genômico, 20 pmol de cada primer, MgCl₂ 1,5 mM, dNTP 200 µM, 1U de Go Taq DNA polimerase (Promega, Brasil) e 5µL do tampão Green Go Taq DNA polimerase (Promega, Brasil). As reações foram realizadas em termociclador (Biometra), programado inicialmente para 35 ciclos térmicos, com desnaturação de um minuto a 94°C, anelamento de um minuto a 55°C e uma extensão de dois minutos a 72°C seguido de uma etapa de alongamento final de 15 minutos a 72°C. Foi utilizado como controle negativo, um tubo contendo todos os componentes da mistura e ausência de DNA molde. Para controle positivo foi utilizada a cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 33591 – Resistente.

O produto da amplificação foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% e corado com Blue-Green (LGC biotecnologia), visualizado em transluminador UV e digitalizado através do software Kodak 1D versão 3.5.2 (Scientific Imaging Systems, USA). O marcador de peso molecular é de 100bp (Invitrogen).

4.9.9 Identificação do gene da betalactamase (*blaZ*) por PCR

Os isolados que apresentaram resistência a oxacilina e/ou cefoxitina e/ou *screening* de oxacilina, foram submetidos a detecção do gene *blaZ* por PCR.

Para a amplificação do gene *blaZ* foram utilizados os *primers* F1, 5'-GATAAGAGATTTGCCTATGC-3' e R1, 5'-GCATATGTTATTGCTTGACC-3' descritos por MILHEIRIÇO, et al.(2011) que resultam em fragmentos de 533bp. As reações de PCR foram preparadas individualmente em um volume final de 25µL em cada tubo contendo: 20ng de DNA genômico, 20 pmol de cada primer, 2,5 µL de MgCl₂ (25 mM), 2,5 µL dNTP (200 µM), 1U de Go Taq DNA polimerase (Promega, Brasil) e 5µL do tampão Green Go Taq DNA polimerase (Promega, Brasil). As reações foram realizadas em termociclador (Biometra), programado inicialmente para 30 ciclos térmicos, com desnaturação de um minuto a 92°C, anelamento de um minuto a 55°C e uma extensão de dois minutos a 72°C seguido de uma etapa de alongamento final de sete minutos a 72°C. Foi utilizado como controle negativo, um tubo contendo todos os componentes da mistura e ausência de DNA molde. Para controle positivo foi utilizado o isolado código 1171 do banco de culturas do Laboratório do Departamento de Microbiologia do CPqAM/FIOCRUZ-PE o qual foi sequenciado.

O produto da amplificação foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% e corado com Blue-Green (LGC biotecnologia), visualizado em transluminador UV e digitalizado através do software Kodak 1D versão 3.5.2 (Scientific Imaging Systems, USA). O marcador de peso molecular é de 100bp (Invitrogen).

4.9.10 Determinação do tipo de *SCCmec*

Foram selecionados alguns isolados positivos para a pesquisa do gene *mecA*. A determinação do tipo de *SCCmec* foi realizada utilizando-se o método de PCR multiplex, conforme o protocolo de Kondo et al (2007), descrito a seguir.

Foram utilizados os primers descritos na Tabela 2.

As reações de PCR foram preparadas individualmente em um volume final de 50µL em cada tubo, seguindo protocolo da Tabela 3 para *ccr complex*. Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em géis de agarose 2% e corados com Blue-Green (LGC biotecnologia), gerando fragmentos de diferentes tamanhos, como observado no Quadro 3,

visualizados em transluminador UV e digitalizados através do software Kodak 1D versão 3.5.2 (Scientific Imaging Systems, USA). O marcador de peso molecular é de 100bp (Invitrogen).

Tabela 2: Sequência de *primers* utilizados para as reações de PCR multiplex para determinação do *ccr complex*.

Primer	Sequências (5'-3')
α_1	5'AACCTATATCATCAATCAGTACGT3'
α_2	5'TAAAGGCATCAATGCACAAACACT3'
α_3	5'AGCTCAAAAGCAAGCAATAGAAT3'
β_c	5'ATTGCCTTGATAATAGCCITCT3'
MA1	5'TGCTATCCACCCTCAAACAGG3'
MA2	5'AACGTTGTAACCACCCCAAGA3'
γF	5'CGTCTATTACAAGATGTTAAGGATAAT3'
γR	5'CCTTTATAGACTGGATTATTCAAAATAT3'

Fonte: KONDO et al., 2007.

Tabela 3: Componentes para mistura de uma reação de PCR multiplex para *ccr complex*

Componente	Quantidade(μ L)
Água milliQ	28,6
Tampão	5,0
MgCl ₂ (25mM)	6,4
dNTPs (2,5mM de cada)	4,0
10 μ M primer MA1	0,5
10 μ M primer MA2	0,5
10 μ M primer α_1	0,5
10 μ M primer α_2	0,5
10 μ M primer α_3	1,0
10 μ M primer β_c	0,5
10 μ M primer γR	0,5
10 μ M primer γF	0,5
Taq DNA polimerase (5U/ μ l)	0,5
DNA	1,0
Volume final	50,0

Nota: As reações foram realizadas em termociclador (Biometra), programado inicialmente para 30 ciclos térmicos, com desnaturação de um minuto a 95°C, anelamento de um minuto a 57°C e uma extensão de dois minutos a 72°C seguido de uma etapa de alongamento final de 7 minutos a 72°C.

Quadro 4: Produtos de PCR em eletroforese em gel de agarose 2% .

<i>ccr complex 1</i>	695 bp
<i>ccr complex 2</i>	937 bp
<i>ccr complex 3</i>	1791 bp
<i>ccr complex 5</i>	518 bp

4.9.11 Detecção dos genes *ermA* e *ermC* pela técnica da PCR

Após a leitura do teste de disco-difusão, foram observados os perfis para eritromicina e clindamicina. Os perfis de resistência a ambos antibióticos (fenótipo MLSB_c) e resistente apenas à eritromicina com formação de teste D positivo (fenótipo MLSB_i) foram selecionados para a pesquisa dos genes *ermA* e *ermC* pela técnica da PCR.

Para a realização da PCR, foram utilizados os primers descritos por Lina et al. (1999b) para o gene *ermA*: F (5'-GTTCAAGAACAATCAATACAGAG-3') e R (5'-GGATCAGGAAAAGGACATTTTAC-3') e para o gene *ermC*: F (5'-GCTAATATTGTTTAAATCGTCAATTCC-3') e R (5'-GGATCAGGAAAAGGACATTTTAC-3'), com ampliações de 421pb e 572pb, respectivamente. Para a detecção do gene *ermA*, cada reação de amplificação foi preparada em um volume final de 25 µl para cada tubo e incluiu: 1µl (40 ng) de DNA total, 1µl (20 pmol) de cada primer, 0,6 µl de dextrorribonucleotídeo trifosfato (dNTP) (8 mM), 5,0 µl de tampão (5x), 1,5µl de MgCl₂ (25 mM), 0,4 µl de Go Taq DNA polimerase (5U) e 14,5 µl de água milliQ estéril. Para a detecção do gene *ermC*, cada reação de amplificação foi preparada da mesma forma como a anterior, exceto em relação à quantidade de Go Taq DNA polimerase (5U) e de água milliQ estéril, que nesta reação foi 0,3µl e 14,6 µl, respectivamente. As reações de amplificação foram realizadas no termociclador nas seguintes condições: 30 ciclos de 1 minuto a 94° C na etapa de desnaturação, 30 segundos a 49° C na etapa de anelamento e 30 segundos a 72° C na etapa de extensão, de acordo com as condições descritas por França et al. (2012). Durante a realização da PCR, foi incluso um controle negativo, correspondente a um tubo contendo todos os componentes da mistura ao qual não foi adicionado DNA molde. Quando houve a amplificação para o gene *ermA* e para o gene *ermC*, estes foram sequenciados e passaram a ser utilizados como controles positivos dos respectivos genes.

Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% corados com Blue-Green (LGC biotecnologia), visualizados em transluminador UV e

digitalizados através do software Kodak 1D versão 3.5.2 (Scientific Imaging Systems, USA). O marcador de peso molecular é de 100bp (Invitrogen).

4.9.12 Detecção dos genes *icaA* e *icaD*

Para amplificação dos genes *icaA* e *icaD* (*icaAD*) do operon *icaADBC*, foram utilizados os *primers* descritos por Vasudevan et al. (2003), F: 5'CCTAACTAACGAAAGGTAG3' e R: 5'GGCAATATGATCAAGATAC3' que resultam em fragmentos de 1.585pb. As reações de PCR foram preparadas individualmente em um volume final de 25µL em cada tubo contendo: 20ng de DNA genômico, 20 pmol de cada primer, 1,75 µL de MgCl₂ (25 mM), 0,63 µL dNTP (8 mM), 1U de Go Taq DNA polimerase (Promega, Brasil) e 5µL do tampão Green Go Taq DNA polimerase (Promega, Brasil). As reações foram realizadas em termociclador (Biometra), programado inicialmente para 30 ciclos térmicos, com desnaturação de um minuto a 94°C, anelamento de um minuto a 50°C e uma extensão de um minuto a 72°C seguido de uma etapa de alongamento final de 15 minutos a 72°C. Foi utilizado como controle negativo, um tubo contendo todos os componentes da mistura e ausência de DNA molde. Para controle positivo foi utilizado o isolado código 047 do banco de culturas do Laboratório do Departamento de Microbiologia do CPqAM/FIOCRUZ-PE o qual foi sequenciado.

O produto da amplificação foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% e corado com Blue-Green (LGC biotecnologia), visualizados em transluminador UV e digitalizados através do software Kodak 1D versão 3.5.2 (Scientific Imaging Systems, USA). O marcador de peso molecular é de 100bp (Invitrogen).

4.9.13 Detecção do gene *hlg*

Para amplificação foi seguido o protocolo descrito por LINA et al (1999a), utilizando os iniciadores F:5'GCCAATCCGTTATTAGAAAATGC3' e R: 5'CCATAGACGTAGCAACGGAT3' que resultam em fragmentos de 937bp.

As reações de PCR foram preparadas individualmente em um volume final de 25µL em cada tubo contendo: 20ng de DNA genômico, 20 pmol de cada primer, 1,75 µL de MgCl₂ (25 mM), 0,63 µL dNTP (8 mM), 1U de Go Taq DNA polimerase (Promega, Brasil) e 5µL do tampão Green Go Taq DNA polimerase (Promega, Brasil). As reações foram realizadas em

termociclador (Biometra), programado inicialmente para 30 ciclos térmicos, com desnaturação de um minuto a 94°C, anelamento de um minuto a 50°C e uma extensão de um minuto a 72°C seguido de uma etapa de alongamento final de 15 minutos a 72°C. Foi utilizado como controle negativo, um tubo contendo todos os componentes da mistura e ausência de DNA molde. Na ausência da estirpe de referência, para controle positivo foi utilizado o isolado código 412 do banco de culturas do Laboratório do Departamento de Microbiologia do CPqAM/FIOCRUZ-PE, o qual foi sequenciado. O produto da amplificação foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% e corado com Blue-Green (LGC biotecnologia), visualizados em transluminador UV e digitalizados através do software Kodak 1D versão 3.5.2 (Scientific Imaging Systems, USA). O marcador de peso molecular é de 100bp (Invitrogen).

4.9.14 Preservação das amostras

Todos os isolados coletados foram estocadas em glicerol 20% e meio líquido de BHI em - 20°C (na proporção de 500µL da suspensão bacteriana 0,5 na escala de McFarland em meio BHI para 500µL de glicerol).

4.9.15 Análise dos dados

Os dados clínicos e microbiológicos (APÊNDICE 1) foram introduzidos no software SPSS Statistics 20 para análise estatística, através da distribuição de frequências, teste χ^2 , teste de Fisher e teste de Mann-Whitney.

4.9.16 Considerações éticas

O projeto deste estudo foi submetido à análise pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Centro de Ciências da Saúde (CCS), da UFPE e Comitê de Ética do Hospital do Câncer de Pernambuco com a permissão e colaboração das Comissões de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) dos hospitais envolvidos.

As informações obtidas são confidenciais e utilizadas apenas para este estudo. Não houve Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para os pacientes por se tratar de amostras secundárias e revisão de prontuário

Os dados serão mantidos por cinco anos na posse da pesquisadora para eventuais comprovações.

Em ambos os hospitais, foram obtidas Cartas de Anuência, autorizando o acesso aos prontuários clínicos, bem como o fornecimento dos isolados de *Staphylococcus spp.* identificados no período da pesquisa.

5 RESULTADOS

PATOGENICIDADE E RESISTÊNCIA DE *Staphylococcus* spp. DE PACIENTES ONCOLÓGICOS E NÃO ONCOLÓGICOS DE DOIS HOSPITAIS DA CIDADE DE RECIFE-PE

Introdução

As infecções bacterianas são uma causa importante de complicações em pacientes com neoplasias hematológicas e neutropenia induzida por quimioterapia e a bacteremia é a principal causa de morte, diretamente ou interferindo com o cronograma de quimioterapia (Bucaneve et al., 2005, Paul et al. 2010, Montassier et al., 2013, Quiles et al., 2015). Os fatores de risco para infecção neste grupo de pacientes são mais expressivos, pois além do imunocomprometimento causado pela própria doença, são submetidos a tratamento cirúrgico, quimioterapia e / ou radioterapia, sendo a neutropenia o maior risco de infecção nessa população (Costa et al. ., 2015).

Nas últimas décadas, o sucesso do tratamento de neoplasias malignas em crianças e adolescentes aumentou em até 70-80% dos casos. Além disso, a imunossupressão causada pelo tratamento torna estes pacientes mais susceptíveis a infecções, que são a principal causa de morte entre eles. Nestes doentes, a bacteremia resulta frequentemente da infecção por um ou mais microrganismos, principalmente membros da família Enterobacteriaceae, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus* e *Staphylococcus* (Quiles et al., 2015). Nas últimas três décadas, a proporção de microrganismos Gram-positivos aumentou devido ao uso generalizado de cateteres permanentes (Montassier et al., 2013).

Ressalta-se que os centros de terapia intensiva concentram as maiores taxas de incidência de infecções hospitalares e são epicentros de emergência de resistência microbiana, devido à hospitalização de pacientes em estado grave. Esses pacientes, na maioria dos casos, utilizam antimicrobianos de amplo espectro e são submetidos a inúmeros procedimentos invasivos (Cataneo et al., 2011). Ocorrem cada vez mais evidências suportando a idéia de que os pacientes neutropênicos de baixo risco não necessariamente necessitam de hospitalização e antibiótico de amplo espectro prolongado para infecções bacterianas invasivas. As estratégias para este grupo incluem o tratamento antimicrobiano de curta duração com consequente redução da hospitalização e manejo ambulatorial com o uso de antibióticos orais (Santolaya et

al., 2004; Cagol et al., 2009), reforçando a importância da adequada caracterização da resistência de estirpes bacterianas.

As espécies de *Staphylococcus* são os microrganismos mais frequentemente isolados no ambiente hospitalar. *Staphylococcus aureus* se destaca pela sua capacidade de propagação, especialmente no ambiente intra-hospitalar, devido à aquisição de resistência aos antimicrobianos. Sua importância clínica decorre da sua capacidade de causar vários tipos de infecções cutâneas, como foliculite, furúnculos e até mesmo infecções sistêmicas potencialmente fatais (Costa et al., 2015; Jenkins et al., 2015). Embora seu potencial patogênico não esteja totalmente esclarecido (Gales et al., 2009), o *Staphylococcus* coagulase negativo (CoNS) é frequentemente responsável por infecções graves, principalmente devido ao crescente uso de procedimentos invasivos. Além disso, foi relatada maior incidência de infecções por CoNS em pacientes com neutropenia grave (Kabalan et al., 2010).

S. aureus pode evadir-se do sistema imune do hospedeiro devido à existência de vários fatores de virulência e alguns estudos mostraram diferenças na produção de fatores de virulência como a gama-hemolisina (*hlg*) e o biofilme (*ica*) entre as cepas isoladas de pacientes com infecções relacionadas à cateteres quando comparados com o grupo controle sem infecção (Lisa, 2004; Ninin et al., 2006). Entretanto, essas comparações não foram realizadas em pacientes de centros de oncologia. A produção de biofilme pode permitir que esses isolados colonizem o cateter e outros dispositivos, evadindo-se do sistema imunológico e antimicrobianos, o que pode levar a um aumento da frequência de bacteremia e hemoculturas falso-positivas ou falso-negativas (Cafiso et al., 2004; Otto, 2004).

Em um estudo retrospectivo em um hospital de oncologia norte-americano, foi determinada a existência de clones entre grupos de isolados resistentes através da associação dos dados de resistência com as informações clínicas sugestivas de infecção (Muldrew et al., 2008). A análise das manifestações clínicas de pacientes em um hospital de oncologia do Rio de Janeiro sugeriu que as cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) são mais virulentas que a *S. aureus* sensíveis à meticilina (MSSA) em pacientes com câncer (Thuler et al. 1999).

Dentre os diversos mecanismos de resistência encontrados em *Staphylococcus*, os mais comuns são a resistência a macrolídeos, aminoglicosídeos, betalactâmicos e glicopeptídeos (Sangappa e Thiagarajan 2012; Jenkins et al., 2015). Portanto, a importância desse microrganismo reside na virulência mediada por suas toxinas, seu caráter invasivo e seu perfil

de resistência aos antibióticos (Le Loir et al., 2003; Blomqvist et al., 2015; Jenkins et al., 2015). A presença desses fatores de virulência está relacionada a diversidade de manifestações clínicas (Le Loir et al., 2003, Jenkins et al., 2015), porém em relação aos pacientes de oncologia, isto não está totalmente esclarecido.

Aumento de estirpes resistentes com diversos fatores de virulência ao longo dos anos sinaliza a potencial falha do uso de agentes antimicrobianos no tratamento de infecções devido a associação dos mecanismos de resistência do microrganismo e a resistência à resposta imune do hospedeiro (Lim et al., 2012). O número de genes associados à virulência carregados por um isolado bacteriano é um produto da interação entre as taxas de aquisição do gene, o custo para manutenção biológica e a taxa de falência da cepa causadora da doença (Leclercq, 2002; Jenkins et al., 2015). Desta forma, a maioria das infecções graves por *S. aureus* não pode ser explicada pela ação de somente um determinado fator de virulência, e sim pela ação de vários destes fatores durante o processo infeccioso. A sobrevivência e proliferação de um determinado patógeno no hospedeiro são favorecidas por mecanismos que permitem a evasão aos mecanismos imunes do hospedeiro. Assim, cepas que escapam mais eficientemente dos mecanismos de defesa do hospedeiro serão os tipos mais prevalentes encontradas. Existem evidências de que alguns tipos clonais são mais virulentos que outros e que estes aparecem com uma frequência maior entre isolados de doentes do que em portadores sadios (Leclercq, 2002, Schaefer et al., 2009, Spaan et al., 2014, Blomqvist et al., 2015).

A proposta deste estudo foi caracterizar e comparar *Staphylococcus* spp. isolados de pacientes oncológicos e não oncológicos de dois hospitais da cidade de Recife-PE, quanto ao perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos e a presença de genes de resistência e virulência. Esta análise microbiológica permitirá mapear as cepas bacterianas através de fatores de resistência e virulência, o que facilitará o rastreamento do uso racional de antimicrobianos e o tratamento das infecções nos hospitais.

Materiais e Métodos

O estudo comparou *Staphylococcus* spp. isolados de pacientes oncológicos e não oncológicos de um hospital de oncologia (HO) e um hospital universitário (HU), respectivamente, em Recife, PE, Brasil durante um ano (2013). No estudo, foram incluídos pacientes do sexo masculino e feminino. As amostras foram coletadas durante a rotina pela

equipe médica e de enfermagem dos hospitais. Os isolados foram identificados pelas características macroscópicas em placas de ágar de sangue a 5%, coloração de Gram e testes da catalase, coagulase, DNase e fermentação do manitol (CLSI, 2014).

Susceptibilidade Antimicrobiana

Os isolados de *Staphylococcus* foram testados pela técnica de disco-difusão em placas de Agar Mueller-Hinton (CLSI, 2014) utilizando os seguintes antimicrobianos e concentrações: penicilina 10U, oxacilina 1µg, vancomicina 30µg, gentamicina 10µg, clindamicina 2µg, sulfametoxazol- trimetropim 1,25 / 23,75µg, Ciprofloxacina 5 µg, cefoxitina 30 µg, teicoplanina 30 µg, eritromicina 15 µg e tetraciclina 30 µg. Foram considerados os pontos interpretativos do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (CLSI, 2014). Os discos de eritromicina e clindamicina foram colocados aproximados para avaliar a resistência induzida (teste D) (CLSI, 2014).

Screening de Oxacilina

Foram feitos subcultivos em placas de ágar nutriente dos isolados que foram resistentes à oxacilina e / ou cefoxitina na técnica de disco-difusão. Foi feita suspensão direta das colônias para se obter uma turbidez equivalente ao padrão 0,5 da escala de McFarland. Foi mergulhada uma alça de platina de 1 µL nesta suspensão e prosseguiu-se com o inóculo numa área com diâmetro de 10 a 15 mm em placas contendo ágar Mueller Hinton com NaCl (4% v / v, 0,68 mol / L) e 6 µg / mL de oxacilina. Estas placas foram incubadas a 35 °C durante 24 horas sendo consideradas, após a leitura os resultados como:> 1 colônia = resistentes. Foram utilizadas como padrão de controle de qualidade para MRSA e MSSA: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 - Sensível e *Staphylococcus aureus* ATCC 33591 - Resistente (CLSI, 2014).

Screening de Vancomicina

Todos os isolados foram submetidos a *screening* de vancomicina. Estas amostras foram inoculadas em caldo BHI e incubadas a 35°C para atingir uma escala de 2 McFarland. Uma alçada de 1µL deste crescimento foi espalhada em área de 10 a 15mm de diâmetro em placas contendo ágar BHI suplementado com 6 µg / mL de vanvomicina (OXOID). As placas foram incubadas a 35 °C durante 24 e 48 horas considerando resistência como> 1 colônia (Burnham Et al., 2010, Howden et al., 2010, CLSI, 2014).

Enterococcus faecalis ATCC 29212 - Sensível e *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 - Resistentes foram utilizados como estirpes padrão de controle de qualidade (CLSI, 2014).

Extração de DNA Total

Para a extração do DNA das amostras de *Staphylococcus* foi utilizada a técnica de Oliveira et al (2015) e o DNA dos isolados após a extração foi quantificado utilizando nanodrop 2000 (Thermo Scientific).

Identificação do gene *mecA* por PCR

A presença do gene *mecA* foi avaliada por PCR entre os isolados que se apresentaram fenotipicamente resistentes à oxacilina e/ou cefoxitina utilizando os *primers* descritos por Petinaki et al (2001). As reações de PCR foram preparadas individualmente em um volume final de 25µL em cada tubo contendo: 20ng de DNA genômico, 20 pmol de cada primer, MgCl₂ 1,5 mM, dNTP 200 µM, 1U de Go Taq DNA polimerase (Promega, Brasil) e 5µL do tampão Green Go Taq DNA polimerase (Promega, Brasil). As reações foram realizadas em termociclador (Biometra), programado inicialmente para 35 ciclos térmicos, com desnaturação de um minuto a 94°C, anelamento de um minuto a 55°C e uma extensão de dois minutos a 72°C seguido de uma etapa de alongamento final de 15 minutos a 72°C. Foi utilizado como controle negativo, um tubo contendo todos os componentes da mistura e ausência de DNA molde. Para controle positivo foi utilizada a cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 33591 – Resistente.

Identificação do gene da betalactamase (*blaZ*) por PCR

A presença do gene *blaZ* foi avaliada por PCR entre os isolados que se apresentaram fenotipicamente resistentes à oxacilina e/ou cefoxitina utilizando os *primers* descritos por Milheiriço et al (2011). As reações de PCR foram preparadas individualmente em um volume final de 25µL em cada tubo contendo: 20ng de DNA genômico, 20 pmol de cada primer, 2,5

μL de MgCl_2 (25 mM), 2,5 μL dNTP (200 μM), 1U de Go Taq DNA polimerase (Promega, Brasil) e 5 μL do tampão Green Go Taq DNA polimerase (Promega, Brasil). As reações foram realizadas em termociclador (Biometra), programado inicialmente para 30 ciclos térmicos, com desnaturação de um minuto a 92°C, anelamento de um minuto a 55°C e uma extensão de dois minutos a 72°C seguido de uma etapa de alongamento final de sete minutos a 72°C. Foi utilizado como controle negativo, um tubo contendo todos os componentes da mistura e ausência de DNA molde. Para controle positivo foi utilizado o isolado código 1171 do banco de culturas do Laboratório do Departamento de Microbiologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (FIOCRUZ-PE), o qual foi devidamente sequenciado.

Determinação do tipo de *SCCmec*

O tipo de complex *ccr* foi avaliado por PCR multiplex entre os isolados do HU positivos para o gene *mecA* seguindo o protocolo de Kondo et al (2007) descrito a seguir: As reações de PCR foram preparadas individualmente em um volume final de 50 μL em cada tubo contendo: 20ng de DNA genômico, 10 μM de cada primer, 6,4 μL de MgCl_2 (25 mM), 4,0 μL dNTP (2,5 mM), 1U de Go Taq DNA polimerase (Promega, Brasil) e 5 μL do tampão Green Go Taq DNA polimerase (Promega, Brasil). As reações foram realizadas em termociclador (Biometra), programado inicialmente para 30 ciclos térmicos, com desnaturação de um minuto a 95°C, anelamento de um minuto a 57°C e uma extensão de dois minutos a 72°C seguido de uma etapa de alongamento final de sete minutos a 72°C.

Detecção dos genes *ermA* e *ermC* por PCR

Os isolados resistentes à eritromicina e clindamicina (fenótipo MLSB_c) e com teste D positivo (fenótipo MLSB_i) foram analisados quanto a presença dos genes *ermA* e *ermC* utilizando os *primers* descritos por Lina et al (1999a): *ermA* F5'GTTCAAGAACAATCAATACAGAG3' e R5'GGATCAGGAAAAGGACATTTTAC3';

ermC:F5'GCTAATATTGTTTAAATCGTCAATTCC3' e R5'GGATCAGGAAAAGGACATTTTAC3'. Para a detecção do gene *ermA*, cada reação de amplificação foi preparada em um volume final de 25 µl para cada tubo e incluiu: 1µl (40 ng) de DNA total, 1µl (20 pmol) de cada primer, 0,6 µl de dextrorribonucleotídeo trifosfato (dNTP) (8 mM), 5,0 µl de tampão (5x), 1,5µl de MgCl₂ (25 mM), 0,4 µl de Go Taq DNA polimerase (5U) e 14,5 µl de água milliQ estéril. Para a detecção do gene *ermC*, cada reação de amplificação foi preparada da mesma forma como a anterior, exceto em relação à quantidade de Go Taq DNA polimerase (5U) e de água milliQ estéril, que nesta reação foi 0,3µl e 14,6 µl, respectivamente. As reações de amplificação foram realizadas no termociclador nas seguintes condições: 30 ciclos de 1 minuto a 94° C na etapa de desnaturação, 30 segundos a 49° C na etapa de anelamento e 30 segundos a 72° C na etapa de extensão, de acordo com as condições descritas por França et al (2012). Como controle negativo, utilizou-se um tubo contendo todos os componentes da mistura sem DNA e como controle positivo, o DNA de um isolado positivo para os genes (*ermA* e *ermC*) confirmados por amplificação e sequenciamento foram utilizados.

Detecção dos genes *icaA* e *icaD*

Para amplificação dos genes *icaA* e *icaD* do operon *icaADBC*, foram utilizados os primers descritos por Vasudevan et al (2003) (F5'CCTAACTAACGAAAGGTAG3' e R5'GGCAATATGATCAAGATAC3') que resultam em fragmentos de 1.585pb. As reações de PCR foram preparadas individualmente em um volume final de 25µL em cada tubo contendo: 20ng de DNA genômico, 20 pmol de cada primer, 1,75 µL de MgCl₂ (25 mM), 0,63 µL dNTP (8 mM), 1U de Go Taq DNA polimerase (Promega, Brasil) e 5µL do tampão Green Go Taq DNA polimerase (Promega, Brasil). As reações foram realizadas em termociclador (Biometra), programado inicialmente para 30 ciclos térmicos, com desnaturação de um minuto a 94°C, anelamento de um minuto a 50°C e uma extensão de um minuto a 72°C seguido de uma etapa de alongamento final de 15 minutos a 72°C. Foi utilizado como controle negativo, um tubo contendo todos os componentes da mistura e ausência de DNA molde. Para controle positivo foi utilizado o isolado código 047 do banco de culturas do

Laboratório do Departamento de Microbiologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (FIOCRUZ-PE), o qual foi devidamente sequenciado.

Detecção do gene *hlg*

Para amplificação do gene *hlg* o protocolo descrito por Lina et al (1999b) foi empregado utilizando os *primers* 5'GCCAATCCGTTATTAGAAAATGC3' e 3'CCATAGACGTAGCAACGGAT3' para um fragmento de 937pb. As reações de PCR foram preparadas individualmente em um volume final de 25µL em cada tubo contendo: 20ng de DNA genômico, 20 pmol de cada primer, 1,75 µL de MgCl₂ (25 mM), 0,63 µL dNTP (8 mM), 1U de Go Taq DNA polimerase (Promega, Brasil) e 5µL do tampão Green Go Taq DNA polimerase (Promega, Brasil). As reações foram realizadas em termociclador (Biometra), programado inicialmente para 30 ciclos térmicos, com desnaturação de um minuto a 94°C, anelamento de um minuto a 50°C e uma extensão de um minuto a 72°C seguido de uma etapa de alongamento final de 15 minutos a 72°C. Foi utilizado como controle negativo, um tubo contendo todos os componentes da mistura e ausência de DNA molde. Na ausência da estirpe de referência, para controle positivo foi utilizado o isolado código 412 do banco de culturas do Laboratório do Departamento de Microbiologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (FIOCRUZ-PE), o qual foi devidamente sequenciado.

Os produtos de todas as amplificações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% e corados com Blue-Green (LGC biotecnologia), visualizados em transluminador UV e digitalizados através do software Kodak 1D versão 3.5.2 (Scientific Imaging Systems, USA).

Para os produtos da amplificação do complexo *ccr* foi utilizado gel de agarose 2%. O marcador de peso molecular é de 100bp (Invitrogen).

Análise dos Dados

Os dados clínicos e microbiológicos foram introduzidos no software SPSS Statistics 20 para análise estatística, através da distribuição de frequências, teste χ^2 e teste de Fisher.

Resultados

Para o estudo foram obtidos 173 isolados (104 *S. aureus* e 69 CoNS) dos quais 51 eram de pacientes do HO (47 *S. aureus* e 4 CoNS) e 122 (57 *S. aureus* e 65 CoNS) de pacientes da

HU de Recife, PE, Brasil, durante o ano de 2013. A fonte mais frequente das amostras foi a cultura de sangue, seguida de ponta de cateter em ambos os hospitais (Tabela 2).

Houve maior porcentagem de isolados susceptíveis, com exceção da oxacilina e cefoxitina entre os 104 isolados do HU (Tabela 3). Os 104 isolados que apresentaram resistência à oxacilina e/ou cefoxitina foram submetidos ao *screening* de oxacilina. O *screening* de vancomicina identificou 24 (27.3%) isolados como resistentes (Tabela 4).

O perfil de susceptibilidade à eritromicina e clindamicina também foi analisado pelo método de disco-difusão e 41 isolados com fenótipo MLSBc (Macrolídeos, Lincosamidas e estreptograminas constitutivo B) e cinco do fenótipo MSLBi (Macrolídeos, Lincosamidas e estreptograminas induzível B) foram identificados no hospital universitário. No hospital de oncologia, oito isolados foram identificados com o fenótipo MLSBc e seis MLSBi (Tabela 5).

Os isolados apresentando estes fenótipos foram analisados por PCR para a detecção dos genes *ermA* e *ermC*. Encontrou-se apenas um isolado contendo o gene *ermC* no fenótipo constitutivo. O gene *ermA* não foi observado no hospital de oncologia (Tabela 5). Observou-se isolados positivos para todos os genes nos fenótipos estudados, com exceção do gene *ermA* no fenótipo induzível no hospital universitário (Tabela 5).

A ocorrência dos genes *blaZ* e *mecA* foi avaliada por PCR entre os isolados resistentes fenotipicamente à oxacilina e/ou cefoxitina. Entre eles, 50% e 77.7%, do hospital de oncologia, foram positivos para os genes *blaZ* e *mecA*, respectivamente (Tabela 6). Dentre os isolados analisados do hospital universitário, 45.7% foram positivos para o gene *blaZ* e 17% para o gene *mecA* (Tabela 6).

A ocorrência dos genes *icaAD* e *hlg* foi observada respectivamente em 25% e 42.8% dos isolados do hospital universitário e em 32.1% e 70%, respectivamente, nos isolados do hospital de oncologia. A Tabela 6 mostra a distribuição de acordo com a fonte de origem.

Neste estudo, não houve diferença estatisticamente significativa na ocorrência dos genes de resistência *blaZ*, *mecA*, *ermA* e *ermC* quando comparados os dois hospitais. Quanto aos genes de virulência, houve diferença estatisticamente significativa quando comparados os dois hospitais. Os quadros 2 e 3 mostram os resultados do valor de *p* encontrado na análise estatística.

Dos cinco isolados positivos para o gene *mecA* do hospital universitário analisados por PCR para determinação do tipo de complexo *ccr*, quatro mostraram *ccr* tipo I (*ccrA1*, 695pb) e um foi *ccr* tipo II (*ccrA2*, 937 pb) (Figura 1).

Discussão

A maioria dos portadores de *Staphylococcus* spp. são assintomáticos e o processo de infecção normalmente está associado a algum fator que diminui a resposta imunológica do indivíduo, como doenças ou procedimentos médicos invasivos, sendo este microrganismo referido como um dos principais agentes de bacteremia, frequentemente adquirida no ambiente hospitalar (Muldrew et al. 2008; Schaefer et al., 2009). Em relação ao uso de cateter vascular central, *S. aureus* e *Staphylococcus* coagulase negativo (SCoN) são os microrganismos mais frequentemente isolados, representando 30% cada um (Muldrew et al., 2008; Schaefer et al., 2009).

Em nosso estudo, as amostras mais frequentes foram cultura de sangue e ponta de cateter com porcentagens de 33.6% e 17.2% respectivamente para HU e 25.5% e 13.7% para HO.

No Brasil, a frequência de isolamento de *S. aureus* e sua relação com infecções hospitalares atinge valores elevados. Em muitos hospitais brasileiros, a prevalência de cepas de MRSA varia de 40 a 80% (Lina et al., 1999b, Santos et al., 2010, Jones et al., 2013, Almeida et al., 2014, Braga et al. 2014) e os dados do Programa de Vigilância Antimicrobiana mostram que o MRSA atinge 31% entre os agentes infecciosos nosocomiais e comunitários e são considerados os mais comuns entre os patógenos mais prevalentes (Santos et al., 2010, Silveira et al. Al., 2015). Uma pesquisa realizada em hospitais brasileiros mostrou resistência de 80% (Silveira et al., 2015) de CoNS em hemoculturas. Em nosso estudo, este foi o tipo de amostra mais frequente; entretanto, *S. aureus* foi mais prevalente em ambos os hospitais.

No que diz respeito à detecção dos genes *blaZ* e *mecA* por PCR foram encontradas, respectivamente, 50% e 77.7% de amostras positivas no HO, enquanto no HU houve 45.7% de ocorrência para o gene *blaZ* e 7% para o gene *mecA*. Alguns estudos mostram que a taxa de produção de betalactamase varia de 55.7% a 92.6% para *Staphylococcus* (Oliveira et al., 2011; Rabelo et al., 2013) e nossos resultados se enquadram dentro desses limites. Oliveira et al. (2011) encontraram alta prevalência de betalactamase em seus isolados (83%) e chamaram a atenção para o uso generalizado de drogas na prática clínica que pode desencadear resistência a várias classes antimicrobianas.

Um estudo realizado na Índia por Prabhash et al (2010) relatou uma taxa de 18% de *S. aureus* resistente à meticilina em pacientes com câncer, semelhante aos nossos resultados no hospital universitário de Recife. Outro estudo realizado na Coréia do Sul por Kang et al. (2012), relatou uma prevalência de 48.4% de MRSA associada a bacteremia em pacientes

com câncer, uma porcentagem inferior à do nosso trabalho (77.7%) para pacientes oncológicos.

Outro estudo realizado anteriormente no mesmo hospital universitário, relatou porcentagem ligeiramente inferior ao nosso, cerca de 10% dos isolados foram considerados MRSA (Rabelo et al., 2014), sugerindo que as medidas de controle deste tipo de microrganismo não foram totalmente eficazes. Neste estudo, foi observada a presença de cepas resistentes à meticilina somente pelos métodos fenotípicos para ambos os hospitais, o que sugere a presença de outros mecanismos de resistência ou não expressão de genes pesquisados (Yoshida et al., 2001, 2003, Milheiriço et al., 2011, Sangappa e Thiagarajan, 2012).

O perfil de resistência à vancomicina no presente estudo entre os isolados do hospital universitário e oncológico descreveu percentual de 25% e 29.5%, respectivamente. Os estafilococos resistentes aos glicopeptídeos foram encontrados recentemente no Brasil e o isolamento de *S. aureus* resistente à vancomicina foi registrado em São Paulo (Rossi et al., 2014, Panesso et al., 2015). Outro estudo previamente realizado no hospital universitário (Rabelo et al., 2014), relatou 11% de isolados resistentes usando o método de *screening*, mas apenas entre as amostras de MRSA.

No presente estudo, o fenótipo MLSBc encontrado em 41 isolados (33.6%) do hospital universitário e oito isolados (15.7%) do hospital de oncologia foi predominante sobre o fenótipo MLSBi encontrado em cinco isolados (4.1%) do HU e seis isolados (11.8%) do HO.

Esses achados são diferentes daqueles de outro estudo no Brasil que identificou 71 (46.7%) isolados MLSBc e cinco isolados MLSBi (3.3%) (Coutinho et al., 2010).

Os dados de susceptibilidade antimicrobiana são essenciais para o estabelecimento de uma terapia adequada, tornando indispensável realizar o teste D (Coutinho et al., 2010; Juyal et al., 2013). A categorização de isolados de *Staphylococcus* spp. como sensível à clindamicina sem verificar se existe resistência induzível pode resultar em terapia inadequada. Por outro lado, um resultado negativo para a resistência à clindamicina induzível confirma a sensibilidade antimicrobiana e permite uma correta terapêutica (Kumar et al., 2012).

Em um estudo realizado no Irã (Saderi et al., 2011), o gene *ermA* foi mais frequente que o gene *ermC*, respondendo por 76 (60,3%) e 69 (54,8%), respectivamente, dos isolados de *S. aureus*. Diferentes resultados foram obtidos em nosso estudo, a presença do gene *ermC* foi maior do que o gene *ermA* nos isolados de ambos os hospitais. Em nosso estudo, não foi encontrado nenhum isolado positivo para o gene *ermA* no hospital oncológico para os

fenótipos estudados. Nenhum isolado positivo para este gene foi encontrado para o fenótipo induzido no hospital universitário. Os isolados que não abrigam os genes *ermA* ou *ermC*, podem possuir o gene *ermB*. Devido a uma possível associação destes genes, os isolados que abrigam os genes *ermA* ou *ermC* podem também conter *ermB*. A presença do gene *ermB* não foi pesquisada em nosso trabalho porque ocorre principalmente entre estreptococos e enterococos (Leclercq, 2002). Além disso, Coutinho et al (2010), relataram uma baixa frequência do gene *ermB*.

No presente trabalho, foram observados 42,8% e 70% dos isolados positivos para o gene *hlg*, respectivamente no hospital universitário e no hospital de oncologia. Oliveira et al. (2014) encontraram 41,86% de isolados CoNS resistentes à metilina de hemoculturas em outro hospital universitário da mesma região e um estudo na Malásia relatou uma porcentagem de 45% de isolados resistentes à metilina de pacientes e estudantes de um hospital universitário (Lim et al., 2012). O gene *hlg* codifica para a toxina gama que tem atividade pró-inflamatória e é capaz de lisar eritrócitos e leucócitos, o que aumenta o potencial toxigênico das bactérias e a gravidade das infecções (Le Loir et al., 2003; Oliveira et al., 2014; Spaan et al., 2014).

S. aureus e CoNS são capazes de produzir biofilmes. A adesão é mediada pela adesina intercelular N-acetil-glicosamina polimérica (PNAG) que é sintetizada por enzimas codificadas pelos genes presentes no locus *ica* (Barbieri et al., 2015). Em nosso trabalho, houve 25% e 32,1% dos isolados positivos para *icaAD*, respectivamente, no hospital universitário e no hospital de oncologia hospital. Maior percentual de positividade (79%) foi encontrado entre pacientes internados e estudantes de um hospital na Malásia (Lim et al., 2012). Outro estudo relatou 75% dos isolados positivos em amostras de pacientes oncológicos com implantes mamários (Barbieri et al., 2015).

Neste estudo, não houve diferença estatisticamente significativa na presença dos genes de resistência (*blaZ*, *mecA*, *ermA* e *ermC*) quando comparados os dois hospitais, enquanto diferença estatisticamente significativa foi encontrada na presença dos genes de virulência (*icaAD* e *hlg*). Este achado sugere que a oncologia não desempenha nenhum papel na presença de genes de resistência entre os grupos. Por outro lado, as características dos grupos de pacientes parecem estar associadas ao potencial toxigênico e patogênico dos isolados estudados.

O tipo do complexo *ccr* foi avaliado por PCR entre os isolados *mecA* positivos do hospital universitário e o *ccr* tipo I (*ccrA1*, 695pb) e o tipo II (*ccrA2*, 937 pb) foram

encontrados, observando-se maior frequência de *ccr* tipo I. Estudos prévios relataram a ocorrência de *SCCmec* tipo I, II, III, IV e V em hospitais brasileiros (Ternes et al., 2013, Lima et al., 2014, Pereira et al., 2014 e Oliveira et al., 2015). Devido ao pequeno número de isolados, não foi possível fazer inferências sobre esses achados. Sabe-se que os tipos *SCCmec* I e II estão associados a cepas de origem hospitalar, caracterizadas por resistência múltipla a antibióticos, além de betalactâmicos, macrolídeos, aminoglicosídeos, tetraciclina, quinolonas e rifampicina (Hiramatsu et al., 2013).

Em conclusão, o monitoramento antimicrobiano é essencial para o tratamento de infecções em cada hospital.

Tabelas e figuras

Tabela 1: Sequência de *primers* utilizados para reações de PCR multiplex para determinação do complexo *ccr* (Kondo et al., 2007).

Primer	Sequências (5'-3')
α_1	5'AACCTATATCATCAATCAGTACGT3'
α_2	5'TAAAGGCATCAATGCACAAACACT3'
α_3	5'AGCTCAAAGCAAGCAATAGAAT3'
β_c	5'ATTGCCTTGATAATAGCCITCT3'
MA1	5'TGCTATCCACCCTCAAACAGG3'
MA2	5'AACGTTGTAACCACCCCAAGA3'
γF	5'CGTCTATTACAAGATGTTAAGGATAAT3'
γR	5'CCTTTATAGACTGGATTATTCAAATAT3'

Quadro 1: Produtos de PCR de eletroforese em gel de agarose 2%.

<i>ccr complex 1</i>	695 bp
<i>ccr complex 2</i>	937 bp
<i>ccr complex 3</i>	1791 bp
<i>ccr complex 5</i>	518 bp

Tabela 2: Distribuição dos isolados de *Staphylococcus spp.* por amostra e hospital de origem.

Tipo de amostra	HU	HO	TOTAL
Sangue	41	13	54
Ponta de cateter	21	7	28
Líquido peritoneal	1	1	2
Secreção traqueal	16	6	22
Feridas	7	3	10
Secreções diversas	12	12	24
Urina	4	2	6
Tumor de fístula	0	1	1
Líquido ascítico	1	2	3
Fragmento de tecido	6	1	7
Secreção de parede torácica	0	1	1
Abscesso	4	2	6
Secreção ocular	1	0	1
Secreção de seroma	1	0	1
Secreção de linfonodo direito	1	0	1
Esperma	1	0	1
Secreção uretral	1	0	1
LCR	3	0	3
Lavado broncoalveolar	1	0	1
TOTAL	122	51	173

Tabela 3: Susceptibilidade antimicrobiana de isolados de *Staphylococcus spp.* de Hospital Universitário e Hospital Oncológico.

Antimicrobiano	HU		HO	
	Sensíveis	Resistentes	Sensíveis	Resistentes
Oxacilina	54	68	40	11
Cefoxitina	43	79	39	12
Vancomicina	120	2	51	0
Teicoplanina	118	4	43	8
Gentamicina	71	51	45	6
Eritromicina	54	68	33	18
Clindamicina	66	56	43	8
Tetraciclina	94	28	41	10
Sufametoxazol/trimetropim	84	38	49	2
Ciprofloxacino	107	15	42	9

Tabela 4: Susceptibilidade antimicrobiana a oxacilina e vancomicina em isolados de *Staphylococcus spp.* de hospital universitário e hospital oncológico.

Tipo de <i>Screening</i>	Resultado do teste	Hospital		Total
		HU	HO	
Oxacilina	Resistente	46	8	54
	Sensível	38	12	50
	Total	84	20	104
Vancomicina	Resistente	11	13	24
	Sensível	33	31	64
	Total	44	44	88

Tabela 5: Resultados das PCR para os genes *ermA* e *ermC* para os dois hospitais.

Hospital	Fenótipo							
	MLSB _c				MLSB _i			
	<i>ermA</i>	<i>ermA</i>	<i>ermC</i>	<i>ermC</i>	<i>ermA</i>	<i>ermA</i>	<i>ermC</i>	<i>ermC</i>
	positivo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo
HU	5	36	16	25	0	5	1	4
HO	0	8	1	7	0	6	0	6

Tabela 6: Resultados de PCR para os genes *blaZ*, *mecA*, *icaAD* e *hlg* para os dois hospitais.

Tipo de PCR	Resultados	Hospital	
		HU	HO
<i>blaZ</i>	Positivo	16	9
	Negativo	19	9
<i>mecA</i>	Positivo	8	14
	Negativo	39	4
<i>icaAD</i>	Positivo	3	9
	Negativo	9	19
<i>hlg</i>	Positivo	6	14
	Negativo	8	6

Quadro 2: Resultados para o valor de p para comparações entre as PCR para os genes de resistência para os dois hospitais.

PCR blaZ				PCR mecA			
Chi-Square Tests				Chi-Square Tests			
	Value	Df	Asymp. Sig. (2-sided)		Value	Df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	6,129 ^a	2	,047	Pearson Chi-Square	27,421 ^a	2	,000
Likelihood Ratio	6,219	2	,045	Likelihood Ratio	30,998	2	,000
N of Valid Cases	113			N of Valid Cases	125		
a. 0 cells (0,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 11,50.				a. 0 cells (0,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 8,98.			
PCR ermA				PCR ermC			
Chi-Square Tests				Chi-Square Tests			
	Value	Df	Asymp. Sig. (2-sided)		Value	Df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	8,098 ^a	2	,017	Pearson Chi-Square	10,147 ^a	2	,006
Likelihood Ratio	9,743	2	,008	Likelihood Ratio	12,096	2	,002
N of Valid Cases	141			N of Valid Cases	140		
a. 2 cells (33,3%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1,60.				a. 0 cells (0,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 5,97.			

Quadro 3: Resultados do valor de p para comparações entre PCR dos genes de virulência para os dois hospitais.

PCR icaAD					
Chi-Square Tests					
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	,204 ^a	1	,651		
Continuity Correction ^b	,006	1	,940		
Likelihood Ratio	,208	1	,648		
Fisher's Exact Test				,725	,479
N of Valid Cases	40				
a. 1 cells (25,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 3,60.					
b. Computed only for a 2x2 table					
PCR hlg					
Chi-Square Tests					
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	2,505 ^a	1	,113		
Continuity Correction ^b	1,510	1	,219		
Likelihood Ratio	2,514	1	,113		
Fisher's Exact Test				,163	,110
N of Valid Cases	34				
a. 0 cells (0,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 5,76.					
b. Computed only for a 2x2 table					

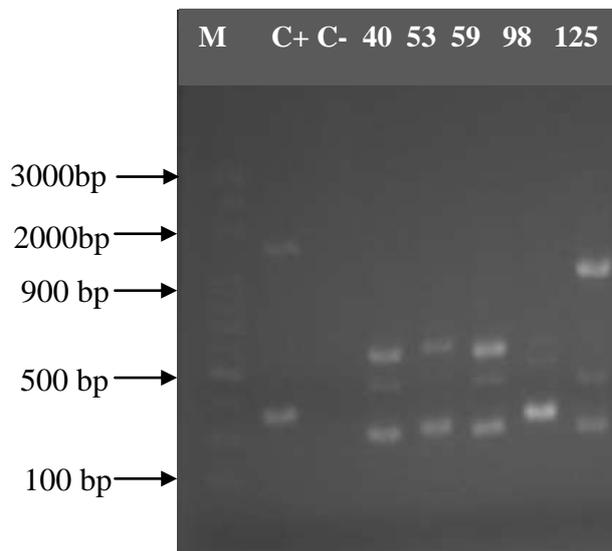


Figura 1: Gel de agarose 2% representativo da amplificação da PCR do tipo de *ccr*. Amostras positivas para *mecA*.

Nota: Linha M, marcador de peso molecular (100pb DNA *ladder*, Amresco). Linha C+, Controle positivo (*ccr3*, 1791 bp). Linha C-, Controle negativo.

RESISTÊNCIA À VANCOMICINA E FATORES DE RISCO DE INFECÇÃO POR *Staphylococcus* spp. EM PACIENTES ONCOLÓGICOS DA CIDADE DE RECIFE-PE

Introdução

As infecções relacionadas à assistência em saúde são altamente relevantes em termos epidemiológicos, no contexto da atenção à saúde, bem como na assistência hospitalar, porque contribuem para o aumento das taxas de morbidade e mortalidade e da extensão da permanência hospitalar dos pacientes, com consequente aumento dos custos do tratamento (Hirao et al., 2012). Indivíduos com atividade imunológica comprometida por condições, como câncer, transplante, hemodiálise e envelhecimento tornam-se frequentemente infectados com *Staphylococcus* spp. Bactérias gram-positivas são responsáveis por 60 a 70% dos episódios de infecção em pacientes com neutropenia e os microrganismos mais frequentes são *Staphylococcus* coagulase-negativo e *Enterococcus* vancomicina resistente (Cataneo et al., 2011). A infecção por *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) é problemática, pois a antibióticoterapia é muitas vezes difícil e resulta em falha porque este organismo apresenta resistência a diversos agentes antimicrobianos (Hirao et al., 2012; Quiles et al., 2015).

O aumento gradual na resistência dos microrganismos aos antimicrobianos usados na terapêutica antibacteriana contribuiu eficazmente para a infecção hospitalar que passou a ser considerado um problema de saúde pública, não só no Brasil, mas na maioria dos países em todo o mundo (Cataneo et al., 2011). Após o aparecimento de linhagens MRSA, o glicopeptídeo vancomicina tem sido umas das opções para o tratamento eficaz de infecções estafilocócicas durante as duas últimas décadas (Lutz et al., 2003; Sangappa & Thiagarajan, 2012; Van Hal et al., 2012).

Em pacientes com câncer, fatores de risco podem se sobrepor pois, além da supressão imune, eles são submetidos a tratamento cirúrgico, quimioterapia e/ou radioterapia. Neutropenia induzida pela quimioterapia representa um dos principais riscos de infecção nessa população (Cataneo et al., 2011; Costa et al., 2015). Esses pacientes, na maioria das vezes, utilizam antimicrobianos de espectro ampliado e são submetidos a inúmeros procedimentos invasivos (Cataneo et al., 2011).

Diante destas evidências, este estudo objetivou identificar a resistência a antimicrobianos que atuem na parede celular bacteriana e os fatores de risco mais prevalentes para infecção por *Staphylococcus* spp. em pacientes oncológicos da cidade do Recife-PE, no ano de 2013. Assim, a análise genética e microbiológica, permitirá o mapeamento de linhagens bacterianas através das características de internamento e fatores de resistência, o que facilitará traçar medidas de uso racional de antimicrobianos, e tratamento das infecções no hospital em estudo.

Materiais e métodos

Foi realizado um estudo observacional para correlacionar os fatores de risco associados à resistência aos antimicrobianos nos pacientes de hospital oncológico (Hospital do Câncer-HCP) da cidade do Recife, através de isolados bacterianos coletados durante o período de um ano.

Os dados clínicos foram obtidos através de consulta a prontuários médicos, utilizando formulário específico da pesquisa.

Os isolados coletados foram transportados em Ágar Casoy e incubados por 24 horas, e identificados por suas características macroscópicas em Ágar Sangue 5%, coloração de Gram, catalase, coagulase, DNase e teste de fermentação do Manitol (CLSI, 2014).

Susceptibilidade à oxacilina, cefoxitina e teicoplanina.

Teste de susceptibilidade a oxacilina, cefoxitina e teicoplanina dos isolados de *Staphylococcus* foi realizado pela técnica de disco-difusão em Ágar Mueller-Hinton (CLSI, 2014). Os resultados foram expressos em milímetros e interpretados de acordo com os padrões descritos no CLSI (CLSI, 2014).

Screening para Oxacilina e Vancomicina

Após a realização do antibiograma, foram feitos subcultivos de todos os isolados em placas de Ágar nutriente. Os isolados que apresentaram resistência a oxacilina e/ou cefoxitina foram submetidos à *screening* de oxacilina. Todos os isolados foram submetidos à *screening* de vancomicina. Após crescimento, foi feita suspensão direta das colônias de para obter uma turbidez equivalente a uma solução padrão 0,5 e 2,0 da escala de McFarland, respectivamente para os testes com oxacilina e vancomicina. Os testes foram realizados de acordo com Burnham et al., 2010, Howden et al., 2010 e CLSI, 2014. Foram utilizadas como controles de qualidade as cepas padrão para MRSA e MSSA: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 – Sensível e *Staphylococcus aureus* ATCC 33591 – Resistente e para vancomicina: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 – Sensível e *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 – Resistente (CLSI, 2014).

Microdiluição em caldo de vancomicina

Os isolados identificados como resistentes à vancomicina pelo teste de *screening* foram submetidos a microdiluição em caldo para obtenção da concentração inibitória mínima (MIC). Os experimentos foram realizados de acordo com os procedimentos padrões (CLSI, 2014) através da realização de diluições seriadas (de 128µg/mL a 1 µg/mL) em microplacas. Em cada diluição é feita a inoculação de 15µL da suspensão bacteriana, padrão 0,5 da escala de McFarland. Após a microplaca ser inoculada, incubou-se a 37°C por 24horas e por 48horas. A

leitura foi feita em ambos os tempos, a fim de detectar o crescimento bacteriano de todas as populações bacterianas presentes no inóculo da microplaca. O MIC é determinado como a menor concentração que não apresenta turvação, ou crescimento bacteriano (CLSI, 2014).

Foi utilizado como controle de qualidade as cepas padrão: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 – Sensível e *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 – Resistente (CLSI, 2014).

Extração de DNA total

Para a extração do DNA das amostras de *Staphylococcus* foi utilizada a técnica de Freitas et al.(2008) e o DNA dos isolados após a extração foi quantificado utilizando nanodrop 2000 (Thermo Scientific).

Identificação do gene *mecA* por PCR

Os isolados que apresentaram resistência a oxacilina e/ou cefoxitina por disco-difusão e/ou *screening* de oxacilina, foram submetidos à detecção do gene *mecA* por PCR.

Para a amplificação foram utilizados os *primers* descritos por Petinaki et al.(2001). As reações de PCR foram preparadas individualmente em um volume final de 25µL em cada tubo contendo: 20ng de DNA genômico, 20 pmol de cada primer, MgCl₂ 1,5 mM, dNTP 200 µM, 1U de Go Taq DNA polimerase (Promega, Brasil) e 5µL do tampão Green Go Taq DNA polimerase (Promega, Brasil). As reações foram realizadas em termociclador (Biometra), programado inicialmente para 35 ciclos térmicos, com desnaturação de um minuto a 94°C, anelamento de um minuto a 55°C e uma extensão de dois minutos a 72°C seguido de uma etapa de alongamento final de 15 minutos a 72°C. Foi utilizado como controle negativo, um tubo contendo todos os componentes da mistura e ausência de DNA molde. Para controle positivo foi utilizada a cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 33591 – Resistente.

Identificação do gene da betalactamase (*blaZ*) por PCR

Os isolados que apresentaram resistência a oxacilina e/ou cefoxitina por disco-difusão e/ou *screening* de oxacilina, foram submetidos à detecção do gene *blaZ* por PCR.

Para a amplificação do gene *blaZ* foram utilizados os *primers* descritos por Milheiriço et al.(2011). As reações de PCR foram preparadas individualmente em um volume final de 25µL em cada tubo contendo: 20ng de DNA genômico, 20 pmol de cada primer, 2,5 µL de MgCl₂ (25 mM), 2,5 µL dNTP (200 µM), 1U de Go Taq DNA polimerase (Promega, Brasil) e 5µL do tampão Green Go Taq DNA polimerase (Promega, Brasil). As reações foram realizadas em termociclador (Biometra), programado inicialmente para 30 ciclos térmicos, com desnaturação de um minuto a 92°C, anelamento de um minuto a 55°C e uma extensão de dois minutos a 72°C seguido de uma etapa de alongamento final de sete minutos a 72°C. Foi utilizado como controle negativo, um tubo contendo todos os componentes da mistura e ausência de DNA molde. Para controle positivo foi utilizado o isolado código 1171 do banco de culturas do Laboratório do Departamento de Microbiologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, o qual foi devidamente sequenciado.

Os produtos de todas as amplificações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% e corado com Blue-Green (LGC biotecnologia), visualizados em transluminador UV e digitalizados através do software Kodak 1D versão 3.5.2 (Scientific Imaging Systems, USA). O marcador de peso molecular é de 100bp (Invitrogen).

Considerações éticas

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Sociedade Pernambucana de Combate ao Câncer – CEP/SPCC (CAAE N° 05554812.7.0000.5205).

Análise dos dados

Os dados clínicos e microbiológicos foram introduzidos no software SPSS Statistics 20 para análise estatística, através da distribuição de frequências, teste χ^2 , teste de Fisher e teste de Mann-Whitney, adotando valor de $p < 0,05$.

Resultados

Foram coletados isolados de *Staphylococcus* spp. de 51 pacientes de hospital de oncologia da cidade do Recife-PE durante o ano de 2013. O tipo de amostra de origem mais frequente foi hemocultura, seguido de secreções como mostra a Tabela 1. Apenas quatro isolados, foram identificados como *Staphylococcus* coagulase negativo e os 47 restantes como *S. aureus* (Tabela 1).

Em relação aos antimicrobianos testados, observou-se que 23,5% dos isolados demonstraram ser resistentes à cefoxitina, 21,6% à oxacilina e 15,7% à teicoplanina (Tabela 2). Os 20 isolados que apresentaram resistência à oxacilina e/ou cefoxitina foram submetidos ao *screening* de oxacilina e 40% destes, demonstraram ser resistentes como apresentado na Tabela 2. Dentre os isolados submetidos ao *screening* de vancomicina, 13 (29,5%) foram identificados como resistentes (Tabela 2).

Os isolados que apresentaram resistência à oxacilina e/ou cefoxitina e/ou *screening* de oxacilina, foram submetidos a detecção dos genes *blaZ* e *mecA* por PCR. Dentre os isolados pesquisados, foram positivos em 50% (nove isolados) e 77,7% (14 isolados), respectivamente para o gene *blaZ* e *mecA* (Tabela 3).

Para a verificação de associação entre as variáveis, as mesmas foram classificadas em variáveis dependentes e variáveis independentes. Como variáveis dependentes classificou-se: *Screening* de oxacilina, *Screening* de vancomicina, gene *blaZ* e gene *mecA*. Estas variáveis

foram categorizadas como presente ou ausente, exceto as variáveis de *screening* de oxacilina e de vancomicina que foram categorizadas como sensível ou resistente.

As variáveis independentes para este estudo foram: Gênero, idade, Contagem total de leucócitos no período da infecção (mm^3), Contagem de neutrófilos no período da infecção, Uso de antimicrobiano nos últimos 3 meses antes do atual internamento, Uso de antimicrobiano durante o isolamento do patógeno, Uso de antimicrobianos durante o atual internamento, Evolução clínica (alta ou óbito), Acesso venoso central e Acesso venoso periférico. Para cada variável dependente, testou-se a associação com todas as variáveis independentes. De acordo com os dados obtidos, observou-se que não ocorre diferenças significativas de idade, gênero, contagem total de leucócitos no período da infecção (mm^3), uso de antimicrobiano nos últimos 3 meses antes do atual internamento, uso de antimicrobiano durante o isolamento do patógeno, uso de antimicrobianos durante o atual internamento, evolução clínica, presença de acesso venoso central e presença de acesso venoso periférico quando comparados os indivíduos infectados *Staphylococcus* spp. positivos para o gene *mecA* e indivíduos infectados *Staphylococcus* spp. negativos para o gene *mecA*. O mesmo sendo observado para a presença do gene *blaZ*. A mesma inferência pode ser feita para os resultados de associações com o *screening* de oxacilina e *screening* de vancomicina.

Houve diferença significativa quando comparados os indivíduos infectados *Staphylococcus* spp. positivos para o gene *mecA* e os indivíduos infectados *Staphylococcus* spp. negativos para o gene *mecA* em relação a contagem de neutrófilos no período da infecção. Também observou-se diferença significativa quando comparados os indivíduos infectados *Staphylococcus* spp. com *screening* de vancomicina resistentes e os indivíduos infectados *Staphylococcus* spp. com *screening* de vancomicina sensíveis em relação a contagem total de leucócitos no período da infecção (mm^3) (Tabela 4).

Observou-se 13 isolados resistentes através da técnica de *screening* de vancomicina, sendo eles submetidos a microdiluição em caldo. Na primeira leitura, com 24 horas, todos os isolados demonstraram ser sensíveis (Quadro 1). Na segunda leitura, com 48 horas, um isolado apresentou MIC de 4 µg/mL (Quadro 1). Não foram obtidos os dados a respeito de três destes pacientes (Quadro 1). Todos esses pacientes utilizaram algum tipo de antimicrobiano durante o internamento e no período de isolamento do *Staphylococcus* spp. e em 80% destes, o mesmo antimicrobiano utilizado nas duas situações (Quadro 1). O fármaco Piperacilina+tazobactam foi o antimicrobiano prescrito na maioria dos casos estudados e apenas dois pacientes fizeram o uso de vancomicina em algum período (Quadro 1).

Discussão

Em pacientes com neoplasias malignas, a bacteremia muitas vezes resulta de infecção com um ou mais microrganismos, predominantemente membros da família Enterobacteriaceae, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus* e *Staphylococcus* (Cataneo et al., 2011; Quiles et al., 2015). Ao longo das últimas três décadas, a proporção de microrganismos Gram positivos aumentou, por causa do uso generalizado de cateteres permanentes (Montassier et al., 2013). Em relação ao uso de cateter vascular central, *S. aureus* e *Staphylococcus* coagulase negativo (SCoN) são os microrganismos mais frequentemente isolados, representando 30% cada (Bustamante & Espinola, 2007; Muldrew et al., 2008; Schaefer et al., 2009).

Neste estudo, observou-se maior frequência de *S. aureus* em relação aos isolados identificados como *Staphylococcus* coagulase negativo (SCoN), provenientes principalmente de hemocultura e ponta de cateter com percentuais de 25,5% e 13,7%, respectivamente. Estudos relatam que os principais sítios de isolamento deste microrganismo em pacientes com câncer são sangue e cateter (Cataneo et al., 2011; Montassier et al., 2013; Quiles et al., 2015).

Em relação ao teste de susceptibilidade antimicrobiana, observou-se a presença de isolados resistentes à teicoplanina. A teicoplanina é muitas vezes utilizada como alternativa à vancomicina e a resistência à mesma é por vezes relacionada como preditor da resistência aos glicopeptídeos (CLSI, 2014; Byrne et al., 2015). Um estudo retrospectivo avaliou a nefrotoxicidade da teicoplanina em diversas concentrações em pacientes com doenças malignas hematológicas, considerando-a um boa opção para este grupo de pacientes (Byrne et al., 2015).

A partir dos testes fenotípicos, selecionou-se isolados resistentes para a detecção dos genes *blaZ* e *mecA* por PCR, sendo encontradas 50% e 77,7% de amostras positivas respectivamente. Alguns estudos mostraram que a taxa de produção da betalactamase varia de 55,7% a 92,6% para estafilococos (Oliveira et al., 2011; Samant & Pai, 2012), estando nossos resultados dentro destes limites. Oliveira et al (2011) encontraram alta prevalência de betalactamase em seus isolados (83%) e chamaram a atenção para o uso indiscriminado de antimicrobianos, o que gera resistência a diversas classes destes fármacos e um risco em potencial para a saúde pública. Um estudo realizado na Índia por Prabhash et al.(2010) relatou uma taxa de 18% de *S. aureus* resistentes à metilina isolados de pacientes com câncer. Outro estudo realizado na Coreia do Sul por Kang et al.(2012), relatou prevalência de MRSA relacionado com bacteremia em pacientes oncológicos de 48,4%, percentual inferior ao encontrado em nosso trabalho, demonstrando que a frequência de infecção por *S. aureus* neste grupo de pacientes é variável em todo o mundo.

Neste estudo, observamos a presença de amostras resistentes à metilina apenas pelos métodos fenotípicos, o que sugere a presença de outros mecanismos de resistência ou a não expressão dos genes pesquisados (Petinaki et al., 2001; Milheiriço et al., 2011; Sangappa & Thiagarajan, 2012; CLSI, 2014).

Dentre os isolados submetidos ao *screening* de vancomicina, observou-se que 29,5% dos isolados testados foram identificados como resistentes, de acordo com o Comitê Brasileiro de Testes de Sensibilidade aos Antimicrobianos (Br CAST, 2015). Os estafilococos com resistência aos glicopeptídeos foram recentemente encontrados no Brasil, sendo registrado o isolamento de *S. aureus* com resistência à vancomicina em São Paulo (Rossi et al., 2014; Panesso et al., 2015).

Outro estudo realizado anteriormente em um hospital universitário, relatou 11% dos isolados resistentes utilizando o método de *screening*, entretanto apenas foram testadas amostras consideradas MRSA (Rabelo et al., 2014). Estudos indicam que a resistência à vancomicina deve ser determinada por técnicas sensíveis tais como *screening*, E-test, microdiluição e a detecção do gene (Burnham et al., 2010; Howden et al., 2010; CLSI, 2014; Rossi et al., 2014; Navarini et al., 2015; Panesso et al., 2015). Estudo realizado por Navarini et al.(2015) avaliou a precisão de teste de *screening* de concentração de 2mg/L em comparação com microdiluição em caldo e Etest™ para a detecção de isolados de *S. aureus* com uma possível diminuição da susceptibilidade à vancomicina, com boa acurácia (Navarini et al., 2015).

A ineficácia do tratamento com vancomicina em pacientes oncológicos é frequente nas infecções por *Enterococcus* spp. (Schaefer et al., 2009; Cataneo et al., 2011; Montassier et al., 2013; Quiles et al., 2015). No entanto, dados a respeito de infecção por *Staphylococcus* spp. resistentes à vancomicina ainda são considerados escassos, especialmente nesse grupo de pacientes.

De acordo com os dados obtidos, as diferenças estatisticamente significantes ocorreram quando comparou-se os indivíduos infectados *Staphylococcus* spp. que albergavam o gene *mecA* e os indivíduos infectados com *Staphylococcus* spp. sem o gene *mecA* em relação a contagem de neutrófilos no período da infecção. Também observou-se diferença significativa

quando comparados os indivíduos infectados *Staphylococcus* spp. resistentes e não resistentes à vancomicina pela técnica de *screening* em relação a contagem total de leucócitos no período da infecção (mm^3).

A neutropenia é frequentemente relatada como fator de risco para colonização por diversos microrganismos, aumento do tempo de hospitalização e óbito em pacientes com algum tipo de oncologia (Santolaya et al., 2004; Bucaneve et al., 2005; Cagol et al., 2009; Schaefer et al., 2009; Kabalan et al., 2010; Paul et al. 2010; Cataneo et al., 2011; Freifeld et al., 2011; Kang et al., 2012; Montassier et al., 2013; Costa et al., 2015; Quiles et al., 2015).

Por outro lado, o gene *mecA* está relacionado com a presença da resistência a meticilina (Petinaki et al., 2001; Sangappa & Thiagarajan, 2012; CLSI, 2014; Panesso et al., 2015) e a terapêutica com vancomicina é frequentemente administrada em pacientes com infecções graves e em pacientes que apresentam resistência aos demais antibióticos (Lutz et al., 2003; Burnham et al., 2010; Howden et al., 2010; CLSI, 2014; Rossi et al., 2014; Panesso et al., 2015). Esses fatos parecem corroborar para a associação entre esses fatores encontrada neste estudo. Os fatores de risco para infecção neste grupo de pacientes são mais expressivos, pois além do imunocomprometimento causado pela própria patologia, eles são submetidos a tratamento cirúrgico, quimioterápico e/ou radioterápico, sendo a neutropenia um dos maiores riscos para infecção nesta população (Costa et al., 2015). Existem evidências de que pacientes neutropênicos de baixo risco não necessitam necessariamente hospitalização e antibioticoterapia de amplo espectro prolongados para infecções invasivas bacterianas. As estratégias para esse grupo incluem tratamentos antimicrobianos de curta duração com consequente redução do período de hospitalização e manejo ambulatorial com uso de antibióticos orais (Santolaya et al., 2004; Cagol et al., 2009).

Dentre os isolados considerados resistentes à vancomicina pelo método de *screening* um isolado apresentou MIC de 4 $\mu\text{g/mL}$. A concentração inibitória mínima (MIC) de

vancomicina é de 8 µg/mL, no entanto outros isolados *S. aureus* com menor MIC da vancomicina (4 µg/mL) podem também ser resistentes *in vivo* (Lutz et al., 2003; CLSI, 2014). A presença de tais organismos pode explicar a falha de vancomicina para tratar algumas infecções por MRSA (Lutz et al, 2003;. CLSI, 2014). Estudo relata que a principal característica destes isolados é exibir susceptibilidade diminuída à vancomicina *in vivo*, após uma exposição prolongada à droga (Lutz et al., 2003). O paciente em questão, em nosso estudo, não fez uso de vancomicina em seu tratamento, evoluindo para alta hospitalar, não sendo possível fazer esse tipo de associação no mesmo. É sugerido que a falha do tratamento terapêutico com vancomicina está associada com baixo nível de resistência, ou heteroresistência, à vancomicina (Lutz et al., 2003 Van Hal et al., 2012).

A efetiva identificação do agente causador e a escolha correta da terapia antimicrobiana são cruciais para reduzir a mortalidade em pacientes com câncer acometidos por infecções bacterianas.

Tabelas

Tabela 1: Distribuição dos isolados de *Staphylococcus spp.* por tipo de amostra e por espécie.

Tipo de Amostra	<i>S.aureus</i>	SCoN	Total
Sangue	12	1	13
Ponta de cateter	6	1	7
Líquido peritoneal	1	0	1
Secreção traqueal	6	0	6
Feridas	3	0	3
Secreções diversas	10	0	10
Urina	1	1	2
Secreção vaginal	1	0	1
Tumor de fístula	1	0	1
Líquido ascítico	1	1	2
Tecido mole do braço	1	0	1
Secreção de parede torácica	1	0	1
Abscesso	2	0	2
Secreção de mama	1	0	1
TOTAL	47	4	51

Tabela 2: Susceptibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus* spp provenientes de pacientes oncológicos.

Teste de susceptibilidade antimicrobiana	Resultado do teste	
	Sensível	Resistente
Disco-difusão com Oxacilina	40	11
Disco-difusão com Cefoxitina	39	12
Disco-difusão com Teicoplanina	43	8
Screening de oxacilina	12	8
Screening de vancomicina	31	13

Tabela 3: Resultados das PCR para os genes *blaZ* e *mecA*.

Tipo de PCR	Resultado	Quantidade de isolados
<i>blaZ</i>	Positivo	9
	Negativo	9
<i>mecA</i>	Positivo	14
	Negativo	4

Tabela 4: Variáveis clínicas e demográficas dos pacientes do hospital do câncer no ano de 2013.

Variáveis	N	%
Gênero		
Masculino	20	
Feminino	31	
Total	51	100
Idade (anos)		
Média	48,76	
Mediana	52,50	
Desvio padrão	13,157	
Range(mínimo-máximo)	10-67	
Contagem total de leucócitos no período da infecção (mm³)		
Média	11411,86	
Mediana	9200,00	
Desvio padrão	10318,853	
Range(mínimo-máximo)	600-51200	
Contagem de neutrófilos no período da infecção		
Média	8712,18	
Mediana	6730,50	
Desvio padrão	9133,374	
Range(mínimo-máximo)	90-43520	
Uso de antimicrobiano nos últimos 3 meses antes do atual internamento		
Sim	4	11,77
Não	30	88,23
Uso de antimicrobiano durante o isolamento do patógeno		
Sim	27	79,41

Não	7	20,59
Uso de antimicrobianos durante o atual internamento		
Sim	27	79,41
Não	7	20,59
Evolução clínica		
Alta	20	58,82
Óbito	14	41,18
Ventilação mecânica		
Sim	7	20,59
Não	27	79,41
Acesso venoso central		
Sim	13	38,23
Não	21	61,77
Acesso venoso periférico		
Sim	25	73,53
Não	9	26,47
Sonda vesical		
Sim	18	52,94
Não	16	47,06

Quadro 1: Características das amostras do hospital do câncer no ano de 2013, relacionadas ao perfil de susceptibilidade à vancomicina.

Amostra	Microorganismo	Microdiluição 24 hs	Microdiluição 48 hs	Uso de antimicrobiano durante o atual internamento	Uso de antimicrobiano durante o isolamento do patógeno	Desfecho clínico	Tipo de tumor
Ponta de cateter	<i>S. aureus</i>	1µg/mL	2µg/mL	Oxacilina	Oxacilina	Alta	Carcinoma ductal invasivo
Secreção tibia	<i>S. aureus</i>	1µg/mL	4µg/mL	Cefalotina	Cefalotina	Alta	Tumor na tibia proximal direita
Sangue	<i>S. aureus</i>	1µg/mL	2µg/mL	Piperacilina+tazobactam	Piperacilina+tazobactam	óbito	Tumor primário de língua com disseminação para pescoço
Sangue	<i>S. aureus</i>	1µg/mL	2µg/mL	Piperacilina+tazobactam	Piperacilina+tazobactam	Alta	Adenocarcinoma com diferenciação em canal anal
Sangue	<i>S. aureus</i>	1µg/mL	2µg/mL	Piperacilina+tazobactam	Piperacilina+tazobactam	óbito	Carcinoma ductal mama direita
Tibia proximal esquerda	<i>S. aureus</i>	1µg/mL	1µg/mL	Ceftazidima	Ceftazidima	Alta	Tumor na tibia
Secreção traqueal	<i>S. aureus</i>	1µg/mL	2µg/mL	Piperacilina+tazobactam e Vancomicina	Piperacilina+tazobactam	Alta	Adenocarcinoma de endométrio
Abscesso	<i>S. aureus</i>	1µg/mL	1µg/mL	Meropenem	Piperacilina+tazobactam eVancomicina	óbito	Neoplasia de colo uterino
Sangue	<i>S. aureus</i>	1µg/mL	1µg/mL	Piperacilina+tazobactam	Piperacilina+tazobactam	óbito	CEC de língua
Sangue	SCoN	1µg/mL	1µg/mL	Piperacilina+tazobactam	Piperacilina+tazobactam	óbito	Tumor de ovário esquerdo com metástase pulmonar

6 CONCLUSÕES

- *S. aureus* é mais prevalente nas amostras de hemocultura de ambos hospitais.
- Os testes de susceptibilidade antimicrobiana revelaram maior percentual de isolados sensíveis.
- Existem isolados resistentes à vancomicina identificados pelo *screening* de vancomicina, em ambos os hospitais.
- A frequência de isolados positivos para os genes *blaZ* e *mecA* foi maior no hospital de oncologia que no hospital universitário.
- O fenótipo MLSB_c foi predominante em relação ao fenótipo MLSB_i em ambos hospitais.
- A presença do gene *ermC* foi maior que o gene *ermA* no Hospital das Clínicas e não foram encontrados isolados positivos para o gene *ermA* no Hospital do Câncer.
- Existem mais isolados positivos para o gene *hlg* no hospital oncológico que no hospital universitário.
- A frequência de isolados positivos para *icaAD* foi considerada abaixo dos limites da literatura em ambos hospitais.
- Não foi observada diferença estatisticamente significativa na presença dos genes de resistência *blaZ*, *mecA*, *ermA* e *ermC* quando comparou-se os dois hospitais.
- Existe diferença estatisticamente significativa em relação aos genes de virulência ao compararmos os dois hospitais.
- Dos isolados positivos para o gene *mecA*, provenientes do Hospital das Clínicas, submetidos a PCR para identificação do *ccr complex*, observou-se maior frequência de *ccr* tipo I.
- Não ocorre diferenças significativas de idade, gênero, contagem total de leucócitos no período da infecção (mm³), uso de antimicrobiano nos últimos 3 meses antes do atual internamento, uso de antimicrobiano durante o isolamento do patógeno, uso de antimicrobianos durante o atual internamento, evolução clínica, presença de acesso venoso central e presença de acesso venoso periférico quando comparados os indivíduos com PCR para o gene *mecA* positivos e indivíduos com PCR para o gene *mecA* negativos. O mesmo sendo observado para as presenças dos genes *blaZ*, *icaAD* e *hlg*. A mesma inferência pode ser feita para os resultados de associações com o *screening* de oxacilina e *screening* de vancomicina quando observamos os dados dos pacientes de oncologia.

- Nos pacientes de oncologia, ocorre diferença estatisticamente significativa quando comparados os indivíduos infectados com *Staphylococcus* spp. com PCR positiva para o gene *mecA* e os indivíduos infectados com *Staphylococcus* spp. com PCR negativa para o gene *mecA* em relação a contagem de neutrófilos no período da infecção. Também observou-se que ocorre diferença significativa quando comparados os indivíduos infectados com *Staphylococcus* spp. com *screening* de vancomicina resistente e os indivíduos infectados com *Staphylococcus* spp. com *screening* de vancomicina sensível em relação a contagem total de leucócitos no período da infecção (mm^3). Essas diferenças não foram observadas para os demais genes.
- A condição do paciente parece estar ligada ao potencial patogênico do microrganismo.

REFERÊNCIAS

- http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/sas/2010/cop0007_11_02_2010.html acesso em 14/10/15
 - http://www.sccmec.org/Pages/SCC_TypesEN.html, acesso 25/11/15.
 - <http://www.sciencephoto.com>, acesso 24/10/2015.
- ADALETI, R.; NAKIPOGLU, Y.; CERAN, N.; TASDEMIR, C.; KAYA, F.; TASDEMIR, S. Prevalence of phenotypic resistance of *Staphylococcus aureus* isolates to macrolide, lincosamide, streptogramin B, ketolid and linezolid antibiotics in Turkey. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**. v.14, n.1, p.11-14, 2010.
- ALMEIDA, G. C. M., SANTOS, M. M., LIMA, N. G. M., CIDRAL, T. A., MELO, M. C. N, LIMA, K. C. Prevalence and factors associated with wound colonization by *Staphylococcus* spp. and *Staphylococcus aureus* in hospitalized patients in inland northeastern Brazil: a cross-sectional study. **BMC Infectious Diseases**. v.14, p.328, 2014.
- ARAÚJO, S. Acessos venosos centrais e arteriais periféricos – Aspectos técnicos e práticos. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**. São Paulo.v.15, n.2, p.70-82, 2003.
- ARCHER, G.L.*Staphylococcus aureus*: a well-armed pathogen. **Clinical Infectious Diseases**.v.26, p.1179-1181, 1998.
- BARBIERI, R.; PESCE, M.; FRANCHELLI, S.; BALDELLI, I.; MARIA, A.; MARCHESE, A. Phenotypic and genotypic characterization of Staphylococci causing breast peri-implant infections in oncologic patients. **BMC Microbiology**. v.15, p.26, 2015.
- BENICIO, C.G.; REIS, C.; PIMENTA, F.C. Isolamento e contagem de *Staphylococcus sp* na saliva de acadêmicos de Medicina. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**. v.7, n.1, p.91, 2003.

BERGER-BÄCHI, B. Factors affecting methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v.6, p.13-21, 1995.

BERGER-BACHI, B.; ROHRER, S. Factors influencing methicillin resistance in staphylococci. **Archives of Microbiology**. v.178, n.3, p.165-171, 2002.

BHATTACHARYA, D.; CARLETON, H.; TSAI, C.J.; BARON, E.J.; PERDREAU-REMYNTO, F. Differences in clinical and molecular characteristics of skin and soft tissue methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates between two hospitals in Northern California. **Journal of Clinical Microbiology**. v.45, n.6, p.1798-1803, 2007.

BLOMQUIST, S.; LEONHARDT, A.; ARIRACHAKARAN, P.; CARLEN, A.; DAHLEN, G. Phenotype, genotype, and antibiotic susceptibility of Swedish and Thai oral isolates of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Oral Microbiology**. v.7, p.26250, 2015.

BRAGA, E. D. V., AGUIAR-ALVES, F., FREITAS, M. F. N., SILVA, M. O., CORREA, T. V., SNYDER, R., ARAÚJO, V. A., MARLOW, M. A., RILEY, L. W., SETÚBAL, S., SILVA, L. E., ARAÚJO, C. A. High prevalence of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* colonization among healthy children attending public daycare centers in informal settlements in a large urban center in Brazil. **BMC Infectious Diseases**. v.14, p.538, 2014.

BUCANEVE, G.; MIOZZI, A.; MENICHETTI, F.; MARTINO, P.; DIONISI, M.S.; MARTINELLI, G.; ALLIONE, B.; D'ANTONIO, D.; BUELLI, M.; NOSARI, A.M.; CILLONI, D.; ZUFFA, E.; CANTAFFA, R.; SPEHIA, G.; AMADORI, S.; FABBIANO, F.; DELILIERIS, G.L.; LAURIA, F.; FOA, R.; DEL FAVERO, A. A levofloxacin to prevent bacterial infection in patients with cancer and neutropenia. **The New England Journal of Medicine**. v.353, n.10, p.977-987, 2005.

BURNHAM, C.A.D.; WEBER, C.J.; DUNNE JR, W.M. Novel screening agar for detection of vancomycin-nonsusceptible *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**. v.48, n.3, p. 949–951, 2010.

BUSH, K.; JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.39,n.6, p.1211-1233, 1995

BUSTAMANTE, R.; ESPINOLA, V. Informe de vigilância epidemiológica de infecciones intrahospitalarias. Unidad de infecciones intrahospitalarias. Departamento de Calidad em Salud Subsecretaria de redes asistenciales, **MINSAL**, Chile 2007.

CAFISO, V.; BERTUCCIO, T.; SANTAGATI, M.; CAMPANILE, F.; AMICOSANTE, G.; PERILLI, M.G.; SELAN, L.; ARTINI, M.; NICOLETTI, G.; STEFANI, S. Presence of *ica* operon in clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* and its role in biofilm production. **Clinical Microbiology and Infection**.v.10, n.12, p.1081-1088, 2004.

CAGOL, A.R.; CASTRO JUNIOR, C.G.; MARTINS, M.C.; MACHADO, A.L.; RIBEIRO, R.C.; GREGIANIN, L.J.; BRUNETTO, A.L. Oral vs. intravenous empirical antimicrobial therapy in febrile neutropenic patients receiving childhood cancer chemotherapy. **Jornal de Pediatria**. v.85, n.6, p.531-535, 2009.

CASADEWALL, B.; REYNOLDS, P. E.; COURVALIN, P. Regulation of expression of the *vanD* glycopeptide resistance gene cluster from *Enterococcus faecium* BM4339. **Journal of Bacteriology**. v.183, n.11, p.3436-3446, 2001.

CASSETARI, V.C.; STRABELLI, T.; MEDEIROS, E.A.S. *Staphylococcus aureus* bacteremia: what is the impact of oxacilin resistance on mortality? **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**. v.9, n.1, p.70-76, 2005.

CATANEO, C.; CANINI, S.R.M.S.; CASTRO, P.T.O.; HAYASHIDA, M.; GIR, E. Avaliação da sensibilidade e da especificidade dos critérios para isolamento de pacientes admitidos em um hospital especializado em oncologia. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**. v.19, n.5, p.1072-1079, 2011.

CAVALCANTE, N.J.F. Infecção em paciente imunologicamente comprometido. In: Fernandes AT. Infecção hospitalar e suas interfaces na área da saúde. São Paulo-SP: **Atheneu**. p. 670-682, 2000.

CAVALCANTI, A.B.; GONÇALVES, A.R.; ALMEIDA, C.S.; BUGANO, D.D.G.; SILVA, E. Teicoplanin versus vancomycin for proven or suspected infection(Review). **The Cochrane Library**. Issue 6, 2010.

CHAMBERS, H.F. Methicillin resistance in Staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. **Clinical Microbiology Reviews**. v.10, n.4, p.781-791, 1997.

CHAMBERS, H. F. Antimicrobianos. In: BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. **Goodman e Gilman. As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 10 ed. Porto Alegre: Artmed, p. 929-953, 2010.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, twenty-fourth informational supplement, document M100-S24. Wayne, PA, USA: **CLSI**, 2014

COELLO, R., GLYNN, J.R., GASPAR, C., PICAZO, J.J., FERERES, J. Risk factors for developing clinical infection with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*(MRSA) amongst hospital patients initially only colonized with MRSA. **The Journal of Hospital Infection**. v.37, n.1, p.39-46, 1997.

CONCEIÇÃO, T.; TAVARES, A.; MIRAGAIA, M.; HYDE, K.; AIRES-DE-SOUSA, M.; DE LENCASTRE, M. Prevalence and clonality of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in the Atlantic Azores islands: predominance of SCCmec types IV, V and VI. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**. v.29, n.5, p.543–550, 2010.

CORBELLA, X.; DOMINGUEZ, M.A., PUJOL, M., AYATS, J., SENDRA, M., PALLARES, R., ARIZA, J., GUDIOL, F. *Staphylococcus aureus* nasal carriage as a marker

for subsequent staphylococcal infections in intensive care unit patients. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**. v.16, n.5, p.351-357, 1997.

COSTA, P. O.; ATTA, E. H.; SILVA, A. R. A. Infection with multidrug-resistant gram-negative bacteria in a pediatric oncology intensive care unit: risk factors and outcomes. **Jornal de Pediatria**. v.91, n.5, p.435-441, 2015.

COUTINHO, V. L. S.; PAIVA, R. M.; REITER, K. C.; DE-PARIS, F.; BARTH, A. L.; MACHADO, A. B. M. P. Distribution of *erm* genes and low prevalence of inducible resistance to clindamycin among *staphylococci* isolates. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**. v.14, n.6, p.564-568, 2010.

CUNHA, M.L.R.S.; CALSOLARI, R.A.O. Toxigenicity in *Staphylococcus aureus* and Coagulase negative Staphylococci: epidemiological and molecular aspects. **Microbiology Insights**. v.1, p.13-24, 2008.

CUNY, C.; LAYER, F.; STROMMENGER, B.; WITTE, W. Rare occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC130 with a novel *mecA* homologue in humans in Germany. **PLoS ONE**. v.6, n.9, p.e24360, 2011.

DAS, I.; O'CONNELL, N.; LAMBERT, P. Epidemiology, clinical and laboratory characteristics of *Staphylococcus aureus* bacteraemia in a university hospital in UK. **The Journal of Hospital Infection**. v.65, p.117-123, 2007.

DAUM, R.S.; ITO, T.; HIRAMATSU, K.; HUSSAIN, F.; MONGKOLRATTANOTHAI, K.; JAMKLANG, M.; BOYLE-VAVRA, S. Novel methicillin-resistance cassette in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates of diverse genetic backgrounds. **The Journal of Infectious Diseases**. v.186, n.9, p.1344-1347, 2002.

DAUM, R.S. Skin and soft-tissue infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **The New England Journal of Medicine**. v.357, n.4, p.380-390, 2007.

DE SILVA, G.D.; KANTZANO, M., JUSTICE, A.; MASSEY, R.C.; WILKINSON, A.R.; DAY, N.P.; PEACOCK, S.J. The *ica* operon and biofilm production in coagulase-negative staphylococci associated with carriage and disease in a neonatal intensive care unit. **Journal of Clinical Microbiology**. v.40, n.2, p.382-388, 2002.

DEURENBERG, R.H.; STOBBERINGH, E.E. The evolution of *Staphylococcus aureus*. **Infection, Genetics and Evolution**. v.8, n.6, p.747-763, 2008.

DICKINSON, T.M; ARCHER, G.L. Phenotypic expression of oxacillin resistance in *Staphylococcus epidermidis*: roles of *mecA* transcriptional regulation and resistant-subpopulation selection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.44, n.6, p.1616-1623, 2000.

DUARTE, C.O.; DE LENCASTRE, H. Multiplex PCR Strategy for Rapid Identification of Structural Types and Variants of the *mec* Element in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.46, p.2155-2161, 2002.

ENRIGHT, M.C.; ROBINSON, D.A.; RANDLE, G.; FEIL, E.J.; GRUNDMANN, H.; SPRATT, B.G. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v.99, n.11, p.7687-7692, 2002.

EVEILLARD, M.; MARTIN, Y.; HIDRI, N.; BOUSSOUGANT, Y.; JOLY-GUILLOU, M.L. Carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among hospital employees: prevalence, duration, and transmission to households. **Infection Control and Hospital Epidemiology**. v.25, n.2, p.114-120, 2004.

EUZÉBY, J.P. List of bacterial names with standing in nomenclature; a folder available on the internet. **International Journal Systematic Bacteriology**,v.47, p.590-592, 1997. (List of prokaryotic names with standing nomenclature. <http://www.bacterio.net>, atualizado em novembro 2015)

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

FERREIRA, R.B.R.; NUNES, A.P.F.; KOKIS, V.M.; KREPSKY, N.; FONSECA, L.S.; BASTOS, M.C.F.; MARVAL, M.G.; SANTOS, K.R.N. Simultaneous detection of the *mecA* and *ileS-2* genes in coagulase-negative staphylococci isolated from Brazilian hospitals by multiplex PCR. **Diagnostic microbiology and infectious disease**. v.42, n.3, p.205-212, 2002.

FERREIRA, R.B.R.; IORIO, N.L.P.; MALVAR, K.L.; NUNES, A.P.F.; FONSECA, L.S.; BASTOS, C.C.R.; SANTOS, K.R.N. Coagulase-negative Staphylococci: comparison of phenotypic and genotypic oxacilin susceptibility tests and evaluation of the Agar screening test by using different concentration of oxacilin. **Journal of Clinical Microbiology**. v.41, n.8, p.3609-3614, 2003.

FLOCK, J.I.; HIENZ, S.A., HEIMDAHL, A., SCHENNINGST, T. Reconsideration of the role of fibronectin binding in endocarditis caused by *Staphylococcus aureus*. **Infection and Immunity**. v.64, n.5, p.1876-1878, 1996.

FOKA, A.; CHINI, V.; PETINAKI, E.; KOLONITSIOU, F.; ANASTASSIOU, E.D.; DIMITRACOPOULOS, G.; SPILIOPOULOU, I. Clonality of slime-producing methicillin-resistant coagulase-negative *Staphylococci* disseminated in the neonatal intensive care unit of a university hospital. **Clinical Microbiology and Infection**. v.12, n.12, p.1230–1233, 2006.

FRANÇA, CA.; PEIXOTO, RM.; CAVALCANTE, MB.; MELO, NF.; OLIVEIRA, CJB.; VESCHI, JÁ.; MOTA, RA.; COSTA, MM. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus* spp. from small ruminant mastitis in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.32, n.8, p.747-753, 2012.

FREITAS, M.F.L.; LUZ, I.S.; SILVEIRA-FILHO, V.M.; JÚNIOR, J.W.P.; STAMFORD, T.L.M.; MOTA, R.A.; SENA, M.J.; ALMEIDA, A.M.P.; BALBINO, V.Q.; LEAL-

BALBINO, T.C. Staphylococcal toxin genes in strains isolated from cows with subclinical mastitis. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.28, n.12, p.617-621, 2008.

FREIFELD, A. G.; BOW, E. J.; SEPKOWITZ, K. A.; BOECKH, M. J.; ITO, J. I.; MULLEN, C. A.; RAAD, I. I.; ROLSTON, K. V.; YOUNG, J. A.; WINGARD, J. R. Clinical practice guideline for the use of antimicrobial agents in neutropenic patients with cancer: 2010 Update by the Infectious Diseases Society of America. **Infectious Diseases Society of America**. v.52, n.4, p.427-431, 2011.

FRIDKIN, S.K.; HAGEMAN, J.C.; MORRISON, M.; SANZA, L.T.; COMO-SABETTI, K.; JERNIGAN, J. A.; HARRIMAN, K.; HARRISON, L. H.; LYNFIELD, R.; FARLEY, M. M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in three communities. **The New England Journal of Medicine**. v.352, n.14, p.1436-1444, 2005.

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

GIESBRECHT, P.; KERSTEN, T.; MAIDHO, H.; WECKE, J. Staphylococcal cell wall: morphogenesis and fatal variations in the presence of penicillin. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v.62, n.4, p.1371-1414, 1998.

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

GRAVET, A.; RONDEAU, M.; MONTÉIL, C.H.; GRUNEMBERGER, F.; MONTEIL, H.; SCHEFTEL, J.M.; PRÉVOST, G. Predominant *Staphylococcus aureus* isolated from antibiotic-associated diarrhea is clinically relevant and produces enterotoxin A and the bicomponent toxin *lukE-lukD*. **Journal of Clinical Microbiology**. v.37, n.12, p.4012-4019, 1999.

HACKBARTH, C.J.; KOCAGOZ, T.; KOCAGOZ, S.; CHAMBERS, H. F. Point mutation in *Staphylococcus aureus* PBP2 gene affect penicillin-binding kinetics and are associated with resistance. **Antimicrobial Agents and Chemoterapy**. v.39, n.1, p.103-106, 1995.

HIGUCHI , W.; TAKANO,T.; TENG, L.J.; YAMAMOTO, T. Structure and specific detection of staphylococcal cassette chromosome *mec* type VII. **Biochemical and biophysical research communications**. v.377, n.3, p.752-756, 2008.

HIRAMATSU, K. Vancomycin resistance in staphylococci. **Drug Resistance Updates**. v.1, n.2, p.135-150, 1998.

HIRAMATSU, K.; ITO, T.; HANAKI, H. Mechanisms of methicillin and vancomycin in *Staphylococcus aureus*. **Ballière's Clinical Infectious Diseases**.v.5, p.221-242, 1999.

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

HIRAMATSU, K.; WATANABE, S.; TAKEUCHI, F.; ITO, T.; BABA, T. Genetic characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Vaccine**. v.22, n.1, p.5-8, 2004.

HIRAMATSU, K.; ITO, T.; TSUBAKISHITA, S.; SASAKI, T.; TAKEUCHI, F.; MORIMOTO, Y.; KATAYAMA, Y.; MATSUO, M.; KUWAHARA-ARAI, K.; HISHINUMA, T.; BABA, T. Genomic Basis for Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. **Infection and Chemotherapy**. v.45, n.2, p.117–136, 2013.

HIRAO, Y.; IKEDA-DANTSUJI, Y.; MATSUI, H.; YOSHIDA, M.; HORI, S.; SUNAKAWA, K.; NAKAE, T.; HANAKI, H. Low level β -lactamase production in methicillinresistant *Staphylococcus aureus* strains with β -lactam antibiotics-induced vancomycin resistance. **BMC Microbiology**. v.12, p.69, 2012.

HISATA, K.; KUWAHARA-ARI, K.; YAMANOTO, M.; ITO, T.; NAKATOMI, Y.; CUI, L.; BABA, T.; TERASAWA, M.; SOTOZONO, C.; KINOSHITA, S.; YAMASHIRO, Y.; HIRAMATSU, K. Dissemination of methicillin-resistant staphylococci among healthy Japanese children. **Journal of Clinical Microbiology**.v.43, n.7, p.3364-3372, 2005.

HOWDEN, B.P.; DAVIES, J.K.; JOHNSON, P.D.R.; STINEAR, T.P.; GRAYSON, M.L. Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 23, n. 1, p. 99–139, 2010.

HUEBNER, J.; GOLDMANN, D.A. Coagulase negative staphylococci: role as pathogens. **Annual Review of Medicine**. v.50, p.223-236, 1999.

HULETSKY, A.; LEBEL, P.; PICARD, F.J.; BERNIER, M.; GAGNON, M.; BOUCHER, N.; BERGERON, M.G. Identification of methicillin-resistant *S. aureus* carriage in less than 1 hour during a hospital surveillance program. **Clinical Infectious Diseases**. v.40, n.7, p.976-981, 2005.

INCA (Instituto Nacional do Câncer), disponível em <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/oquee>, acesso 14/10/2015.

ITO, T.; HIRAMATSU, K. Acquisition of methicillin resistance and progression of multiantibiotic resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Yonsei Medical Journal**. v.39, n.6, p.526-533, 1998.

ITO, T.; KATAYAMA, Y.; HIRAMATSU, K. Cloning and nucleotide sequence determination of the entire *mec* DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.43, n.6, p.1449-1458, 1999.

ITO, T.; KATAYAMA, Y.; ASADA, K.; MORI, N.; TSUTSUMIMITO, K.; TIENSASITON, C.; HIRAMATSU, K. Structural comparison of three types of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-

resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.45, n.5, p.1323-1336, 2001.

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

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

IWATSUKI, K.; YAMASAKI, O.; MORIZANE, S.; OONO, T. Staphylococcal cutaneous infections: invasion, evasion and aggression. **Journal of Dermatological Science**. v.42, n.3, p.203-214, 2006.

JENKINS, A.; DIEP, B.A.; MAI, T.T.; VO, N.H.; WARRENER, P.; SUZICH, J.; STOVER, K.; SELLMANA, B.R. Differential expression and roles of *Staphylococcus aureus* virulence determinants during colonization and disease. **mBio**. v.6, n.1, p.e02272-14, 2015.

JONES, R. N., GUZMAN-BLANCO, M., GALES, A. C., GALLEGOS, B., CASTRO, A. L. L., MARTINO, M. D. V., VEJA, S., ZURITA, J., CEPPARULO, M., CASTANHEIRA, M. Susceptibility rates in Latin American nations: report from a regional resistance surveillance program (2011). **The Brazilian Journal of infectious Diseases**.v.17, n.6, p.672–681, 2013.

KABALAN, B.; RODRIGUEZ, N.; TORDECILLA, J.; SEPULVEDA, F. Infecciones de catéter venoso central e lock terapia em pacientes oncológicos. **Revista Chilena de Pediatría**. v.81, n.5, p.425-431, 2010.

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

KATAYAMA, Y.; ITO, T; HIRAMATSU, K. Genetic organization of the chromosome region surrounding *mecA* in clinical staphylococcal strains: role of *IS431*-mediated *mecI*

deletion in expression of resistance in *mecA* carrying low-level methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.45, n.7, p.1955-1963, 2001.

KATAYAMA, Y.; TAKEUCHI, F.; ITO, T.; MA, X.X.; UI-MIZUTANI, Y.; KOBAYASHI, Y.; HIRAMATSU, K. Identification in methicillin susceptible *Staphylococcus hominis* of an active primordial mobile genetic element for the staphylococcal cassette chromosome *mec* of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**. v.185, n.9, p.2711-2722, 2003.

KIM, J. Understanding the evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology Newsletter**. v.31, n. 3, p. 17-23, 2009.

KLUYTMANS, J.; BELKUM, A.V.; VERBRUGH, H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. **Clinical Microbiology Reviews**. v.10, n.3, p.505-520, 1997.

KLUYTMANS, J.; STRUELENS, M. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in the hospital. **BMJ**. v.12, n.1, p.338-364, 2009.

KONDO, Y.; ITO, T.; MA, X.X.; WATANABE, S.; KREISWIRTH, B.N.; ETIENNE, J.; HIRAMATSU, K. Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome *mec* type assignment: rapid identification system for *mec*, *ccr*, and major differences in junkyard regions. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.51, n.1, p.264-274, 2007.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; JR, W.C.W. **Diagnóstico microbiológico**. Texto e Atlas colorido. 6^a ed. MEDSI. Rio de Janeiro p. 551-579, 2008.

KUINT, J.; BARZILAI, A.; REGEV-YOCHAY, G.; RUBISTEIN, E.; KELLER, N.; MAAYAN-METZGER, A. Comparison of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia to other staphylococcal species in a neonatal intensive care unit. **European Journal of Pediatrics**. v.166, n.4, p.319-325, 2007.

LE LOIR, I.; BARON, F.; GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. **Genetics and Molecular Research**. v.2, n.1, p.63-76, 2003.

LECLERCQ, R. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. **Clinical Infectious Diseases**. v.34, n.4, p.482- 92, 2002.

LIM, K. T.; HANIFAH, Y. A.; YUSOF, M. Y. M.; THONG, K. L. Characterisation of the virulence factors and genetic types of methicillin susceptible *Staphylococcus aureus* from patients and healthy individuals. **Indian Journal of Microbiology**. v.52, n.4, p.593–600, 2012.

LINA, G., PIÉMONT, Y., GODAIL-GAMOT, F., BES, M., P., MARIE-ODILE, GAUDUCHON, V., VANDENESCH, F., ETIENNE, J. Involvement of Panton-Valentine Leukocidin- producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. **Clinical Infectious Diseases**. v.29, n.5, p.1128-1132, 1999a.

LINA, G., QUAGLIA, A. REVERDY, ME. ; LECLERCQ, R.; VANDENESCH, F. ; ETIENNE, J. Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins among Staphylococci. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.43, n.5, p. 1062–1066, 1999b.

LISA, R.W. *Staphylococcus aureus* exfoliative toxins: How they cause disease. **Dermatology Foundation**. v.122, p.1070-1077, 2004.

LIVERMORE, D. M.; WINSTANLEY, T. G.; SHANNON, K. P. Interpretative reading: recognizing the unusual and inferring resistance mechanisms from resistance phenotypes. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.48, n.1, p.87-102, 2001.

LOWY, F.D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. **The Journal of Clinical Investigation**. v.111, n.9, p.1265-1275, 2003.

LYON, B.R.; SKURRAY, R. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*: genetic basis. **Microbiological Reviews**. v.51, n.1, p.88-134, 1987.

MACK, D.; SABOTTKE, A.; DOBINSKY, S.; ROHDE, H.; HORSTKOTTE, M.A.; KNOBLOCH, J.K. Differential expression of methicillin resistance by different biofilm-negative *Staphylococcus epidermidis* transposon mutant classes. **Antimicrobial Agents and Chemoterapy**. v.46, n.1, p.178-183, 2002.

MARANAN, M.C.; MOREIRA, B.; BOYLE-VAVRA, S.; DAUM, R. S. Antimicrobial resistance in Staphylococci: epidemiology, molecular mechanisms and clinical relevance. **Infectious Disease Clinics of North America**. v.11, n.4, p.813-849, 1997.

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

MCDUGAL, L.K.; THORNSBERRY, C. The role of beta-lactamase in staphylococcal resistance to penicillinase-resistant penicillins and cephalosporins. **Journal of Clinical Microbiology**. v.23, n.5, p.832-839, 1986.

MELLES, D. C.; GORKINK, R. F.; BOELEN, H.A.; SNIJDERS, S.V., PEETERS J. K.; MOORHOUSE, M.J.; VAN DER SPEK, P. J.; VAN LEEUWEN, W.B.; SIMONS, G.; VERBRUGH, H.A.; VAN BELKUM, A. Natural population dynamics and expansion of

pathogenic clones of *Staphylococcus aureus*. **The Journal of Clinical Investigation**. v.114, n.12, p.1732-1740, 2004.

MICHELIM, L.; LAHUDE, M.; ARAÚJO, P.R.; GIOVANAZ, D.S.H.; MÜLLER, G.; DELAMARE, A.P.L; DA COSTA, S.O.P.; ECHEVERRIGARAY, S. Pathogenicity factors and antimicrobial resistance of *Staphylococcus epidermidis* associated with nosocomial infections occurring in intensive care units. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.36, n.1, p.17-23, 2005.

MILHEIRIÇO, C. PORTELINHA, A.; KRIPPAHL, L.; DE LENCASTRE, H.; OLIVEIRA, D.C. Evidence for a purifying selection acting on the betalactamase locus in epidemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **BMC Microbiology**. v.11, n.1, p.76,2011.

MIMS, C.; DOCKRELL, H.M.; GOERING, R.V.; ROITT, I.; WAKELIN, D.; ZUCKERMAN, M. **Microbiologia médica**, 3^a ed., Rio de Janeiro, Elsevier, p. 520-521, 2005.

MONTASSIER, E.; BATAR, E.; GASTINNE, T.; POTEL, G.; LA COCHETIÈRE, M. F. Recent changes in bacteremia in patients with cancer: a systematic review of epidemiology and antibiotic resistance. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**. v.32, n.7, p.841–850, 2013.

MULDREW, K.L.; TANG, Y. W.; LI, H.; STRATTON, C.W. Clonal dissemination of *Staphylococcus epidermidis* in an oncology ward . **Journal of Clinical Microbiology**. v.46, n.10, p.3391–3396, 2008.

NAIMI, T.S.; LEDELL, K. H.; COMO-SABETTI, K.; BORCHARDT, S.M.; BOXRUD, D. J.; ETIENNE, J.; JOHNSON, S. K.; VANDENESCH, F.; FRIDKIN, S.; O'BOYLE, C.; DANILA, R.N.; LYNFIELD, R. Comparison of community and health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. **JAMA**. v.290, n.22, p.2976-2984, 2003.

NILSSON, I. M.; HARTFORD, O.; FOSTER, T.; TARKOWSKI, A. Alpha-Toxin and Gamma-Toxin Jointly Promote *Staphylococcus aureus* Virulence in Murine Septic Arthritis. **Infection and Immunity**. v.67, n.3, p.1045–1049, 1999.

NININ, E.; CAROFF, N.; ESPAZE, E.; MARAILLAC, J.; LEPELLETIER, D.; MILPIED, N.; RICHET, H. Assessment of ica operon carriage and biofilm production in *Staphylococcus epidermidis* isolates causing bacteraemia in bone marrow transplant recipients. **Clinical Microbiology and Infection**. v.12, n.5, p.446–452, 2006.

O'BRIEN, F.G.; PEARMAN, J.W.; GRACEY, M.; RILEY, T.V.; GRUBB, W.B. Community strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* involved in a hospital outbreak. **Journal of Clinical Microbiology**. v.37, n.9, p.2858–2862, 1999.

O'GARA, J.P. *ica* and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *S. aureus*. **FEMS Microbiology Letters**. v.270, n.2, p.179-188, 2007.

OKUMA, K.; IWAKAWA, K.; TURNIDGE, J.D.; GRUBB, W.B.; BELL, J.M.; O'BRIEN, F.G.; COOMBS, G.W.; PEARMAN, J.W.; TENOVER, F.C.; KAPI, M.; TIENSASITORN, C.; ITO, T.; HIRAMATSU, K. Dissemination of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in the community. **Journal of Clinical Microbiology**. v.40, n.11, p.4289-4294, 2002.

OLIVEIRA, G.A.; FARIA, J.B.; LEVY, C.E.; MAMIZUKA, E.M. Characterization of the Brazilian endemic clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from hospitals throughout Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**. v.5, n.4, p.163-70, 2001.

OLIVEIRA, D.C.; MILHEIRIÇO, C.; DE LENCASTRE, H. Redefining a Structural Variant of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*, *SCCmec* Type VI. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.50, n.10, p. 3457–3459, 2006.

OLIVEIRA, A.M.; RAMOS, M.C. PCR-based ribotyping of *Staphylococcus aureus*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v.35, n.2, p.175-180, 2002.

OLSEN, J.E.; CHRISTENSEN, H.; AARESTRUP, F.M. Diversity and evolution of *bla_Z* from *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.57, n.3, p.450-60, 2006.

OTTO, M. Virulence factors of the coagulase-negative *Staphylococci*. **Frontiers in Bioscience**. v.9, p.841–863, 2004.

PANESSO, D.; PLANET, P. J.; DIAZ, L.; HUGONNET, J. E.; TRAN, T. T.; NARECHANIA, A.; MUNITA, J. M.; RINCON, S.; CARVAJAL, L.P.; REYES, J.; LONDOÑO, A.; SMITH, H.; SEBRA, R.; DEIKUS, G.; WEINSTOCK, G.M.; MURRAY, B.E.; ROSSI, F.; ARTHUR, M.; ARIAS, C. A. Methicillin-susceptible, vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**. v.21, n.10, p.1844-1848, 2015.

PANTOSI, A.; SANCHINI, A.; MONACO, M. Mechanisms of antibiotics resistance um *Staphylococcus aureus*. **Future Microbiology**. v.2, n.3, p.323-334, 2007.

PAUL, M.; SHANI, V.; MUCHTAR, E.; KARIV, G.; ROBENSHTOK, E.; LEIBOVIVI, L. Systematic review and meta-analysis of the efficacy of appropriate empiric antibiotic therapy for sepsis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.54, n.11, p.4851-4863, 2010.

PEACOCK, S.J.; MOORE, C.E.; JUSTICE, A.; KANTZANO, M.; STORY, L.; MACKIE, K.; O'NEILL, G.; DAY, N.P. Virulent combinations of adhesin and toxin genes in natural populations of *Staphylococcus aureus*. **Infection and Immunity**. v.70, n.9, p.4987–4996, 2002.

PÉRICHON, B.; COURVALIN, P. Heterologous expression of the Enterococcal *vanA* operon in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.48, n.11, p.4281-4285, 2004.

PETINAKI, E, ARVANITI, A, DIMITRACOPOULOS G, SPILIOPOULOU I. Detection of *mecA*, *mecR1* and *mecI* genes among clinical isolates of methicillin-resistant staphylococci by combined polymerase chain reactions. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.47, n.3, p.297-304, 2001.

PONGAS, G.; HAMILOS, G.; ROLSTON, K.V.; KONTOYIANNIS, D.P. Formal adult infectious disease specialist consultations in the outpatient setting at a comprehensive cancer center (1998-2008): diverse and impactful. **Supportive Care in Cancer**. v.20, n.2, p.261-265, 2012

PREVOST, G.; CRIBIER, B.; CUPPIE ,P. PETIAU, P.; SUPERSAC, G.; FINCK-BARBANCON, V.; MONTEIL, H.; PIEMONT, Y. Panton-valentine leucocidin e gamma-hemolysin from *Staphylococcus aureus* ATCC 49775 are encoded by distinct genetic loci and have different biological activities. **Infection and Immunity**. v.63, n.10, p.4121-4129, 1995.

QUILES, M. G.; MENEZES, L. C.; BAUAB, K. C.; GUMPL, E. K.; ROCCHETTI, T. T.; PALOMO, F. S.; CARLESSE, F.; PIGNATARI, A.C.C. Diagnosis of bacteremia in pediatric oncologic patients by in-house real-time PCR. **BMC Infectious Diseases**. v.15, p.283, 2015.

RAM, R.; FARBMAN , L.; LEIBOVICI, L.; RAANANI , P.; YESHURUN , M.; VIDAL , L.; GAFTER-GVILI , A.; PECK , A.; SHPILBERG , O. ; PAUL, M. Characteristics of initial compared with subsequent bacterial infections among hospitalized haemato-oncological patients. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v.40, n.2, p.123–126, 2012.

ROBINSON, D.A.; ENRIGHT, M.C. Evolutionary models of the emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemoterapy**. v.47, n.12, p.3926-3934, 2003.

ROSSI, F.; DIAZ, L.; WOLLAM, A.; PANESSO, D.; ZHOU, Y.; RINCON, S.; NARECHANIA, A.; XING, G.; DI GIOIA, T.S.R.; DOI, A.; TRAN, T. T.; REYES, J.; MUNITA, J. M.; CARVAJAL, L. P.; HERNANDEZ-ROLDAN, A.; BRANDÃO, D.; VAN DER HEIJDEN, I. M.; MURRAY, B.E.; PLANET, P. J.; WEINSTOCK, G. M.; ARIAS, C.A.

Transferable vancomycin resistance in a community-associated MRSA lineage. **The New England Journal of Medicine**. v.370, p.1524-31, 2014.

ROZENBAUM, R.; SAMPAIO, M.G.; BATISTA, G.S.; GARIBALDI, A.M.; TERRA, G.M.F.; SOUZA, M.J.; VIEIRA, E.N.; SILVA-CARVALHO, M.C.; TEIXEIRA, L.A.; FIGUEIREDO, A.M.S. The first report in Brazil of severe infection caused by community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v.42, n.8, p.756-760, 2009.

RUBIN, R.J.; HARRINGTON, C.A.; POON, A.; DIETRICH, K.; GREENE, J.A.; MOIDUDDIN, A. Economic impact of *Staphylococcus aureus* in New York city hospitals. **Emerging Infectious Diseases**. v.5, n.1, p.9-17, 1999.

SAHA, B.; SINGH, A. K.; GHOSH, A.; BAL, M. Identification and characterization of a vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from Kolkata (South Asia). **Journal of Medical Microbiology**. v.57, p.72-79, 2008.

SANGAPPA, M.; THIAGARAJAN, P. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: resistance genes and their regulation. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**. V.4, n.1, p.658-667, 2012.

SANTOS, A.L.; SANTOS, D.O.S.; FREITAS, C.C.; FERREIRA, B.L.A.; AFONSO, I.F.; RODRIGUES, C.R.; CASTRO, H.C. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v.43, n.6, p.413-423, 2007.

SANTOS, H.B.; MACHADO, D.P.; CAMEY, S.A.; KUCHENBECKER, R.S.; BARTH, A.L.; WAGNER, M.B. Prevalence and acquisition of MRSA amongst patients admitted to a tertiary-care hospital in Brazil. **BMC Infectious Diseases**. v.10, p.328-334, 2010.

SANTOLAYA, M.E.; ALVAREZ, A.M.; AVILÉS, E.L.; , BECKER, A.; COFRÉ, J.; CUMSILLE, M.A.; O'RYAN, M.L.; PAYÁ, E.; SALGADO, C.; SILVA, P.; TORDECILLA, J.; VARAS, M.; VILLARROEL, M.; VIVIANI, T.; ZUBIETA, M. Early hospital discharge

followed by outpatient management versus continued hospitalization of children with cancer, fever, and neutropenic at low risk for invasive bacterial infection. **Journal of Clinical Oncology**. v.22, n.18, p.3784-3789, 2004.

SADERI, H.; EMADI, B.; OWLIA, P. Phenotypic and genotypic study of macrolide, lincosamide and streptogramin B (MLS_B) resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* in Tehran, Iran. **Medical Science Monitor**. v.17, n.2, p.48-53, 2011.

SCHAEFER, A. M.; MCMULLEN, K. M.; MAYFIELD, J. L.; RICHMOND, A.; WARREN, D. K.; DUBBERKE, E. R. Risk factors associated with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization on hospital admission among oncology patients. **American Journal of Infection Control**. v.37, n.7, p.603–605, 2009.

SCHAEFFER, C. R.; WOODS, K. M.; LONGO, G. M.; KIEDROWSKI, M. R.; PAHARIK, A. E.; BÜTTNER, H.; CHRISTNER, M.; BOISSY, R. J.; HORSWILL, A. R.; ROHDE, H.; FEY, P. D. Accumulation-associated protein enhances *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation under dynamic conditions and is required for infection in a rat catheter model. **Infection and Immunity**. v.83, n.1, p.214-226, 2015.

SCHITO, G.C. The importance of development of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology and Infection**. v.12, n.1, p.3-8, 2006.

SILVA, E.C.B.F.; MACIEL, M. A.V.; MELO, F.L.; ANTAS, M.G.C.; RABELO, M.A.; BEZERRA NETO, A.M. *Staphylococcus aureus*: Aspectos biológicos e patogênicos. **Anais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pernambuco**. v.52, n.2, p.168-172, 2007.

SILVEIRA, A., CUNHA, G. R., CAIERÃO, J., CORDOVA, C. M., D'AZEVEDO, P. A. MRSA from Santa Catarina State, Southern Brazil: intriguing epidemiological differences compared to other Brazilian regions. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**. v.19, n.4, p.384–389, 2015.

SOARES, L.C.; PEREIRA, I.A.; COELHO, S.M.O.; CUNHA, C.M.M.; OLIVEIRA, D.F.B.; MIRANDA, A.N.; SOUZA, M.M.S. Caracterização fenotípica da resistência a antimicrobianos e detecção do gene *mecA* em *Staphylococcus spp.* coagulase negativos isolados de amostras animais e humanas. **Ciência Rural**. v.38, n.5, p.1346-1350, 2008.

SOMERVILLE, G.A.; BERES, S.B.; FITZGERALD, J.R.; DELEO, F.R.; COLE R.L.; HOFF, J.S.; MUSSER, J.M. In vitro serial passage of *Staphylococcus aureus*: Changes in physiology, virulence factor production, and agr nucleotide sequence. **Journal of Bacteriology**. v.184, n.5, p.1430-1437, 2002.

SOUSA, L. U.; MIELKE, T.P.; HORNER, R.; RODRIGUES, M.A.; SANTOS, S.O.; MARTINI, R.; SALLA, A. Avaliação de metodologias para a detecção de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) e análise do perfil de sensibilidade frente aos antimicrobianos em um hospital terciário. **Revista Saúde (Santa Maria)**. v.37, n.1, p.23- 30, 2011.

SPAAN, A. N.; VRIELING, M.; WALLET, P.; BADIOU, C.; REYES-ROBLES, T.; OHNECK, E. A.; BENITO, Y.; HAAS, C. J. C.; DAY, C. J.; JENNINGS, M. P.; LINA, G.; VANDENESCH, F.; KESSEL, K. P. M.; TORRES, V. J.; STRIJP, J. A. G.; HENRY, T. The staphylococcal toxins γ haemolysin AB and CB differentially target phagocytes by employing specific chemokine receptors. **Nature Communications**. v.5, p.5438(1-17), 2014.

SUTRA, L.; POUTEREL, B. Virulence factors involved in the patogenesis of bovine intramammary infections due to *S. aureus*. **Journal of Medical Microbiology**. v.40, n.2, p79-89, 1993.

SUZUKI, E.; KUWAHARA-ARAI, K.; RICHARDSON, J.F.; HIRAMATSU, K. Distribution of *mec* regulator genes in methicillin-resistant *Staphylococcus* clinical strains. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.37, n.6, p.1219-1226, 1993.

TAKANO, T.; HIGUCHI, W.; OTSUKA, T.; BARANOVICH, T.; ENANY, S.; ISOBE, K.S.H.; DOHMAE, S.; OZAKI, K.; TAKANO, M.; IWAO, Y.; SHIBUYA, M.; OKUBO, T.; YABE, S.; SHI, D.; REVA, I.; TENG, L.J.; YAMAMOTO, T. Novel characteristics of

community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* belonging to multilocus sequence type 59 in Taiwan. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.52, n.3, p.837-845, 2007.

TANG, S.S.; APISARNTHANARAK, A.; HSU, L.Y. Mechanisms of β -lactam antimicrobial resistance and epidemiology of major community and healthcare-associated multidrug-resistant bacteria. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v.78, p.3-13, 2014.

TENOVER, F.C.; JONES, R.N.; SWENSON, J.M. Methods for improved detection of oxacilin resistance in coagulase-negative Staphylococci: results of multicenter Study. **Journal of Clinical Microbiology**. v.37, n.12, p.4051-4058, 1999.

TENOVER, F. C., WEIGEL, L. M., APPELBAUM, P. C., et al, Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolate from a Patient in Pennsylvania. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.48, n.1, p.275-280, 2004.

THULER, L.C.; VELASCO, E.; MARTINS, C.A.; D'ASSUNÇÃO, M.V. Determinants of mortality in oncology patients colonized or infected with *Staphylococcus aureus*. **Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo**. v.54, n.2, p.47-52, 1999.

TOMASZ, A.; DRUGEON, H.B.; DE LENCASTRE, H. M.; JABES, D.; MCDOUGALL, L.; BILLE, J. New mechanism for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: clinical isolates that lack the PBP 2a gene and contain normal penicillin-binding capacity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.33, n.11, p.1869-1874, 1989.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8^a Ed. Artmed. Porto Alegre. p. 321-322; 422-449, 2005

TRABULSI, L.R; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J.A.N. **Microbiologia**. 3^a Ed. Atheneu. São Paulo. p. 119-156.2002.

TRINDADE, P.D.A.; PACHECO, R.L.; COSTA, S.F.; ROSSI, F.; BARONE, A.A.; MAMIZUKA, E.M.; LEVIN, A.S. Prevalence of *SCCmec* type IV in nosocomial bloodstream

isolate of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone. **Journal of Clinical Microbiology**. v.43, n.7, p.3435-3437, 2005.

TVERDEK, F.P.; CRANK, C.W.; SEGRETI, J. Antibiotic therapy of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in critical care. **Critical Care Clinics**. v.24, n.2, p.249-260, 2008.

VASUDEVAN, P.; NAIR, M.K.M.; ANNAMALAI, T.; VENKITANARAYANAN, K.S. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. **Veterinary Microbiology**. v.92, n.1, p.179-185, 2003.

VELAZQUEZ-MEZA, M.E. *Staphylococcus aureus* methicillin-resistant: emergence and dissemination. **Salud Publica de México**. v.47, n.5, p.381-387, 2005.

VILELA, M.A.; SOUZA, S.L.; PALAZZO, I.C.V.; FERREIRA, J.C.; MORAIS JÚNIOR, M.A.; DARINI, A.L.C.; MORAIS, M.M.C. Identification and molecular characterization of Van A-type vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* in northeast of Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v.101, n.7, p.715-719, 2006.

VOLADRI, R.; KERNODLE, D. Characteristics of a chromosomal gene encoding type betalactamase in phage group II isolates of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.42, n.12, p.3163-3168, 1998.

WIELDERS, C.L.; VRIENS, M.R.; BRISSE, S.; DE GRAAF-MILTENBURG, L.A.; TROELSTRA, A.; FLEER, A.; SCHMITZ, F.J.; VERHOEF, J.; FLUIT, A.C. In-vivo transfer of *mecA* DNA to *Staphylococcus aureus*. **Lancet**. v.357, p.1674-1675, 2001.

WISPLINGHOFF, H.; ROSATO, A.E.; ENRIGHT, M.C.; NOTO, M.; CRAIG, W.; ARCHER, G.L. Related clones containing SCCmec type IV predominate among clinically significant *Staphylococcus epidermidis* isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.47, n.11, p.3574-3579, 2003.

WISPLINGHOFF, H.; BISCHOFF, T.; TALLENT S.M.; SEIFERT, H.; WENZEL, R.P.; EDMOND, M.B. Nosocomial bloodstream in USA hospitals: analysis of 24, 179 cases from a

prospective nationwide surveillance study. **Clinical Infectious Diseases**. v.39, n.3, p.309-317, 2004.

YAGI, S.; WAKAKI, N.; IKEDA, N.; TAGAGI, Y.; UCHIDA, H.; KATO, Y.; MINAMINO, M. Presence of staphylococcal exfoliative toxin A in sera of patients with atopic dermatitis. **Clinical and Experimental Allergy**. v.34, n.6, p.984-993, 2004.

YOSHIDA, R.; KUWAHARA-ARAI, K.; BABA, T.; CUI, L.; RICHARDSON, J.F.; HIRAMATSU, K. Physiological and molecular analysis of a *mecA*-negative *Staphylococcus aureus* clinical strain that expresses heterogeneous methicillin resistance. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.51, n.2, p.247-255, 2003.

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

ZONG, Z.; PENG, C.; LU, X. Diversity of *SCCmec* Elements in methicillin-resistant coagulase-negative Staphylococci clinical isolates. **Plos One**. v.6, n.5, p.e20191, 2011.

ZHU, W., CLARK, N. C., McDOUGAL, L. K., Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with Inc18-like *vanA* plasmids in Michigan. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.52, n.2, p.452-457, 2008.

APÊNDICES

Apêndice A

PATHOGENICITY AND RESISTANCE OF *Staphylococcus* spp. IN ONCOLOGIC AND NON ONCOLOGIC PATIENTS IN TWO HOSPITALS OF RECIFE CITY/PE

Marcelle Aquino Rabelo^{I#}, Stephanie Targino da Silva^{II}, Jussyêgles Niedja da Paz Pereira^I, Natália Regina Souza da Silva^{III}, Vítor Hugo de Arimatéa Rocha^{IV}, Alzira Maria Paiva de Almeida^V, Nilma Cintra Leal^{VI}, Maria Amélia Vieira Maciel^{VII}.

^{I#}Master degree in Tropical Medicine at the Universidade Federal de Pernambuco (UFPE); Doctor's degree student in UFPE, Recife, Pernambuco, Brazil

^{II}Master degree student in Tropical Medicine at the Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco, Brazil

^{III}Master degree in Tropical Medicine at the Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco, Brazil

^{IV}Microbiology specialist at the Faculdade Frassinetti do Recife (FAFIRE); Assistant in chemical analysis at the Laboratório Nacional Agropecuário de Pernambuco (LANAGRO/PE) Recife, Pernambuco, Brazil

^VDoctor's degree in Microbiology at the Université Paris 7; Researcher in Microbiology at CPqAM/FIOCRUZ-PE, Recife, Pernambuco, Brazil

^{VI}Doctor's degree in Biological Sciences at the UFPE; Researcher in Public Health at CPqAM/FIOCRUZ-PE, Recife, Pernambuco, Brazil

^{VII}Doctor's degree in Public Health from the Fiocruz; Associate Professor in UFPE, Recife, Pernambuco, Brazil
Address:

Marcelle Aquino Rabelo

1235, Prof. Moraes Rego ave., Cidade Universitária CEP: 50670-901, Recife, PE, Brazil (e-mail:marcellearabelo@gmail.com)

Abstract

Staphylococcus spp. is one of the major infection-associated agent within health care, especially in intensive care units, and one of principal cause of complication in cancer patients. This study compared the antimicrobial susceptibility profile and distribution of resistance (*mecA*, *blaZ*, *ermA* and *ermC*) and virulence (*icaA*, *icaD* and *hlg*) genes in *Staphylococcus* spp. from oncologic and non-oncologic patients from an Oncology Hospital (OH) and an University Hospital (UH). The type of the *ccr* complex was assessed by PCR among the *mecA* positive isolates from the UH. Higher percentage of susceptible isolates, except for oxacillin and cefoxitin was found among the UH isolates and 27,3% vancomycin-resistant isolates were identified through the screening; 41 isolates displayed the MLSB_c phenotype and five the MSLB_i phenotype, and one isolate from the OH displayed the constitutive phenotype *ermC* gene. The *ccr* types I and II were identified with a higher frequency of *ccr* type I. No statistically significant difference was found in the occurrence of the genes between the two groups of patients or in the two hospitals. Regarding the virulence genes, there was statistically significant difference when comparing the two hospitals.

Keywords: *Staphylococcus* spp., antimicrobial susceptibility, cancer patients, resistance, virulence.

Introduction

Bacterial infections are a major cause of complications in patients with haematological neoplasias and chemotherapy-induced neutropenia and bacteremia is the leading cause of death, either directly or by interfering with the chemotherapy chronogram (Bucaneve et al., 2005.; Paul et al., 2010; Montassier et al., 2013; Quiles et al., 2015). Risk factors for infection in this group of patients are more expressive, because besides the immunocompromentiment caused by disease itself, they are subjected to surgical treatment, chemotherapy and/or radiotherapy, where neutropenia is a major risk for infection in this population (Costa et al., 2015).

In recente decades, the sucess of the treatment of malignancies in children and teenagers has increased, with up to 70 – 80% of cases. Furthermore, the immunosuppression from the treatment makes these patiens more susceptible to infections, which are the main cause of death among them. In these patients, bacteremia often results from infection by one or more microorganisms, mainly members of the Enterobacteriaceae family, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus* and *Staphylococcus* (Quiles et al., 2015). Over the last three decades, the proportion of Gram-positive microorganisms has increased because of the widespread use of permanent catheters (Montassier et al., 2013).

It is noteworthy that the intensive care centers concentrate the highest incidence rates of hospital infections, and are emergency epicenters of microbial resistance, due to the hospitalization of seriously ill patients. These patients, in most cases, use a wide spectrum antimicrobials and are subjected to a countless invasive procedures (Cataneo et al., 2011). Occur more and more evidences supports the idea that neutropenic patients at low risk do not necessarily need hospitalization and antibiotic wide spectrum prolonged to bacterial invasive infections. The strategies for this group include antimicrobial short-term treatment with a consequente reduction in hospitalization and outpatient management with the use of oral antibiotics (Santolaya et al., 2004; Cagol et al., 2009), reinforcing the importance of proper characterization of the resistance profiles of bacterial strains.

Staphylococcus species are the most frequently isolated microorganisms in the hospital environment. *Staphylococcus aureus* stands out for its spreading ability, especially in the intra-hospital environment, due to the aquisition of antimicrobial resistance. Its clinical importance derives from the ability to cause several types of skin infections such as folliculitis, boils and even potentially fatal systemic infections (Costa et al., 2015; Jenkins et al., 2015). Although its pathogenic potential is not yet clear (Gales et al., 2009) coagulase negative *Staphylococcus* (CoNS) are often responsible for serious infections, mainly due to the increasing frequency of invasive procedures. Furthermore, higher incidence of CoNS infections was reported in patients with severe neutropenia (Kabalan et al., 2010).

S. aureus can evade the host imune system due to the existence of several virulence factors and some studies have shown diferences in the production of virulence factors such as gamma-hemolysin (*hlg*) and biofilm (*ica*) between the strains isolated from patients with infections related to catheters compared to uninfected control group (Lisa, 2004; Ninin et al., 2006). However, these comparisons have not been perfomed in patients of oncology centers. The biofilm production may allow these isolates colonize the cateter and other devices, to evading the imune system and microbials, which might lead to an increased frequency of bacteremia and false-positive or false-negative blood cultures (Cafiso et al., 2004; Otto, 2004).

In a retrospective study in an U.S., oncology hospital it was determined the existence of clones among isolates resistant groups throught the resistance data associated with clinical information suggestive of infection

(Muldrew et al., 2008). The analysis of clinical manifestations in an oncology hospital in Rio de Janeiro (Brazil) suggested that *S. aureus* strains resistant to methicilin (MRSA) are more virulent than *S. aureus* methicilin – susceptible (MSSA) in cancer patients (Thuler et al., 1999).

Among the several resistance mechanisms of *Staphylococcus*, the most common are the resistance to macrolides, aminoglycosides, beta-lactams and glycopeptides (Sangappa and Thiagarajan 2012; Jenkins et al., 2015). The importance of these microorganisms depends on the toxins mediated virulence, its invasive nature and its antibiotics resistance profile (Le Loir et al., 2003; Blomqvist et al., 2015; Jenkins et al., 2015). These characteristics are related to the diversity of clinical manifestations (Le Loir et al., 2003; Lim et al., 2012; Jenkins et al., 2015), however concerning the oncology patients, this is not yet clear.

The increasing of resistant strains with different virulence factors over the years indicates the potential failure of the use of antimicrobials in the treatment of infections due to the association of the resistance mechanisms of the microorganism and the resistance of the host immune response (Lim et al., 2012). The number of virulence associated genes harbored by a bacterial isolate results from the interaction between gene acquisition rates, the biological maintenance cost and the failure rate of the disease (Leclercq, 2002; Jenkins et al., 2015). Thus, the more severe *S. aureus* infections cannot be explained by the action of a certain virulence factor only, but rather by the action of several virulence factors during the infectious process. The survival and proliferation of a certain pathogen in the host is favored by mechanisms that enable evasion of the host immune mechanisms. Thus, strains that escape more efficiently the host defence mechanisms are the most prevalent. There is evidence that some clonal types are more virulent than others and they occur more frequently among patients than in healthy individuals (Leclercq, 2002.; Schaefer et al., 2009; Spaan et al., 2014; Blomqvist et al., 2015).

The proposal of this study was to characterize and comparing *Staphylococcus* spp. isolates from oncologic and non-oncologic patients of two hospitals in the city of Recife-PE, regarding antimicrobials susceptibility profile, and the resistance and virulence genes content. This microbiological analysis will allow mapping the bacterial strains through resistance and virulence factors, which will facilitate tracing rational use of antimicrobials and treatment of the infections in the hospitals.

Materials and Methods

The study compared *Staphylococcus* spp. isolates from oncological and non-oncological patients from an oncology (OH) and a university hospital (UH) respectively in Recife, PE, Brazil during one year (2013) period. In the study, patients of male and female gender were included. The samples were collected during routine by the medical and nursing staff of the hospitals. The isolates were identified by macroscopic characteristics on 5% blood agar plates, Gram staining and the catalase, coagulase, DNase and Manitol fermentation tests (CLSI, 2014).

Antimicrobial Susceptibility.

Staphylococcus isolates were tested by the disk diffusion technique in Mueller-Hinton Agar (CLSI, 2014) plates using the following antimicrobials and concentrations: penicillin 10U, oxacillin 1µg, vancomycin 30µg, gentamicin 10µg, clindamycin 2µg, sulfamethoxazole-trimethoprim 1.25/23.75µg, ciprofloxacin 5µg, ceftioxin

30µg, teicoplanin 30µg, erythromycin 15µg e tetracyclin 30µg. The Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) interpretive breakpoints were considered (CLSI, 2014). The erythromycin and clindamycin disks were placed approximate to assess the induced resistance (D test) (CLSI, 2014).

Screening of Oxacillin

Subcultures were made in nutrient agar plates of the isolates that were resistant to oxacillin and/or cefoxitin in disk diffusion technique. It was made direct suspension of colonies to obtain a turbidity to a standard solution of 0.5 McFarland scale. Was dipped into a 1µL inoculation loop in this suspension and proceeding with the inoculum in a area with a diameter of 10 to 15 mm on plates containing Mueller Hinton agar medium with NaCl (4% v/v, 0.68 mol/L) and 6 µg/mL of oxacillin. These plates were incubated at 35 °C for 24 hours being considered, after reading the results as: >1 colony = resistant. Were used as quality control standard strains for MRSA and MSSA: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 – Sensitive and *Staphylococcus aureus* ATCC 33591 – Resistant (CLSI, 2014).

Vancomycin Screening

All isolates were subjected to screening of vancomycin. These samples were inoculated into BHI broth and incubated at 35°C to reach a 2 McFarland turbidity scale. One 1µL loop of this grow was spread in area of 10 to 15mm diameter on plates containing BHI agar supplemented with 6 µg/mL of vancomycin (OXOID) and incubated at 35 °C for 24 and 48 hours considering resistance as > 1 colony (Burnham et al., 2010; Howden et al., 2010; CLSI, 2014).

Enterococcus faecalis ATCC 29212 – Sensitive e *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 – Resistant were used as quality control standard strains (CLSI, 2014).

Total DNA Extraction

Total DNA was extracted from the isolates following Oliveira et al (2015) and the DNA obtained was quantified using nanodrop 2000 (Thermo Scientific).

Identification of the *mecA* gene by PCR

The presence of the *mecA* gene was assessed by PCR among the oxacillin and/or cefoxitin phenotypically resistant isolates using the primers described by Petinaki et al (2001). The PCR reactions were individually prepared in a final volume of 25µL containing: 20ng of genomic DNA, 20pmol of each primer, MgCl₂ 1,5mM, dNTP 200µM, 1U of Go Taq DNA polimerase (Promega, Brasil) and 5µL of Green Go Taq DNA polimerase buffer (Promega, Brasil). The reactions were performed in a thermocycler (Biometra), set for 35 cycles of one minute at 94°C, one minute at 55°C and two minutes at 72°C followed by a final-step of 15 minutes at 72°C. As negative control, a tube containing all the components of the mixture without DNA and for positive control DNA from the strain *Staphylococcus aureus* ATCC 33591 – Resistant were used.

Identification of the beta – lactamase gene (*blaZ*) by PCR

The presence of the *blaZ* gene was assessed by PCR among the oxacillin and/or cefoxitin phenotypically resistant isolates using the primers described by Milheiriço et al (2011). The PCR reactions were individually

prepared in a final volume of 25µL containing: 20ng of genomic DNA, 20pmol of each primer, 2,5µL of MgCl₂ (25mM), 2,5µL dNTP (200µM), 1U of Go Taq DNA polimerase (Promega, Brasil) and 5µL of Green Go Taq DNA polimerase buffer (Promega, Brasil). The reactions were performed in a thermocycler (Biometra), set for 30 cycles composed of one minute at 92°C, one minute at 55°C and two minutes at 72°C followed by a final step of seven minutes at 72°C. A tube containing all the components of the mixture without DNA was used as negative control and DNA from the isolate code 1171 from the Culture Collection from the Microbiology Department from the FIOCRUZ-PE, positive for the gene *blaZ* confirmed by sequencing, was used as positive control.

Determining the type of *SCCmec*

The type of the *ccr* complex was assessed by multiplex PCR among the *mecA* positive isolates from the UH following a protocol based on Kondo et al (2007) as follows: PCR reactions were individually prepared in a final volume of 50µL containing: 20ng of genomic DNA, 10µM of each primer, 6,4µL of MgCl₂ (25mM), 4,0µL dNTP (2,5mM), 1U of Go Taq DNA polimerase (Promega, Brasil) and 5µL of Green Go Taq DNA polimerase buffer (Promega, Brasil). The primers used are described in Table 1 and the PCR products are described in Chart 1. The reactions were performed in a termocycler (Biometra), programmed for 30 cycles composed of one minute at 95°C, one minute at 57°C and two minutes at 72°C followed by a step of seven minutes at 72°C.

Detection of *ermA* and *ermC* genes by PCR technique

The isolates erythromycin and clindamycin resistant (phenotype MLSB_c) and erytromycin positive in the D test (phenotype MLSB_i) were analysed for the presence of the *ermA* and *ermC* genes using the primers described by Lina et al (1999a): *ermA* F5'GTTCAAGAACAATCAATACAGAG3' and R5'GGATCAGGAAAAGGACATTTTAC3'; *ermC*:F5'GCTAATATTGTTTAAATCGTCAATTCC3' and R5'GGATCAGGAAAAGGACATTTTAC3'. For the detection of *ermA* the amplification reaction was prepared in a final volume of 25µl for tube including: 1µl (40ng) of total DNA, 1µl (20pmol) of each primer, 0,6µl of deoxyribonucleotide triphosphate (dNTP) (8 mM), 5,0µl of buffer (5x), 1,5µl of MgCl₂ (25 mM), 0,4µl of Go Taq DNA polimerase (5U) and 14,5µl of sterile milliQ water. For the detection of *ermC*, the amplification reaction was prepared as above, except for using 0,3µl (5U) of Go Taq DNA polimerase and 14,6µl sterile milliQ water. Amplification reactions were performed in a thermocycler under the following conditions: 30 cycles of one minute at 94°C, 30 seconds at 49°C, and 30 seconds at 72°C as described by França et al (2012) with minor modifications. As negative control a tube containing all the components of the mixture without DNA and as positive control DNA from one isolate positive for the genes (*ermA* and *ermC*) confirmed by amplification and sequencing were used.

Detection of the *icaA* and *icaD* genes

The amplification of the *icaA* and *icaD* genes from the operon *icaADBC*, was performed using the primers described by Vasudevan et al (2003) (F5'CCTAACTAACGAAAGGTAG3' and R5'GGCAATATGATCAAGATAC3') for of a 1.585bp amplification. PCR reactions were individually prepared

in a final volume of 25µL, containing: 20ng of genomic DNA, 20pmol of each primer, 1,75µL of MgCl₂ (25 mM), 0,63µL dNTP (8 mM), 1U of Go Taq DNA polimerase (Promega, Brasil) and 5µL of Green Go Taq DNA polimerase buffer (Promega, Brasil). The reactions were performed in a thermocycler (Biometra), programmed for 30 cycles of one minute at 94°C, one minute at 50°C and one minute at 72°C followed by 15 minutes at 72°C. As negative control a tube containing all the components of the mixture without DNA and as positive control the DNA from the isolate code 047 from the Culture Collection from the Microbiology Department from the FIOCRUZ-PE, positive for the genes confirmed by sequencing, was used as positive control.

Detection of the *hlg* gene

For amplification of the *hlg* gene the protocol described by Lina et al (1999b) was employed using the primers F5'GCCAATCCGTTATTAGAAAATGC3' and R5'CCATAGACGTAGCAACGGAT3' for a 937bp fragment. PCR reactions were individually prepared in a final volume of 25µL containing: 20ng of genomic DNA, 20 pmol of each primer, 1,75µL of MgCl₂ (25mM), 0,63µL dNTP (8mM), 1U of Go Taq DNA polimerase (Promega, Brasil) and 5µL of Green Go Taq DNA polimerase buffer (Promega, Brasil). The amplification reaction was programmed for 30 cycles composed of one minute at 94°C, one minute at 50°C one minute at 72°C followed by 15 minutes at 72°C. As negative control, a tube containing all the components of the mixture without DNA and as positive control the DNA from the isolate code 412 from the Culture Collection from the Microbiology Department from the FIOCRUZ-PE, positive for the gene *hlg* confirmed by sequencing, was used.

The products of all amplifications were electrophoresed in 1% agarose gels, stained with Blue-Green (LGC Biotechnology), visualized in UV transilluminator and scanned by Kodak 1D software version 3.5.2 (Scientific Imaging Systems, USA). For the products of the *ccr* complex amplification 2% agarose gels were used. The molecular weight marker 100bp DNA ladder (Invitrogen) was used.

Data Analysis

Clinical and microbiological data were introduced in SPSS Statistics 20 software for statistical analysis through frequency distribution, χ^2 test and Fisher's Test.

Results

For the study 173 isolates (104 *S. aureus* and 69 CoNS) were obtained from 51 (47 *S. aureus* and 4 CoNS) patients from the OH and 122 (57 *S. aureus* and 65 CoNS) from patients from the UH in Recife, PE, Brazil were obtained during the year 2013. The more frequent source of the samples was blood culture, followed by cateter tip in both hospitals (Table 2).

There was a higher percentage of susceptible isolates, except for oxacillin and cefoxitin among the 104 isolates from the UH (Table 3). By the screening for methicillin and/or cefoxitin and to oxacillin the 104 isolates were resistant. Vancomycin screening identified 24 (27.3%) isolates as resistant (Table 4).

The profile of susceptibility to erythromycin and clindamycin was also analyzed through the disk diffusion method and 41 isolates with MLSB_c phenotype (Macrolides, Lincosamides and Streptogramin constituent B) and five MSLB_i phenotype (Macrolides, Lincosamides and Streptogramin inducible B) were identified at the University Hospital. In the Oncology Hospital, eight isolates were identified with the phenotype

MLSB_c and six MLSB_i (Table 5). The isolates displaying these phenotypes were analyzed by PCR for the detection of the *ermA* and *ermC* genes. Only one isolate was found harboring the constitutive phenotype *ermC* gene. The *ermA* gene wasn't observed in Oncology hospital (Table 5). It was observed positive isolates for all genes in the studied phenotypes, except for the *ermA* gene in induced phenotype in the University Hospital (Table 5).

The occurrence of the *blaZ* and *mecA* genes was assessed by PCR among the methicillin and cefoxitin and/or oxacillin phenotypically resistant isolates. Among these from the Oncology Hospital 50 % and 77.7%, respectively were positive for the *blaZ* and *mecA* genes (Table 6). The isolates analyzed from the University Hospital 45.7% were positive for the *blaZ* gene and 17% for the *mecA* gene (Table 6).

The occurrence of the genes *icaAD* and *hlg* was observed respectively in 25% and 42.8% in the isolates from the University Hospital and in 32.1% and 70% respectively in the isolates from the Oncology Hospital. Table 6 shows the distribution according to the source of origin.

In this study, there was no statistically significant difference in the occurrence of the resistance genes *blaZ*, *mecA*, *ermA* and *ermC* when comparing the two hospitals. Regarding the virulence genes, there was statistically significant difference when comparing the two hospitals. Chart 2 and 3 shows the results of the *p* value found in the statistical analysis.

Out of the five *mecA* positive isolates from the University Hospital analyzed by PCR for determination of the *ccr complex* type, four showed Type I *ccr* (*ccrA1*, 695bp) and one was Type II (*ccrA2*, 937 bp) (Figure 1).

Discussion

Most *Staphylococcus* spp. carriers are asymptomatic and the process of infection is usually associated with some factor which decreases the immune response of the individual, as invasive medical procedures, being this microorganism referred to as a main agent of bacteremia, often acquired in hospital environment (Muldrew et al., 2008; Schaefer et al., 2009). Among the users of central vascular catheter, *S. aureus* and CoNS are the more frequent microorganisms, accounting for 30% of the isolates (Muldrew et al., 2008; Schaefer et al., 2009).

In our study, the most frequent samples were blood culture and catheter tip with percentages of respectively 33,6% and 17,2% for the UH and 25,5% and 13,7% for OH.

In Brazil, the frequency of isolation of *S. aureus* and its relationship with hospital infections reach high values. In many Brazilian hospitals, the prevalence of MRSA strains varies from 40 to 80% (Lina et al., 1999b; Santos et al., 2010; Jones et al., 2013; Almeida et al., 2014; Braga et al., 2014) and data from the Antimicrobial Surveillance Program show that MRSA reaches 31% among the nosocomial and communitarian infections agents and are considered the more common among the most prevalent pathogens (Santos et al., 2010; Jones et al., 2013; Silveira et al., 2015). A survey in Brazilian hospitals showed 80% (Silveira et al., 2015) resistance of CoNS in blood cultures. In our study, this was the most frequent type of sample; however, *S. aureus* was more prevalent in both hospitals.

Concerning the detection of the genes *blaZ* and *mecA* by PCR 50% and 77.7% of positive samples were found respectively in the OH while in the UH there was 45.7% of occurrence for the *blaZ* gene and 7% for the *mecA* gene. Some studies show that the rate of beta-lactamase production ranges from 55.7% to 92.6% for *Staphylococcus* (Oliveira et al., 2011; Rabelo et al., 2013) and our results fit within these limits. Oliveira et al

(2011) found high prevalence of beta-lactamase in their isolates (83%) and they drew attention to the widespread use of drugs in the clinical practice which may trigger resistance to several antimicrobial classes.

A study in India by Prabhash et al (2010) reported a rate of 18% of methicillin-resistant *S. aureus* from cancer patients, similar to our results in the University Hospital in Recife. Another study conducted in South Korea by Kang et al (2012), reported a prevalence of 48.4% of MRSA associated with bacteremia in cancer patients, a percentage lower than that from our work (77.7%) for oncology patients.

Another study conducted earlier in the same University Hospital, reported percentage slightly lower than ours, about 10% of the isolates were considered MRSA (Rabelo et al., 2014), suggesting that the control measures of this type of microorganism have not been fully effective. In this study, was noted the presence of strains resistant to methicillin only by phenotype methods for both hospitals, which suggests the presence of other mechanisms of resistance or non – expression of genes researched (Petinaki et al., 2001; Yoshida et al., 2003; Milheiro ET al., 2011; Sangappa and Thiagarajan, 2012).

The profile of resistance to vancomycin in the present study among the isolates from the University and Oncology Hospitals described the percentage rate of 25% and 29.5% respectively. Staphylococci resistant to glycopeptides were recently found in Brazil, and isolation of vancomycin resistant *S. aureus* was registered in São Paulo (Rossi et al., 2014; Panesso et al., 2015). Other study previously conducted in the University Hospital (Rabelo et al., 2014), reported 11% of resistant isolates using the screening method, but only among MRSA samples.

In the present study, the MLSB_c phenotype found in 41 isolates (33.6%) from the University Hospital and eight isolates (15.7%) from the Oncology Hospital was predominant over the MLSB_i phenotype found in five isolates (4.1%) from the University and six isolates (11.8%) from the Oncology Hospital. These findings are different from those from another study in Brazil that identified 71 (46.7%) MLSB_c and five MLSB_i (3.3%) isolates (Coutinho et al., 2010).

Antimicrobial susceptibility data are essential for the establishment of appropriate therapy making imperative to perform the D test (Coutinho et al., 2010; Juyal et al., 2013). Categorizing a *Staphylococcus* spp. isolate as clindamycin sensitive without verifying if there is inducible resistance may result inadequate therapy. On the other hand, a negative result for inducible clindamycin resistance confirms the antimicrobial sensitivity and allow a correct therapeutic (Kumar et al., 2012).

In a study conducted in Iran (Saderi et al., 2011), the *ermA* gene was more frequent than the *ermC* gene, accounting for 76 (60.3%) and 69 (54.8%) respectively among the *S. aureus* isolates. Different results were obtained in our study, the presence of the *ermC* gene was higher than the *ermA* gene in the isolates of both Hospitals. In our study, no single positive isolate was found for the *ermA* gene in Oncology Hospital for the studied phenotypes. No single positive isolate was found for the induced phenotype at the University Hospital. The isolates that do not harbor the *ermA* or *ermC* genes, may possess the *ermB* gene. Due to a possible association of these genes the isolates harboring the *ermA* or *ermC* genes may also contain *ermB*. The presence of the *ermB* gene was not researched in our work because it occurs mainly among streptococci and enterococci (Leclercq, 2002). Furthermore, Coutinho et al (2010), reported a low frequency of the *ermB* gene.

In the present work, it was observed 42.8% and 70% of positive isolates for the *hlg* gene, respectively in the University Hospital and the Oncology Hospital. Oliveira et al (2014) found 41.86% of methicillin-resistant CoNS isolates from blood cultures at another University Hospital of the same region and a study in Malaysia

reported a percentage of 45% of methicillin-resistant isolates from patients and students from an university hospital (Lim et al., 2012). The gene *hlg* codes for the gamma toxin that has pro-inflammatory activity and is capable of lysing erythrocytes and leukocytes, which increases the toxigenic potential of the bacteria and the severity of the infections (Le Loir et al., 2003; Oliveira et al., 2014; Spaan et al., 2014).

S. aureus and CoNS are able to produce biofilms. The adhesion is mediated by the intercellular adhesin *N*-acetyl-glicosamine polimeric (PNAG) which is synthesized by enzymes encoded by genes present in the *ica* locus (Barbieri et al., 2015). In our work, there was 25% and 32.1% of positive isolates for *icaAD*, respectively at the University Hospital and Oncology Hospital. Higher positivity (79%) was found among inpatients and students in a hospital in Malaysia (Lim et al., 2012). Another study reported 75% of positive isolates in samples from oncology patients with breast implants (Barbieri et al., 2015).

In this study, there was no statistically significant difference in the presence of the resistance genes (*blaZ*, *mecA*, *ermA* and *ermC*) when comparing the two hospitals whilst statistically significant difference was found in the presence of the virulence genes (*icaA*, *icaD* and *hlg*). This finding suggests that the oncology plays no role on the presence of resistance genes between the groups. On the other hand, the characteristics of the patient groups seems to be associated with the toxigenic and pathogenicity potential of the isolates studied.

The type of the *ccr* complex was assessed by PCR among the *mecA* positive isolates from the University Hospital and the *ccr* type I (*ccrA1*, 695bp) and type II (*ccrA2*, 937 bp) were found with higher frequency of *ccr* type I. Previous studies reported the occurrence of *SCCmec* types I, II, III, IV and V in Brazilian hospitals (Ternes et al., 2013; Lima et al., 2014; Pereira et al., 2014; Oliveira et al., 2015). Due to the small number of isolates, it was not possible to make inferences about these findings. It is known that *SCCmec* types I and II are associated with strains of hospital origin, characterized by multiple antibiotic resistance besides to the betalactams, such as macrolides, aminoglycosides, tetracyclines, quinolones and rifampicin (Hiramatsu et al., 2013).

In conclusion, the antimicrobial monitoring is essential for the treatment of infections in each hospital.

Acknowledgements and Funding

This work was supported by FACEPE (Fundação de Amparo Ciência do Estado de Pernambuco) grant n° APQ 0579-2.12/06, PROPESQ (Pró-Reitoria para Assuntos de Pesquisa e Pós-Graduação-UFPE) for the Edital PQ-Multiusuário-2010/Propesq n° 23076.024115/2010-91 and CNPq (protocolo number 474131/2011-4). CAPES for the scholarship provided. The Hospital das Clínicas bacteriology laboratory for providing some samples and CIAC laboratory, Hospital do Câncer de Pernambuco, for providing some samples and information records. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM) for providing space for the molecular techniques realization.

Conflict of Interest

There aren't no potential conflict of interest.

Ethical Considerations

This article does not contain any studies with human participants performed by any of the authors. This study was approved by the Ethics Committee on Research of the Universidade Federal of Pernambuco –

CEP/CCS/UFPE (CAAE N° 0490.0.172.000-11) and Ethics Committee of Sociedade de Combate ao Câncer from Pernambuco– CEP/SPCC (CAAE N° 05554812.7.0000.5205).

References

Almeida GCM, Santos MM, Lima NGM, Cidral TA, Melo MCN, Lima KC (2014). Prevalence and factors associated with wound colonization by *Staphylococcus* spp. and *Staphylococcus aureus* in hospitalized patients in inland northeastern Brazil: a cross-sectional study. *BMC Infect Dis.* 14:328.

Barbieri R, Pesce M, Franchelli S, Baldelli I, De Maria A, Marchese A (2015). Phenotypic and genotypic characterization of Staphylococci causing breast peri-implant infections in oncologic patients. *BMC Microbiol.* 15:26.

Blomqvist S, Leonhardt A, Arirachakaran P, Carlen A, Dahlén G (2015). Phenotype, genotype, and antibiotic susceptibility of Swedish and Thai oral isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Oral Microbiol.* 7: 26250.

Braga EDV, Aguiar-Alves F, Freitas MFN, Silva MO, Correa TV, Snyder RE, de Araújo VA, Marlow MA, Riley LW, Setúbal S, Silva LE, Araújo Cardoso CA (2014). High prevalence of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* colonization among healthy children attending public daycare centers in informal settlements in a large urban center in Brazil. *BMC Infect Dis.* 14:538.

Bucaneve G, Miozzi A, Menichetti F, Martino P, Dionisi MS, Martinelli G, Allione B, D'Antonio D, Buelli M, Nosari AM, Cilloni D, Zuffa E, Cantaffa R, Specchia G, Amadori S, Fabbiano F, Deliliers GL, Lauria F, Foà R, Del Favero A; Gruppo Italiano Malattie Ematologiche dell'Adulto (GIMEMA) Infection Program (2005). A levofloxacin to prevent bacterial infection in patients with cancer and neutropenia. *The New Engl J Med.* 353(10): 977-987.

Burnham CAD, Weber CJ, Dunne Jr WM (2010). Novel screening agar for detection of vancomycin-nonsusceptible *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 48(3): 949–951.

Cafiso V, Bertuccio T, Santagati M, Campanile F, Amicosante G, Perilli MG, Selan L, Artini M, Nicoletti G, Stefani S (2004). Presence of *ica* operon in clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* and its role in biofilm production. *Clin Microbiol Infect.* 10(12): 1081-1088.

Cagol AR, Castro Junior CG, Martins MC, Machado AL, Ribeiro RC, Gregianin LJ, Brunetto AL (2009). Oral vs. intravenous empirical antimicrobial therapy in febrile neutropenic patients receiving childhood cancer chemotherapy. *J de Ped.* 85(6): 531-535.

Cataneo C, Canini SRMS, Castro PTO, Hayashida M, Gir E (2011). Avaliação da sensibilidade e da especificidade dos critérios para isolamento de pacientes admitidos em um hospital especializado em oncologia. *Rev Latino-Am Enfer.* 19(5):1072-1079.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (2014). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, twenty-fourth informational supplement, document M100-S24. Wayne, PA, USA: CLSI.

Costa PO, Atta EH, Silva ARA (2015). Infection with multidrug-resistant gram-negative bacteria in a pediatric oncology intensive care unit: risk factors and outcomes. *J Pediatr (Rio J)*. 91(5):435-441.

Coutinho VLS, Paiva RM, Reiter KC, de-Paris F, Barth AL, Machado AB (2010). Distribution of *erm* genes and low prevalence of inducible resistance to clindamycin among *staphylococci* isolates. *Braz J Infect Dis*. 14(6):564-568.

França CA, Peixoto RM, Cavalcante MB, Melo NF, Oliveira CJB, Veschi JA, Mota RA, Costa MM (2012). Antimicrobial resistance of *Staphylococcus* spp. from small ruminant mastitis in Brazil. *Pesq. Vet. Bras*. 32(8):747-753.

Gales AC, Sader HS, Ribeiro J, Zoccoli C, Barth A, Pignatari AC (2009). Antimicrobial susceptibility of gram-positive bacteria isolated in Brazilian hospitals participating in the SENTRY program (2005-2008). *Braz J Infect Dis*. 13(2):90-98.

Hiramatsu K, Ito T, Tsubakishita S, Sasaki T, Takeuchi F, Morimoto Y, Katayama Y, Matsuo M, Kuwahara-Arai K, Hishinuma T, Baba T (2013). Genomic Basis for Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Infect Chemother*. 45(2): 117–136.

Howden BP, Davies JK, Johnson PDR, Stinear TP, Grayson ML (2010). Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. *Clin Microbiol Rev*. 23(1): 99–139.

Jenkins A, Diep BA, Mai TT, Vo NH, Warrenner P, Suzich J, Stover CK, Sellman BR (2015). Differential Expression and Roles of *Staphylococcus aureus* Virulence Determinants during Colonization and Disease. *mBio*. 6(1):e02272-14.

Jones RN, Guzman-Blanco M, Gales AC, Gallegos B, Castro AL, Martino MD, Vega S, Zurita J, Cepparulo M, Castanheira M (2013). Susceptibility rates in Latin American nations: report from a regional resistance surveillance program (2011). *The Braz J Infect Dis*. 17(6):672–681.

Juyal D, Shamanth AS, Pal S, Sharma MK, Prakash R, Sharma N (2013). The prevalence of inducible clindamycin resistance among Staphylococci in a tertiary care hospital – A study from the Garhwal Hills of Uttarakhand, India. *J Clin Diagn Res*. 7: 61-65.

Kabalan B, Rodriguez N, Tordecilla J, Sepulveda F (2010). Infecciones de catéter venoso central e lock terapia em pacientes oncológicos. *Rev Chil Pediatr*. 81(5): 425-431.

- Kang CI, Song JH, Chung DR, Peck KR, Yeom JS, Son JS, Wi YM (2012). Bloodstream infections in adult patients with cancer: clinical features and pathogenic significance of *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Support Care Cancer*. 20 (10):2371–2378.
- Kondo Y, Ito T, Ma XX, Watanabe S, Kreiswirth BN, Etienne J, Hiramatsu K (2007). Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome *mec* type assignment: rapid identification system for *mec*, *ccr*, and major differences in junkyard regions. *Antimicrob Agents Chemoter*. 51(1): 264-274.
- Kumar S, Bandyopadhyay M, Bhattacharya K, Bandyopadhyay MK, Banerjee P, Pal N, Mondal S, Ghosh T (2012). Inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus* isolates from a tertiary care hospital in eastern India. *Ann Trop Med Public Health*. 5: 468-470.
- Leclercq R (2002). Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clin Infect Dis*. 34: 482- 492.
- Le Loir I, Baron F, Gautier M (2003). *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet Mol Res*. 2: 63-76.
- Lim KT, Hanifah YA, Yusof MYM, Thong KL (2012). Characterisation of the Virulence Factors and Genetic Types of Methicillin Susceptible *Staphylococcus aureus* from Patients and Healthy Individuals. *Indian J Microbiol*. 52(4):593–600.
- Lima DF, Brazão NB, Folescu TW, Neves FP, Ferreira AG, Santos EA, Marques EA, Leão RS (2014). Panton-Valentine leukocidin (PVL) gene carriage among *Staphylococcus aureus* strains with SCC*mec* types I, III, IV, and V recovered from cystic fibrosis pediatric patients in Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 78(1): 59–62.
- Lina G, Quaglia A, Reverdy ME, Leclercq R, Vandenesch F, Etienne J (1999a). Distribution of Genes Encoding Resistance to Macrolides, Lincosamides, and Streptogramins among Staphylococci. *Antimicrob Agents Chemoter*. 43(5) 1062–1066.
- Lina G, Piémont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter MO, Gauduchon V, Vandenesch F, Etienne J (1999b). Involvement of Panton-Valentine Leukocidin- producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin Infect Dis*. 29(5): 1128-1132.
- Lisa RW (2004). *Staphylococcus aureus* exfoliative toxins: How they cause disease. *Derm Foundat*. 122: 1070-1077.
- Milheiriço C, Portelinha A, Krippahl L, de Lencastre H, Oliveira DC (2011). Evidence for a purifying selection acting on the betalactamase locus in epidemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiology*. 11(1): 76.

- Montassier E, Batar E, Gastinne T, Potel G, de La Cochetière MF (2013). Recent changes in bacteremia in patients with cancer: a systematic review of epidemiology and antibiotic resistance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 32:841–850.
- Muldrew KL, Tang YW, Li H, Stratton CW (2008). Clonal Dissemination of *Staphylococcus epidermidis* in an Oncology Ward. *J Clin Microbiol.* 46(10): 3391–3396.
- Ninin E, Caroff N, Espaze E, Maraillac J, Lepelletier D, Milpied N, Richet H (2006). Assessment of *ica* operon carriage and biofilm production in *Staphylococcus epidermidis* isolates causing bacteraemia in bone marrow transplant recipients. *Clin Microbiol Infect.* 12: 446–452.
- Oliveira AAF, Pinheiro Jr JW, Mota RA, Cunha ML, Lopes CA, Rocha NS (2011). Phenotype characterization of *Staphylococcus* species strains isolated from buffalo (*Bubalus bubalis*) milk. *J Vet Diag Invest.* 23(6): 1208-1211.
- Oliveira WLM, Ferreira EL, Manguiera EVC, Vilela MA, Almeida AMP, Leal NC (2014). Coagulase-Negative Staphylococci from Hospital-Associated Infections Harboring Virulence Genes. *J J Microbiol Pathol.* 1(2): 013.
- Oliveira WLM, Manguiera EVC, Vilela MA, Júnior SP, Leal NC, Almeida AMP (2015). Diversity of *Scmec* types in Methicillin Resistant *Staphylococcus* spp. Causing Hospital-Associated Infections. *J J Microbiol Pathol.* 2(3): 020.
- Otto M (2004). Virulence factors of the coagulase-negative *Staphylococci*. *Front Biosci.* 9:841–863.
- Panesso D, Planet PJ, Diaz L, Hugonnet JE, Tran TT, Narechania A, Munita JM, Rincon S, Carvajal LP, Reyes J, Londoño A, Smith H, Sebra R, Deikus G, Weinstock GM, Murray BE, Rossi F, Arthur M, Arias CA (2015). Methicillin-Susceptible, Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus*, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 21(10): 1844-1848.
- Paul M, Shani V, Muchtar E, Kariv G, Robenshtok E, Leibovici L (2010). Systematic review and meta-analysis of the efficacy of appropriate empiric antibiotic therapy for sepsis. *Antimicrob Agents Chemother.* 54: 4851-4863.
- Pereira VC, Riboli DFM, Cunha MLRS (2014). Characterization of the clonal profile of MRSA isolated in neonatal and pediatric intensive care units of a University Hospital. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 13:50.
- Petinaki E, Arvaniti A, Dimitracopoulos G, Spiliopoulou I (2001). Detection of *mecA*, *mecR1* and *mecI* genes among clinical isolates of methicillin-resistant staphylococci by combined polymerase chain reactions. *J. Antimicrob. Chemother.* 47(3): 297-304.

Prabhash K, Medhekar A, Ghadyalpatil N, Noronha V, Biswas S, Kurkure P, Nair R, Kelkar R (2010). Blood stream infections in cancer patients: a single center experience of isolates and sensitivity pattern. *Indian J Cancer*. 47:184–188.

Quiles MG, Menezes LC, Bauab KC, Gumpiv EK, Rocchetti TT, Palomo FS, Carlesse F, Pignatari ACC (2015). Diagnosis of bacteremia in pediatric oncologic patients by in-house real-time PCR. *BMC Infectious Diseases*. 15:283.

Rabelo MA, Bezerra Neto AM, Silva ECBF, Oliveira WLM Melo FL, Lopes ACS, Leal NC, Maciel MAV (2013). Phenotypic methods for determination of methicillin resistance in *Staphylococcus spp.* from health care workers. *J Bras Patol Med Lab*. 49(2): 91-96.

Rabelo MA, Bezerra Neto AM, Loibman SO, Lima JLC, Ferreira EL, Leal NC, Maciel MAV (2014). The occurrence and dissemination of methicillin and vancomycin-resistant *Staphylococcus* in samples from patients and health professionals of a university hospital in Recife, State of Pernambuco, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*. 47(4): 437-446.

Rossi F, Diaz L, Wollam A Panesso D, Zhou Y, Rincon S, Narechania A, Xing G, Di Gioia TSR, Doi A, Tran TT, Reyes J, Munita JM, Carvajal LP, Hernandez-Roldan A, Brandão D, van der Heijden IM, Murray BE, Planet PJ, Weinstock GM, Arias CA (2014). Transferable Vancomycin Resistance in a Community-Associated MRSA Lineage. *N Engl J Med*. 370:1524-31.

Saderi H, Emadi B, Owlia, P (2011). Phenotypic and genotypic study of macrolide, lincosamide and streptogramin B (MLS_B) resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* in Tehran, Iran. *Med Sci Monit*. 17: 48-53.

Sangappa M, Thiagarajan P (2012). Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: resistance genes and their regulation. *Int J Pharm Pharmac Scien*. 4(1):658-667.

Santolaya ME, Alvarez AM, Avilés EL, Becker A, Cofré J, Cumsille MA, O’Ryan ML, Payá E, Salgado C, Silva P, Tordecilla J, Varas M, Villarroel M, Viviani T, Zubieta M (2004). Early hospital discharge followed by outpatient management versus continued hospitalization of children with cancer, fever, and neutropenic at low risk for invasive bacterial infection. *J Clin Oncol*. 22:3784-3789.

Santos HB, Machado DP, Camey SA, Kuchenbecker RS, Barth AL, Wagner MB (2010). Prevalence and acquisition of MRSA amongst patients admitted to a tertiary-care hospital in Brazil. *BMC Infect Dis*. 10: 328-334.

Schaefer AM, McMullen KM, Mayfield JL, Richmond A, Warren DK, Dubberke ER (2009). Risk Factors Associated with Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Colonization on Hospital Admission among Oncology Patients. *Am J Infect Control*. 37(7): 603–605.

Silveira A, Cunha GR, Caierão J, Cordova CM, d'Azevedo PA (2015). MRSA from Santa Catarina State, Southern Brazil: intriguing epidemiological differences compared to other Brazilian regions. *The Braz J Infect Dis.* 19(4):384–389.

Spaan AN, Vrieling M, Wallet P, Badiou C, Reyes-Robles T, Ohneck EA, Benito Y, de Haas CJ, Day CJ, Jennings MP, Lina G, Vandenesch F, van Kessel KP, Torres VJ, van Strijp JA, Henry T (2014). The staphylococcal toxins γ haemolysin AB and CB differentially target phagocytes by employing specific chemokine receptors. *Nature Commun.* 5 5438, 1-17.

Ternes YM, Lamaro-Cardoso J, André MCP, Pessoa VP Jr, Vieira MA, Minamisava R, Andrade AL, Kipnis A (2013). Molecular epidemiology of coagulase-negative *Staphylococcus* carriage in neonates admitted to an intensive care unit in Brazil. *BMC Infect Dis.* 13: 572.

Thuler LC, Velasco E, Martins CA, D'Assunção MV (1999). Determinants of mortality in oncology patients colonized or infected with *Staphylococcus aureus*. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo.* 54(2): 47-52.

Vasudevan P, Nair MKM, Annamalai T, Venkitanarayanan KS (2003). Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. *Vet Microbiol.* 92:179-185.

Yoshida R, Kuwahara-Arai K, Baba T, Cui L, Richardson JF, Hiramatsu K (2003). Physiological and molecular analysis of a *mecA*-negative *Staphylococcus aureus* clinical strain that expresses heterogeneous methicillin resistance. *J Antimicrob Chemother.* 51:247-255.

Tables and Figures

Table 1: Primer sequence to be used for multiplex PCR reactions to determine the *ccr complex* (Kondo et al., 2007).

Primer	Sequences (5'-3')
α_1	5'AACCTATATCATCAATCAGTACGT3'
α_2	5'TAAAGGCATCAATGCACAAACACT3'
α_3	5'AGCTCAAAAGCAAGCAATAGAAT3'
β_c	5'ATTGCCTTGATAATAGCCITCT3'
MA1	5'TGCTATCCACCCTCAAACAGG3'
MA2	5'AACGTTGTAACCACCCCAAGA3'
γF	5'CGTCTATTACAAGATGTTAAGGATAAT3'
γR	5'CCTTTATAGACTGGATTATTCAAAATAT3'

Chart 1: PCR products on 2% agarose gel electrophoresis.

<i>ccr complex 1</i>	695 bp
<i>ccr complex 2</i>	937 bp
<i>ccr complex 3</i>	1791 bp
<i>ccr complex 5</i>	518 bp

Table 2: Distribution of *Staphylococcus spp.* isolates from the samples and hospital origin.

Sample type	UH	OH	TOTAL
Blood	41	13	54
Catheter tip	21	7	28
Peritoneal fluid	1	1	2
Tracheal aspirates	16	6	22
Wounds	7	3	10
Diverse secretions	12	12	24
Urine	4	2	6
Fist tumor	0	1	1
Ascites fluid	1	2	3
Tissue fragment	6	1	7
Chest wall	0	1	1
Abscess	4	2	6
Eye discharge	1	0	1
Seroma secretion	1	0	1
Right lymphnode secretion	1	0	1
Sperm	1	0	1
Urethral discharge	1	0	1
LCR	3	0	3
Bronchoalveolar lavage	1	0	1
TOTAL	122	51	173

Table 3: Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus spp.* isolates in University and Oncologic Hospitals.

Antimicrobial	UH		OH	
	Sensitive	Resistant	Sensitive	Resistant
Oxacillin	54	68	40	11
Cefoxitin	43	79	39	12
Vancomycin	120	2	51	0
Teicoplanin	118	4	43	8
Gentamicin	71	51	45	6
Erytromycin	54	68	33	18
Clindamycin	66	56	43	8
Tetracyclin	94	28	41	10
Sufamethoxazole/trimethopim	84	38	49	2
Ciprofloxacin	107	15	42	9

Table 4: Antimicrobial susceptibility to Oxacillin and Vancomycin of *Staphylococcus spp.* isolates in University and Oncologic Hospitals.

Screening type	Test Results	Hospital		Total
		UH	OH	
Oxacillin	Resistant	46	8	54
	Sensitive	38	12	50
	Total	84	20	104
Vancomycin	Resistant	11	13	24
	Sensitive	33	31	64
	Total	44	44	88

Table 5: Results of PCR for *ermA* and *ermC* genes for the two hospitals.

Hospital	Phenotype							
	MLSB _c				MLSB _i			
	<i>ermA</i> positive	<i>ermA</i> negative	<i>ermC</i> positive	<i>ermC</i> negative	<i>ermA</i> positive	<i>ermA</i> negative	<i>ermC</i> positive	<i>ermC</i> negative
UH	5	36	16	25	0	5	1	4
OH	0	8	1	7	0	6	0	6

Table 6: Results of PCR for *blaZ*, *mecA*, *icaAD* and *hlg* genes for the two hospitals.

PCR type	Results	Hospital	
		UH	OH
<i>blaZ</i>	Positive	16	9
	Negative	19	9
<i>mecA</i>	Positive	8	14
	Negative	39	4
<i>icaAD</i>	Positive	3	9
	Negative	9	19
<i>hlg</i>	Positive	6	14
	Negative	8	6

Chart 2: Results for the p values for comparisons between the PCR of resistance genes for the two hospitals.

PCR blaZ				PCR mecA			
Chi-Square Tests				Chi-Square Tests			
	Value	Df	Asymp. Sig. (2-sided)		Value	Df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	6,129 ^a	2	,047	Pearson Chi-Square	27,421 ^a	2	,000
Likelihood Ratio	6,219	2	,045	Likelihood Ratio	30,998	2	,000
N of Valid Cases	113			N of Valid Cases	125		
a. 0 cells (0,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 11,50.				a. 0 cells (0,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 8,98.			
PCR ermA				PCR ermC			
Chi-Square Tests				Chi-Square Tests			
	Value	Df	Asymp. Sig. (2-sided)		Value	Df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	8,098 ^a	2	,017	Pearson Chi-Square	10,147 ^a	2	,006
Likelihood Ratio	9,743	2	,008	Likelihood Ratio	12,096	2	,002
N of Valid Cases	141			N of Valid Cases	140		
a. 2 cells (33,3%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1,60.				a. 0 cells (0,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 5,97.			

Chart 3: Results for the p values for comparisons between the PCR of virulence genes for the two hospitals.

PCR icaAD					
Chi-Square Tests					
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	,204 ^a	1	,651		
Continuity Correction ^b	,006	1	,940		
Likelihood Ratio	,208	1	,648		
Fisher's Exact Test				,725	,479
N of Valid Cases	40				
a. 1 cells (25,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 3,60.					
b. Computed only for a 2x2 table					
PCR hlg					
Chi-Square Tests					
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	2,505 ^a	1	,113		
Continuity Correction ^b	1,510	1	,219		
Likelihood Ratio	2,514	1	,113		
Fisher's Exact Test				,163	,110
N of Valid Cases	34				
a. 0 cells (0,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 5,76.					
b. Computed only for a 2x2 table					

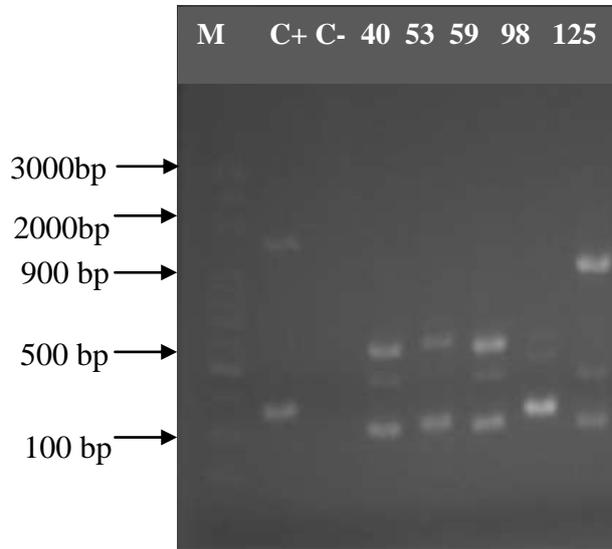


Figure 1: Agarose gel 2% of the PCR amplification representative of the type of *ccr*. Positive samples for *mecA*.

Note: Line M, molecular weight marker (100pb DNA *ladder*, Amresco). Line C+, Positive Control (*ccr3*, 1791 bp). Line C-, Negative Control.

29/12/2016

Gmail - AMAB-D-16-02996 - Submission Confirmation



Marcelle Aquino <marcellearabelo@gmail.com>

AMAB-D-16-02996 - Submission Confirmation

AMB Editorial Office <em@editorialmanager.com>
Responder a: AMB Editorial Office <ethel.dionela@springer.com>
Para: Marcelle Rabelo <marcellearabelo@gmail.com>

28 de dezembro de 2016 22:01

CC: stephanietargino@hotmail.com, ju-biomed@hotmail.com, nathregina@hotmail.com, arimatearocha@yahoo.com.br, aalmeida@cpqam.fiocruz.br, nilma@cpqam.fiocruz.br, macielufpe@gmail.com

Dear Mrs Rabelo,
Dear Co-Author(s),

Your submission entitled "PATHOGENICITY AND RESISTANCE OF Staphylococcus spp. IN ONCOLOGIC AND NON ONCOLOGIC PATIENTS IN TWO HOSPITALS OF RECIFE CITY/PE" has been received by Applied Microbiology and Biotechnology

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author. The URL is <http://amab.edmgr.com/>. (This applies to the corresponding author only.)

The submission id is: AMAB-D-16-02996
Please refer to this number in any future correspondence.

Thank you for submitting your work to our journal.

Kind regards,

Editorial Office
Applied Microbiology and Biotechnology

PS: If there would be any concern regarding authorship, please contact the Managing Editor (Dr. Dorothea Kessler) at AMBoffice@gmx.de

Now that your article will undergo the editorial and peer review process, it is the right time to think about publishing your article as open access. With open access your article will become freely available to anyone worldwide and you will easily comply with open access mandates. Springer's open access offering for this journal is called Open Choice (find more information on www.springer.com/openchoice). Once your article is accepted, you will be offered the option to publish through open access. So you might want to talk to your institution and funder now to see how payment could be organized; for an overview of available open access funding please go to www.springer.com/oafunding.
Although for now you don't have to do anything, we would like to let you know about your upcoming options.

Apêndice B**VANCOMYCIN RESISTANCE AND *Staphylococcus* spp. INFECTION RISK FACTORS IN ONCOLOGIC PATIENTS OF THE CITY OF RECIFE-PE**

Marcelle Aquino Rabelo¹, Paula Regina Luna de Araújo Jácome¹, Cynthia Regina Pedrosa Soares¹, Jailton Lobo da Costa Lima¹, Armando Monteiro Bezerra Neto¹, Paulo Sérgio Ramos Araújo², Nilma Cintra Leal², Maria Amélia Vieira Maciel¹

¹Tropical Medicine Department, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

²Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – CPqAM- FIOCRUZ – Recife, Pernambuco, Brazil

Marcelle Aquino Rabelo

1235, Prof. Moraes Rego ave., Cidade Universitária CEP: 50670-901, Recife, PE, Brazil (e-mail:marcellearabelo@gmail.com)

Bacterial infections, one of the main complication causes in cancer patients, the *staphylococci* infections are highlighted as being especially difficult to treat. Therefore, the objective of this study was to identify vancomycin resistance in *Staphylococcus* spp and the most prevalent risk factors for oncologic patients in the city of Recife-PE. Isolates from *Staphylococcus* spp. were collected in 51 patients in an oncology hospital. The obtained isolates were tested regarding the antimicrobial susceptibility and methicillin resistance gene presence. The antimicrobial susceptibility was seen through screening and microdilution. The information about the patients were acquired through the revisions of the filed medical reports. Regarding the antimicrobial susceptibility tested, it was observed that 23,5% of the isolates were resistant to cefoxitin and 21,6% to oxacillin. It was observed that 29,5% of the isolates were resistant to vancomycin through screening. After statistical association tests, it was observed a significant difference when compared to individuals infected with *Staphylococcus* spp. carriers *mecA* gene and the individuals infected with *Staphylococcus* spp. without *mecA* gene in relation to the neutrophil counts during the infection time. As for the total leukocytes counts in the infection time (mm^3), the difference between individuals infected with *Staphylococcus* spp. vancomycin resistant and the individuals infected with *Staphylococcus* spp. vancomycin sensible was also observed. One isolate showed MIC of 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Hence, the total leukocytes and the neutrophil counts were associated to the vancomycin resistance in this group of patients.

Keywords: *Staphylococcus* spp., cancer patients, resistance, vancomycin.

Introduction

Infections related to health care are highly relevant in epidemiological terms, in the context of health care, as well as in hospital care, because they contribute to increase morbidity and mortality rates and the length of hospital stay of patients, with a consequent increase of treatment costs (Hirao et al., 2012). Individuals with immunological activity compromised by conditions such as cancer, transplantation, hemodialysis, and aging often become infected with *Staphylococcus* spp. Gram-positive bacteria account for 60-70% of infection episodes in patients with neutropenia and the most frequent microorganisms are coagulase-negative *Staphylococcus* and vancomycin resistant *Enterococcus* (Cataneo et al., 2011). The *Staphylococcus aureus* methicillin resistant (MRSA) infection is problematic, as antibiotic therapy is often difficult and results in failure because this organism is resistant to various antimicrobial agents (Hirao et al., 2012; Quiles et al., 2015).

The gradual increase in resistance of microorganisms to antimicrobials used in antibacterial therapy has effectively contributed to hospital infection which has become a public health problem not only in Brazil but in most countries around the world (Cataneo et al., 2011). After the appearance of MRSA strains, the glycopeptide vancomycin has been one of the options for the effective treatment of staphylococcal infections during the last two decades (Lutz et al., 2003; Sangappa & Thiagarajan, 2012; Van Hal et al., 2012).

In cancer patients, risk factors can overlap because, in addition to immune suppression, they undergo surgical treatment, chemotherapy and / or radiation therapy. Neutropenia induced by chemotherapy represents one of the main risks of infection in this population (Cataneo et al., 2011; Costa et al., 2015). These patients, for the most part, use broad spectrum antimicrobials and undergo numerous invasive procedures (Cataneo et al., 2011).

In view of these evidences, this study aimed to identify the resistance to antimicrobials that act on the bacterial cell wall and the most prevalent risk factors for infection by *Staphylococcus* spp. in cancer patients from the city of Recife-PE, in the year of 2013. Thus, the genetic and microbiological analysis will allow the mapping of bacterial strains through hospitalization characteristics and resistance factors, which will facilitate the tracing of rational antimicrobial use and treatment of infections in the hospital under study.

Materials and methods

An observational study was carried out to correlate the risk factors associated with antimicrobial resistance in the patients from an oncology hospital (Hospital do Câncer-HCP) in Recife city, PE, Brazil , through bacterial isolates collected during the one-year period.

The clinical data were obtained in medical records, using a specific research form.

The collected isolates were transported in Casoy Agar and incubated for 24 hours. The isolates were identified by macroscopic characteristics on 5% blood agar plates, Gram staining and the catalase, coagulase, DNase and Manitol fermentation tests (CLSI, 2014).

Oxacillin, cefoxitin and teicoplanin susceptibility.

Oxacillin, cefoxitin and teicoplanin susceptibility test were made by the disk diffusion technique in Mueller-Hinton Agar plates (CLSI, 2014). The Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) interpretive breakpoints were considered (CLSI, 2014).

Screening of Oxacillin and Vancomycin

Subcultures were made in nutrient agar plates of the isolates that were resistant to oxacillin and/or cefoxitin in disk diffusion technique. All isolates were subjected to screening of vancomycin. It was made direct suspension of colonies to obtain a turbidity to a standard

solution of 0.5 and 2 McFarland scale, respectively for the oxacillin and vancomycin tests. The tests were performed according to Burnham et al., 2010, Howden et al., 2010 and CLSI, 2014. Were used as quality control standard strains for MRSA and MSSA: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 – Sensitive and *Staphylococcus aureus* ATCC 33591 – Resistant and *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 – Sensitive e *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 – Resistant to vancomycin resistance (CLSI, 2014).

Vancomycin Microdilution Broth

The isolates identified as resistant to vancomycin by the screening test were submitted to microdilution in broth to obtain the minimum inhibitory concentration (MIC). Experiments were performed according to standard procedures (CLSI, 2014) by serial dilutions (from 128 µg / mL to 1 µg / mL) in microplates. At each dilution, 15µL of the bacterial suspension, standard 0.5 of the McFarland scale, is inoculated. After the microplates were inoculated, and incubated at 37 °C for 24 hours and for 48 hours. The reading was done at both times in order to detect the bacterial growth of all the bacterial populations present in the inoculum of the microplates. MIC is determined as the lowest concentration that does not exhibit turbidity, or bacterial growth (CLSI, 2014).

Standard strains were used as quality control: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 - Sensitive and *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 - Resistant (CLSI, 2014).

Total DNA extraction

Total DNA was extracted from the isolates following Freitas et al.(2008) the DNA obtained was quantified using nanodrop 2000 (Thermo Scientific).

Identification of the *mecA* gene by PCR

The presence of the *mecA* gene was assessed by PCR among the oxacilin and/or cefoxitin phenotypically resistant isolates using the primers described by Petinaki et al (2001). The PCR reactions were individually prepared in a final volume of 25µL containing: 20ng of genomic DNA, 20pmol of each primer, MgCl₂ 1,5mM, dNTP 200µM, 1U of Go Taq DNA polimerase (Promega, Brazil) and 5µL of Green Go Taq DNA polimerase buffer (Promega, Brazil). The reactions were performed in a thermocycler (Biometra), set for 35 cycles of one minute at 94°C, one minute at 55°C and two minutes at 72°C followed by a final-step of 15 minutes at 72°C. As negative control, a tube containing all the components of the mixture without DNA and for positive control DNA from the strain *Staphylococcus aureus* ATCC 33591 – Resistant were used.

Identification of beta-lactamase gene (*blaZ*) by PCR

The presence of the *blaZ* gene was assessed by PCR among the oxacilin and/or cefoxitin phenotypically resistant isolates using the primers described by Milheiriço et al (2011). The PCR reactions were individually prepared in a final volume of 25µL containing: 20ng of genomic DNA, 20pmol of each primer, 2,5µL of MgCl₂ (25mM), 2,5µL dNTP (200µM), 1U of Go Taq DNA polimerase (Promega, Brazil) and 5µL of Green Go Taq DNA polimerase buffer (Promega, Brazil). The reactions were performed in a thermocycler (Biometra), set for 30 cycles composed of one minute at 92°C, one minute at 55°C and two minutes at 72°C followed by a final step of seven minutes at 72°C. A tube containing all the components of the mixture without DNA was used as negative control and DNA from the isolate code 1171 from the Culture Collection from the Microbiology Departament from the FIOCRUZ-PE, positive for the gene *blaZ* confirmed by sequencing, was used as positive control.

The products of all amplifications were electrophoresed in 1% agarose gels, stained with Blue-Green (LGC Biotechnology), visualized in UV transilluminator and scanned by Kodak 1D software version 3.5.2 (Scientific Imaging Systems, USA). The molecular weight marker 100bp DNA ladder (Invitrogen) was used.

Ethical Considerations

This study was approved by the Ethics Committee of Fighting Cancer's Society from Pernambuco– CEP/SPCC (CAAE N° 05554812.7.0000.5205).

Data Analysis

Clinical and microbiological data were introduced in SPSS Statistics 20 software for statistical analysis through frequency distribution, χ^2 test, Fisher's Test and Mann-Whitney test, adopting $p < 0,05$.

Results

Isolates from *Staphylococcus* spp. of 51 patients from an oncology hospital in the city of Recife-PE were collected during the year 2013. The most frequent type of sample was blood culture, followed by secretions as shown in Table 1. Only four isolates were identified as coagulase negative *Staphylococcus* and the remaining 47 as *S. aureus* (Table 1).

Regarding the antimicrobials tested, it was observed that 23.5% of the isolates were resistant to cefoxitin, 21.6% to oxacillin and 15.7% to teicoplanin (Table 2). The 20 isolates that showed resistance to oxacillin and / or cefoxitin were subjected to oxacillin screening and 40% of these were resistant as shown in Table 2. Among the isolates that underwent vancomycin screening, 13 (29.5%) were identified as resistant (Table 2).

Isolates that showed resistance to oxacillin and / or ceftazidime and / or oxacillin screening were submitted to detection of the *blaZ* and *mecA* genes by PCR. Among the isolates studied, they were positive in 50% (nine isolates) and 77.7% (14 isolates), respectively for the *blaZ* and *mecA* gene (Table 3).

For the verification of association between variables, they were classified into dependent variables and independent variables. As dependent variables: Screening of oxacillin, vancomycin Screening, *blaZ* gene and *mecA* gene were classified. These variables were categorized as present or absent, except the oxacillin and vancomycin screening variables that were categorized as sensitive or resistant.

The independent variables for this study were: Gender, age, total count of leukocytes at the time of infection (mm^3), neutrophil count at the time of infection, use of antimicrobial in the last 3 months prior to current hospitalization, use of antimicrobial during isolation of the pathogen, use of antimicrobials during the current hospitalization, clinical evolution (discharge or death), central venous access and peripheral venous access. For each dependent variable, the association with all independent variables was tested. According to the data, it was observed that there were no significant differences in age, gender, total count of leukocytes in the period of infection (mm^3), use of antimicrobial in the last 3 months before the current hospitalization, use of antimicrobial during isolation Of the pathogen, use of antimicrobials during the current hospitalization, clinical evolution, presence of central venous access and presence of peripheral venous access when compared to infected individuals *Staphylococcus* spp. positive for the *mecA* gene and infected individuals *Staphylococcus* spp. negative for the *mecA* gene. The same was observed for the presence of the *blaZ* gene. The same inference can be made for the results of associations with oxacillin screening and vancomycin screening.

There was a significant difference when compared infected individuals with *Staphylococcus* spp. carriers the *mecA* gene and infected individuals with *Staphylococcus* spp. without the *mecA* gene in relation to the neutrophil count at the time of infection. A significant difference was also observed when compared infected individuals with *Staphylococcus* spp. with vancomycin resistant screening and infected individuals with *Staphylococcus* spp. with vancomycin-sensitive screening in relation to total leukocyte count at the time of infection (mm 3) (Table 4). Thirteen resistant isolates were observed through the vancomycin screening technique, and they were submitted to microdilution in broth. In the first reading, with 24 hours, all isolates showed to be sensitive (Table 1). In the second reading, at 48 hours, an isolate presented MIC of 4 µg / mL (Table 1). Data on three of these patients were not obtained (Table 1). All of these patients used some type of antimicrobial during hospitalization and in the period of isolation of *Staphylococcus* spp. And in 80% of them, the same antimicrobial used in both situations (Table 1). The drug Piperacillin + tazobactam was the antimicrobial prescribed in most cases studied and only two patients took vancomycin at some time (Table 1).

Discussion

In patients with malignant neoplasms, bacteremia often results from infection with one or more microorganisms, predominantly members of the family Enterobacteriaceae, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus* e *Staphylococcus* (Cataneo et al, 2011; Quiles et al., 2015). Over the past three decades, the proportion of Gram-positive microorganisms has increased because of the widespread use of permanent catheters (Montassier et al., 2013). In relation to the use of central vascular catheter, *S. aureus* and coagulase-negative

Staphylococcus (S_{CoN}) are the most frequently isolated microorganisms, representing 30% each (Bustamante & Espinola, 2007; Muldrew et al., 2008; Schaefer et al., 2009).

In this study, a higher frequency of *S. aureus* was observed in relation to the isolates identified as coagulase negative *Staphylococcus* (S_{CoN}), mainly from blood culture and catheter tip with percentages of 25,5% and 13,7%, respectively. Studies report that the main sites of isolation of this microorganism in cancer patients are blood and catheter (Cataneo et al., 2011; Montassier et al., 2013; Quiles et al., 2015).

In relation to the antimicrobial susceptibility test, the presence of teicoplanin resistant isolates was observed. Teicoplanin is often used as an alternative to vancomycin and resistance to it is sometimes related as a predictor of resistance to glycopeptides (CLSI, 2014; Byrne et al., 2015). A retrospective study evaluated the nephrotoxicity of teicoplanin at various concentrations in patients with hematological malignancies, considering it a good option for this group of patients (Byrne et al., 2015).

From the phenotypic tests, resistant isolates were selected for the detection of genes *bla_Z* e *mecA* por PCR, being 50% and 77,7% of positive samples respectively. Some studies have shown that the rate of beta-lactamase production varies from 55,7% to 92,6% for *Staphylococcus* (Oliveira et al., 2011; Samant & Pai, 2012), being our results within these limits. Oliveira et al (2011) found high prevalence of beta-lactamase in their isolates (83%) and called attention to the indiscriminate use of antimicrobials, which generates resistance to several classes of these drugs and a potential risk to public health. A study conducted in India by Prabhash et al. (2010) reported a rate of 18% of methicillin-resistant *S. aureus* isolated from cancer patients. Another study carried out in South Korea by Kang et al.(2012), reported a prevalence of MRSA related to bacteremia in cancer patients of 48.4%, a percentage lower than that found in our study, demonstrating that the frequency of *S. aureus* infection in this group of patients is variable worldwide. In this study, we observed the presence of

methicillin-resistant samples only by phenotypic methods, which suggests the presence of other mechanisms of resistance or non-expression of the genes searched (Petinaki et al., 2001; Milheiriço et al., 2011; Sangappa & Thiagarajan, 2012; CLSI, 2014).

Among the isolates submitted to the vancomycin screening, 29,5% of the tested isolates were identified as resistant, according to the *Comitê Brasileiro de Testes de Sensibilidade aos Antimicrobianos* -Brazilian Committee of Antimicrobials Sensibility tests (Br CAST, 2015). *Staphylococcus* resistant to glycopeptides were recently found in Brazil, being registered the isolation of *S. aureus* resistant to vancomycin in São Paulo (Rossi et al., 2014; Panesso et al., 2015).

Another former study of a university hospital reported 11% of the isolates resistant using a screening method, however only samples considered MRSA were tested (Rabelo et al., 2014). Studies show that the resistance to vancomycin must be determined by sensible techniques such as screening, E-test, microdilution and the detection of the gene (Burnham et al., 2010; Howden et al., 2010; CLSI, 2014; Rossi et al., 2014; Navarini et al., 2015; Panesso et al., 2015). A study made by Navarini et al.(2015) assessed the accuracy of the screening test to the concentration of 2mg/L in comparison to the microdilution in broth and Etest™ for the detection of isolates of *S. aureus* with a possible diminution of the susceptibility to vancomycin with good accuracy (Navarini et al., 2015).

The inefficiency of the vancomycin treatment in oncologic patients is frequent in *Enterococcus* spp. infections (Schaefer et al., 2009; Cataneo et al., 2011; Montassier et al., 2013; Quiles et al., 2015). Nevertheless, data regarding vancomycin resistant *Staphylococcus* spp. Infection are still scarce, especially in this group of patients.

According to collected data, statistically significant differences happened when individuals infected with *Staphylococcus* spp. that harbored the gene *mecA* were compared to individuals infected with *Staphylococcus* spp. without the gene *mecA* in relation to the

neutrophil counts in the infection period. Also, significant differences were noticed when individuals infected with *Staphylococcus* spp. vancomycin resistant and non-resistant were compared by the *screening* technique in relation to the leukocytes counts and the total count of leukocytes in the infection period (mm^3).

Neutropenia is frequently related as a risk factor for the colonization of several microorganisms, increase in the length of hospitalization time and death in patients with any type of oncology (Santolaya et al., 2004; Bucaneve et al., 2005; Cagol et al., 2009; Schaefer et al., 2009; Kabalan et al., 2010; Paul et al. 2010; Cataneo et al., 2011; Freifeld et al., 2011; Kang et al., 2012; Montassier et al., 2013; Costa et al., 2015; Quiles et al., 2015).

Conversely, *mecA* gene is related to the presence of methicillin resistance (Petinaki et al., 2001; Sangappa & Thiagarajan, 2012; CLSI, 2014; Panesso et al., 2015) and the therapy with vancomycin is frequently administered in patients with severe infections and in patients that show resistance to other antibiotics (Lutz et al., 2003; Burnham et al., 2010; Howden et al., 2010; CLSI, 2014; Rossi et al., 2014; Panesso et al., 2015). These facts seem to corroborate to the association of the factors found in this study. The infection risk factors in this group of patients are more expressive, because beyond the immunocompromise of the own pathology, they are submitted to surgical, chemical and radio therapies, being neutropenia one of the main infection risk factors for this population (Costa et al., 2015). There are evidences that low risk neutropenic patients do not necessarily need hospitalization and ample spectrum antibiotic therapy for bacterial invasive infections. The strategies for this group include short term antimicrobial treatments with consequent reduction of hospitalization period and ambulatorial management with oral antibiotic usage (Santolaya et al., 2004; Cagol et al., 2009).

Among the isolates considered resistant to vancomycin by the screening method, one isolate showed MIC of 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The minimal inhibit concentration (MIC) of Vancomycin is

8 µg/mL, however other *S. aureus* isolates with minor MIC of vancomycin (4 µg/mL) may also be resistant *in vivo* (Lutz et al., 2003; CLSI, 2014). The presence of such organisms may explain the failure of vancomycin for treating some MRSA infections (Lutz et al, 2003;. CLSI, 2014). The study reports that the main characteristic of these isolates is to exhibit diminished susceptibility to vancomycin *in vivo*, after prolonged exposition to the drug (Lutz et al., 2003). The patient in question, in our study did not make use of vancomycin in his treatment, evolving to discharge from the hospital, what made it impossible to make this type of association in him.

It is suggested that the failure in the therapeutic treatment with vancomycin is associated with the low level of resistance, or hetero resistance to vancomycin (Lutz et al., 2003 Van Hal et al., 2012).

The effective identification of the causing agent and the correct choice of the antimicrobial treatment are crucial to reduce mortality in cancer patients with bacterial infections.

Acknowledgements

This work was supported by FACEPE (Fundação de Amparo Ciência do Estado de Pernambuco) grant n° APQ 0579-2.12/06, PROPESQ (Pró-Reitoria para Assuntos de Pesquisa e Pós-Graduação-UFPE) for the Edital PQ-Multiusuário-2010/Propesq n° 23076.024115/2010-91 and CNPq (protocolo number 474131/2011-4). CAPES for the scholarship provided. The Hospital das Clínicas' bacteriology laboratory for providing some samples and CIAC laboratory, Hospital do Câncer de Pernambuco, for providing some samples and information records. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM) for providing space for the molecular techniques realization. There aren't no potential conflict of interest.

References

Br CAST (Comitê Brasileiro de Testes de Sensibilidade aos Antimicrobianos). Orientações do EUCAST para a detecção de mecanismos de resistência e resistências específicas de importância clínica e/ou epidemiológica. Versão para o Português, Janeiro 2015.

Byrne CJ, Egan S, Fennell JP et al., Teicoplanin use in adult patients with haematological malignancy: Exploring relationships between dose, trough concentrations, efficacy and nephrotoxicity. *Int J Antimicrob Agents*. 2015; 46(4):406–412.

Bucaneve G, Miozzi A, Menichetti F et al. A levofloxacin to prevent bacterial infection in patients with cancer and neutropenia. *The New Engl J Med* 2005; 353(10): 977-987.

Burnham CAD, Weber CJ, Dunne Jr WM. Novel screening agar for detection of vancomycin-nonsusceptible *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2010; 48(3): 949–951.

Bustamante R., Espinola V. Informe de vigilância epidemiológica de infecciones intrahospitalarias. Unidad de infecciones intrahospitalarias. Departamento de Calidad em Salud Subsecretaria de redes asistenciales, *MINSAL*, Chile 2007.

Cagol AR, Castro Junior CG, Martins MC et al. Oral vs. intravenous empirical antimicrobial therapy in febrile neutropenic patients receiving childhood cancer chemotherapy. *J de Ped* 2009; 85(6): 531-535.

Cataneo C, Canini SRMS, Castro PTO et al. Avaliação da sensibilidade e da especificidade dos critérios para isolamento de pacientes admitidos em um hospital especializado em oncologia. *Rev Latino-Am Enfer* 2011; 19(5):1072-1079.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, twenty-fourth informational supplement, document M100-S24. Wayne, PA, USA: CLSI, 2014.

Costa PO, Atta EH, Silva ARA. Infection with multidrug-resistant gram-negative bacteria in a pediatric oncology intensive care unit: risk factors and outcomes. *J Pediatr (Rio J)* 2015; 91(5):435-441.

Freifeld AG, Bow EJ, Sepkowitz KA et al. Clinical practice guideline for the use of antimicrobial agents in neutropenic patients with cancer: 2010 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Infect Dis Soc Am* 2011; 52(4):427–431.

Freitas MFL, Luz IS, Silveira-Filho VM et al. Staphylococcal toxin genes in strains isolated from cows with subclinical mastitis. *Pesq Vet Bras* 2008; 28(12): 617-621.

Hirao, Y.; Ikeda-Dantsuji, Y.; Matsui, H.; Yoshida, M.; Hori, S.; Sunakawa, K.; Nakae, T.; Hanaki, H. Low level β -lactamase production in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains with β -lactam antibiotics-induced vancomycin resistance. *BMC Microbiol* 2012; 12:69.

Howden BP, Davies JK, Johnson PDR et al. Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. *Clin Microbiol Rev* 2010; 23(1): 99–139.

Kabalan B, Rodriguez N, Tordecilla J et al. Infecciones de catéter venoso central e lock terapia em pacientes oncológicos. *Rev Chil Pediatr* 2010; 81(5): 425:431.

Kang CI, Song JH, Chung DR et al. Bloodstream infections in adult patients with cancer: clinical features and pathogenic significance of *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Support Care Cancer* 2012; 20 (10):2371–2378.

Lutz, L.; Machado, A.; Kuplich, N.; Barth, A.L. Clinical Failure of Vancomycin Treatment of *Staphylococcus aureus* Infection in a Tertiary Care Hospital in Southern Brazil. *The Braz J of Infect Dis*. 2003;7(3):224-228.

Milheiriço C, Portelinha A, Krippahl L et al. Evidence for a purifying selection acting on the betalactamase locus in epidemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiology* 2011; 11(1): 76.

Montassier E, Batar E, Gastinne T et al. Recent changes in bacteremia in patients with cancer: a systematic review of epidemiology and antibiotic resistance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2013; 32:841–850.

Muldrew KL, Tang YW, Li H, Stratton CW. Clonal Dissemination of *Staphylococcus epidermidis* in an Oncology Ward . *J Clin Microbiol* 2008; 46(10): 3391–3396.

Navarini, A.; Martino, M.D.V.; Sasagawa, S.M.; Massaia, I.F.D.; Mimica, M.J. Accuracy of a vancomycin brain heart infusion screening plate for the screening of *Staphylococcus aureus* isolates with increased vancomycin minimum inhibitory concentrations. *New Microbiol* 2015; 38: 423-426.

Oliveira AAF, Pinheiro Jr JW, Mota RA ET al. Phenotype characterization of *Staphylococcus* species strains isolated from buffalo (*Bubalus bubalis*) milk. *J Vet Diag Invest* 2011; 23(6): 1208-1211.

Panesso D, Planet PJ, Diaz L et al. Methicillin-Susceptible, Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus*, Brazil. *Emerg Infect Dis* 2015; 21(10): 1844-1848.

Paul M, Shani V, Muchtar E et al. Systematic review and meta-analysis of the efficacy of appropriate empiric antibiotic therapy for sepsis. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 4851-4863.

Petinaki E, Arvaniti A, Dimitracopoulos G et al. Detection of *mecA*, *mecRI* and *mecI* genes among clinical isolates of methicillin-resistant staphylococci by combined polymerase chain reactions. *J. Antimicrob. Chemother* 2001; 47(3): 297-304.

Prabhash K, Medhekar A, Ghadyalpatil N et al. Blood stream infections in cancer patients: a single center experience of isolates and sensitivity pattern. *Indian J Cancer* 2010; 47:184–188.

Quiles MG, Menezes LC, Bauab KC et al. Diagnosis of bacteremia in pediatric oncologic patients by in-house real-time PCR. *BMC Infect Dis* 2015; 15:283.

Rabelo MA, Bezerra Neto AM, Loibman SO et al. The occurrence and dissemination of methicillin and vancomycin-resistant *Staphylococcus* in samples from patients and health professionals of a university hospital in Recife, State of Pernambuco, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop* 2014; 47(4): 437-446.

Rossi F, Diaz L, Wollam A et al. Transferable Vancomycin Resistance in a Community-Associated MRSA Lineage. *N Engl J Med* 2014; 370:1524-31.

Samant SA, Pai CG. Comparative evaluation of β lactamase detection methods in *Staphylococci*. *Int J Res Pharm Biom Scien* 2012; 3(4) 1580-1588.

Sangappa M, Thiagarajan P. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: resistance genes and their regulation. *Int J Pharm Pharmac Scien* 2012; 4(1):658-667.

Santolaya ME, Alvarez AM, Avilés EL et al. Early hospital discharge followed by outpatient management versus continued hospitalization of children with cancer, fever, and neutropenic at low risk for invasive bacterial infection. *J Clin Oncol* 2004; 22:3784-3789.

Schaefer AM, McMullen KM, Mayfield JL et al. Risk Factors Associated with Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Colonization on Hospital Admission among Oncology Patients. *Am J Infect Control* 2009; 37(7): 603–605.

Van Hal, S. J.; Lodise, T.P.; Paterson, D.L. The Clinical Significance of Vancomycin Minimum Inhibitory Concentration in *Staphylococcus aureus* Infections: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2012; 54(6):755–771.

Tables

Table 1: Distribution of *Staphylococcus spp.* isolates from the patients by sample and species type.

Sample type	<i>S.aureus</i>	SCoN	Total
Blood	12	1	13
Catheter tip	6	1	7
Peritoneal fluid	1	0	1
Tracheal aspirates	6	0	6
Wounds	3	0	3
Diverse secretions	10	0	10
Urine	1	1	2
Vaginal discharge	1	0	1
Fist tumor	1	0	1
Ascites fluid	1	1	2
Soft tissue of the arm	1	0	1
Chest wall	1	0	1
Abscess secretion	2	0	2
Breast secretion	1	0	1
TOTAL	47	4	51

Table 2: Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus* spp. from oncologic patients.

Susceptibility test	Test result	
	Sensitive	Resistant
Oxacillin disk diffusion	40	11
Cefoxitin disk diffusion	39	12
Teicoplanin disk diffusion	43	8
Oxacillin screening	12	8
Vancomycin screening	31	13

Table 3: Results of PCR for *blaZ* and *mecA* genes.

PCR type	Result	Number of isolates
<i>blaZ</i>	Positive	9
	Negative	9
<i>mecA</i>	Positive	14
	Negative	4

Table 4: Clinical and demographic variables of oncologic patients in the year 2013.

Variables	N	%
Gender		
Male	20	
Female	31	
Total	51	100
Age (years)		
Mean	48,76	
Median	52,50	
Standard deviation	13,157	
Range (minimum-maximum)	10-67	
Total count of leukocytes at the time of infection (mm³)		
Mean	11411,86	
Median	9200,00	
Standard deviation	10318,853	
Range (minimum-maximum)	600-51200	
Neutrophil count at infection time		
Mean	8712,18	
Median	6730,50	
Standard deviation	9133,374	
Range (minimum-maximum)	90-43520	
Antimicrobial use in the last 3 months before the current hospitalization		
Yes	4	11,77
No	30	88,23

Antimicrobial use during pathogen isolation

Yes	27	79,41
No	7	20,59

Antimicrobials use during the current hospitalization

Yes	27	79,41
No	7	20,59

Clinical evolution

Hospital discharge	20	58,82
Death	14	41,18

Mechanical ventilation

Yes	7	20,59
No	27	79,41

Central venous access

Yes	13	38,23
No	21	61,77

Peripheral venous access

Yes	25	73,53
No	9	26,47

Bladder catheter

Yes	18	52,94
No	16	47,06

Chart 1: Sampling characteristics of the cancer hospital in the year of 2013, related to the vancomycin susceptibility profile

Sample	Micro-organism	Microdilution 24 hs	Microdilution 48 hs	Antimicrobial use during the current hospitalization	Antimicrobial use during the isolation of the pathogen	Clinical Closure	Tumor type
Catheter edge	<i>S. aureus</i>	1µg/mL	2µg/mL	Oxacillin	Oxacillin	Hospital discharge	invasive duct Carcinoma
Tibia Secretion	<i>S. aureus</i>	1µg/mL	4µg/mL	Cephalothin	Cephalothin	Hospital discharge	Right proximal tibia's tumor
Blood	<i>S. aureus</i>	1µg/mL	2µg/mL	Piperacillin+tazobactam	Piperacillin+tazobactam	death	Primary tongue tumor with dissemination to the neck
Blood	<i>S. aureus</i>	1µg/mL	2µg/mL	Piperacillin+tazobactam	Piperacillin+tazobactam	Hospital discharge	Adenocarcinoma with differentiation in anal canal
Blood	<i>S. aureus</i>	1µg/mL	2µg/mL	Piperacillin+tazobactam	Piperacillin+tazobactam	death	Left breast duct carcinoma
Proximal left Tibia secretion	<i>S. aureus</i>	1µg/mL	1µg/mL	Ceftazidime	Ceftazidime	Hospital discharge	Tibia's tumor
Trachea Secretion	<i>S. aureus</i>	1µg/mL	2µg/mL	Piperacillin+tazobactam and vancomycin	Piperacillin+tazobactam	Hospital discharge	Endometrium adenocarcinoma
Abscess secretion	<i>S. aureus</i>	1µg/mL	1µg/mL	Meropenem	Piperacillin+tazobactam and vancomycin	death	cervix neoplasia
Blood	<i>S. aureus</i>	1µg/mL	1µg/mL	Piperacillin+tazobactam	Piperacillin+tazobactam	death	Tongue CEC
Blood	SCoN	1µg/mL	1µg/mL	Piperacillin+tazobactam	Piperacillin+tazobactam	death	Left ovary tumor with lung metastasis

15/01/2017

Gmail - Submission Confirmation for Journal of Medical Microbiology article JMM-D-17-00036 - [EMID:8c8fff2686200d30]



Marcelle Aquino <marcellearabelo@gmail.com>

Submission Confirmation for Journal of Medical Microbiology article JMM-D-17-00036 - [EMID:8c8fff2686200d30]

1 mensagem

JMM <em@editorialmanager.com>

15 de janeiro de 2017 18:09

Responder a: JMM <jmm@microbiologysociety.org>

Para: Marcelle Rabelo <marcellearabelo@gmail.com>

CC: paulajacome83@gmail.com, cynthiaregina@msn.com, jailtonlobo@hotmail.com, monteiro.armando10@gmail.com, psergiora@gmail.com, nilma@cpqam.fiocruz.br, amelia57@gmail.com

Ms. No. JMM-D-17-00036

VANCOMYCIN RESISTANCE AND Staphylococcus spp. INFECTION RISK FACTORS IN ONCOLOGIC PATIENTS OF THE CITY OF RECIFE-PE

Marcelle Rabelo; Paula Regina Luna de Araújo Jácome; Cynthia Regina Pedrosa Soares; Jailton Lobo da Costa Lima; Armando Monteiro Bezerra Neto; Paulo Sérgio Ramos Araújo; Nilma Cintra Leal; Maria Amélia Vieira Maciel

Dear Mrs. Rabelo,

Your submission entitled "VANCOMYCIN RESISTANCE AND Staphylococcus spp. INFECTION RISK FACTORS IN ONCOLOGIC PATIENTS OF THE CITY OF RECIFE-PE" has been received by Journal of Medical Microbiology

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author. The URL is <http://jmm.edmgr.com/>.

Your manuscript reference number is JMM-D-17-00036. Please use this in all correspondence relating to this manuscript.

Thank you for submitting your work to Journal of Medical Microbiology.

Yours sincerely,

Journal of Medical Microbiology

IMPORTANT INFORMATION:

Please note that we cannot publish the accepted version of the manuscript without a completed Licence to Publish form. In addition, for papers reporting new sequence data, papers will not be published online until the sequence data are released in public databases.

Please make sure you check the details you have entered into the Editorial Manager site very carefully, particularly the manuscript title, subject category and author details, as these will be used when your accepted PDF is published online.

ANEXOS

Anexo A- Questionário de pesquisa

FORMULÁRIO DE PESQUISA			
Data da pesquisa:		Número do formulário:	
INFORMAÇÕES GERAIS DO PACIENTE			
Nome:			
Sexo:	(1) Masc (2) Fem		
Idade:			
INFORMAÇÕES HOSPITALARES			
Hospital de origem:	(1)Hospital da Clínicas/UFPE (2) Hospital do Câncer		
Setor de internamento:			
Tempo de internamento até diagnóstico da infecção por <i>Staphylococcus spp.</i> :			
Uso de antimicrobiano nos últimos 3 meses antes do atual internamento:	(1)Sim (2) Não Se sim, qual o nome do antimicrobiano utilizado:		
Uso de antimicrobiano durante o atual internamento:	(1)Sim (2) Não Se sim, qual o nome do antimicrobiano utilizado:		
Uso de antimicrobiano durante o isolamento do patógeno:	(1)Sim (2) Não Se sim, qual o nome do antimicrobiano utilizado:		
Evolução clínica:	(1)Alta hospitalar (2) Óbito		
Óbito relacionado ao quadro infeccioso atual:	(1)Sim (2)Não (3)Não se aplica		
Ventilação mecânica:	(1)Sim (2) Não		
Acesso venoso central:	(1)Sim (2) Não		
Acesso venoso periférico:	(1)Sim (2) Não		
Cateter de longa permanência:	(1)Sim (2) Não		
Sonda vesical de demora:	(1)Sim (2) Não		
Tratamento cirúrgico:	(1)Sim (2) Não		
Sítio de infecção:	(1)Pulmão (2)Sistema urinário (3)Corrente sanguínea		

	(4)Pele/tecidos moles (5)Outros:
Tipo de amostra:	(1)Ponta de cateter (2)Drenos (3) sangue (4) abscesso (5) ferida operatória (6) secreções diversas (7)Outras:
Contagem total de leucócitos no período da infecção:	
Contagem de neutrófilos no período da infecção:	
Perfil de susceptibilidade antimicrobiana:	Penicilina: ()Sensível ()Resistente Oxacilina : ()Sensível ()Resistente Vancomicina: ()Sensível ()Resistente Gentamicina: ()Sensível ()Resistente Clindamicina:()Sensível ()Resistente Sulfametaxazol-trimetropim: ()Sensível ()Resistente Ciprofloxacina: ()Sensível ()Resistente Cloranfenicol: ()Sensível ()Resistente Cefoxitina: ()Sensível ()Resistente Teicoplanina: ()Sensível ()Resistente Eritromicina: ()Sensível ()Resistente Linezolid: ()Sensível ()Resistente
Screening de oxacilina:	()Sensível ()Resistente
Screening de vancomicina:	()Sensível ()Resistente
Genes de Resistência:	Gene <i>mecA</i> : ()Presente ()Ausente Gene <i>blaZ</i> : ()Presente ()Ausente Gene <i>ermA</i> : ()Presente ()Ausente Gene <i>ermC</i> : ()Presente ()Ausente
Genes de Virulência:	Gene <i>icaA</i> , <i>icaD</i> : ()Presente ()Ausente Gene <i>hlg</i> : ()Presente ()Ausente
Caracterização do <i>SCCmec</i> :	

Anexo B – Aprovação do Comitê de Ética Hospital das Clínicas de Pernambuco



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. Nº. 111/2011 - CEP/CCS

Recife, 07 de abril de 2011

Registro do SISNEP FR – 396521

CAAE – 0490.0.172.000-11

Registro CEP/CCS/UFPE Nº 009/11

Título: Caracterização fenotípico-molecular de *Staphylococcus* spp. Multirresistentes de amostras de pacientes e profissionais de saúde do Hospital das Clínicas de Pernambuco.

Pesquisador Responsável: Marcelle Aquino Rabelo

Senhor (a) Pesquisador (a):

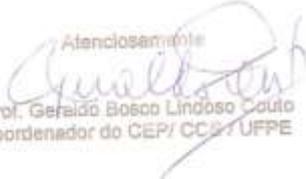
Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE) registrou e analisou de acordo com a Resolução N.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, o protocolo de pesquisa em epigrafe, liberando-o para início da coleta de dados em 06 de abril de 2011.

Ressaltamos que a aprovação definitiva do projeto será dada após a entrega do relatório final, conforme as seguintes orientações:

- a) Projetos com, no máximo, 06 (seis) meses para conclusão: o pesquisador deverá enviar apenas um relatório final;
- b) Projetos com períodos maiores de 06 (seis) meses: o pesquisador deverá enviar relatórios semestrais.

Dessa forma, o ofício de aprovação somente será entregue após a análise do relatório final.

Atenciosamente


Prof. Geraldo Bosco Lindoso Couto
Coordenador do CEP/CCS/UFPE

A:
Mestranda Marcelle Aquino Rabelo
Departamento de Medicina Tropical - CCS/UFPE

Avt. de Engenharia, s/n – 1º Andar, Cid. Universitária, CEP 50740-500, Recife - PE, Tel/fax: 81 2128 6588;
e-mail: cepccs@ufpe.br

Anexo C – Carta de anuência ULAB-HC

Da: Professora Maria Amélia Vieira Maciel
 Departamento de Medicina Tropical
 Para: Juliano Sálvio Cazuzá
 Chefe da Unidade de Laboratório-ULAB
 Hospital das Clínicas-UFPE

Recife, 18 de abril de 2012

Prezado Juliano Cazuzá,

Venho através desta carta, solicitar a VSA a aquisição de isolados bacterianos procedentes do Setor de Bacteriologia do ULAB do Hospital das Clínicas, que serão adquiridas e transportadas pela doutoranda Marcelle Aquino Rabelo e pela mestranda Lílian Rodrigues Alves, do referido departamento, para a pesquisa intitulada "CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICO-MOLECULAR DE *Staphylococcus spp.* MULTIRESISTENTES DE AMOSTRAS DE PACIENTES E PROFISSIONAIS DE SAÚDE DO HOSPITAL DAS CLÍNICAS DE PERNAMBUCO", o mesmo com aprovação da comissão de ética com registro CEP/CCS/UFPE nº 009/11.

Atenciosamente,

Maria Amélia Vieira Maciel
 Deptº Medicina Tropical
 Prof. Associada - SAPE 122327

Profª Drª Maria Amélia Vieira Maciel

Cezile
 Drº Acornio
 em 26/04/12

HOSPITAL DAS CLÍNICAS - UFPE
 Juliano Sálvio Cazuzá
 Chefe da Unidade de Laboratório-ULAB
 CRBM: 9685 - SAPE: 1134722

Anexo D – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética Hospital do Câncer de Pernambuco
(Página 1)

<p>SOCIEDADE PERNAMBUCANA DE COMBATE AO CÂNCER- SPCC</p> 
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA
Título da Pesquisa: ANÁLISE GENÉTICA DE BACTÉRIAS DE INTERESSE MÉDICO .PROVENIENTES DE PACIENTES DO HOSPITAL DO CÂNCER DE PERNAMBUCO
Pesquisador: PAULO SERGIO RAMOS DE ARAÚJO
Área Temática: Área 9. A critério do CEP.
Versão: 2
CAAE: 05554812.7.0000.5205
Instituição Proponente: SOCIEDADE PERNAMBUCANA DE COMBATE AO CÂNCER -SPCC
DADOS DO PARECER
Número do Parecer: 118.131
Data da Relatoria: 09/10/2012
Apresentação do Projeto:
O estudo será realizado no Hospital do Câncer de Pernambuco (HCP) e a análise molecular amostras de interesse da pesquisa serão processadas Laboratório de Bacteriologia Molecular do Departamento de Medicina Tropical-UFPE que dispõe de toda infra-estrutura necessária para o desenvolvimento de todas as etapas da pesquisa.- Tipo de estudo: O estudo será do tipo prospectivo série de casos, obtidos no período do estudo
Objetivo da Pesquisa:
Analisar a diversidade microbológica e genética de isolados de P. aeruginosa, Acinetobacter, K. pneumoniae e Staphylococcus spp. dos pacientes do Hospital do Câncer de Pernambuco
Avaliação dos Riscos e Benefícios:
Riscos:
Não há qualquer risco a integridade dos sujeitos participantes desta pesquisa
Benefícios:
Caracterizar o perfil de resistência antimicrobiana de P. aeruginosa, Acinetobacter, K. pneumoniae e Staphylococcus spp. isolados de pacientes do Hospital de Câncer de Pernambuco assim como a diversidade genética e seu papel na disseminação intrahospitalar
Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:
O estudo será realizado no Hospital do Câncer de Pernambuco (HCP) e a análise molecular amostras de interesse da pesquisa serão processadas Laboratório de Bacteriologia Molecular do
<p>Endereço: Av. Cruz Cabugá, 1557 Bairro: Santo Amaro CEP: 50.040-000 UF: PE Município: RECIFE Telefone: (81)3217-6197 Fax: (81)3217-6197 E-mail: cep@hcp.org.br</p>

Anexo D – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética Hospital do Câncer de Pernambuco
(Página 2)

**SOCIEDADE PERNAMBUCANA
DE COMBATE AO CÂNCER-
SPCC**



Departamento de Medicina Tropical-UFPE que dispõe de toda infra-estrutura necessária para o desenvolvimento de todas as etapas da pesquisa.- Tipo de estudo: O estudo será do tipo prospectivo série de casos, obtidos no período do estudo.- Amostras Clínicas: As amostras clínicas obtidas dos pacientes serão processadas no laboratório referência do HCP (CIAC), e as informações a respeito das características dos pacientes serão coletadas através da consulta de prontuários, com objetivo de obter informações a

respeito de antibioticoterapia e uso de dispositivos invasivos, por exemplo.- Tipo de amostragem e definição do tamanho da amostra:As amostras

dos pacientes serão coletadas de acordo com os procedimentos padrões, utilizados no HCP para ponta de cateter, drenos, sangue, abscesso, ferida

operatória e secreções diversas. . Desta forma, a pesquisa visa atingir todos os isolados bacterianos que forem identificados como Staphylococcus

spp., espécies de P. aeruginosa, oriundas dos setores do HCP no período de julho de 2012 a dezembro de 2012.-

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O termo de consentimento está adequado

Recomendações:

Projeto aprovado

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto foi aprovado após a realização das alterações solicitadas

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Sim

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado.

O presente projeto, seguiu nesta data para análise da CONEP e só tem o seu início autorizado após a aprovação pela mesma.

Endereço: Av. Cruz Cabugá, 1597

Bairro: Santo Amaro

CEP: 50.040-000

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)3217-8197

Fax: (81)3217-8197

E-mail: cep@hcp.org.br

Anexo D – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética Hospital do Câncer de Pernambuco
(Página 3)

SOCIEDADE PERNAMBUCANA
DE COMBATE AO CÂNCER-
SPCC



RECIFE, 09 de Outubro de 2012

Assinador por:
GLAUBER MOREIRA LEITAO
(Coordenador)

Endereço: Av. Cruz Cabugã, 1597
Bairro: Santo Amaro CEP: 50.040-000
UF: PE Município: RECIFE
Telefone: (81)3217-8197 Fax: (81)3217-8197 E-mail: cco@hcp.org.br