

Estudo da resistência a antimicrobianos e fatores de patogenicidade dos isolados de “*Staphylococcus aureus*” de amostras clínicas e hospitalares

Autores

Roselene Canato Felipe de Oliveira

Orientador

Gislene Garcia Franco do Nascimento

1. Introdução

Os estafilococos fazem parte da microbiota da pele e mucosas intactas, tornando-se bactérias potencialmente patogênicas quando encontram porta de entrada ou na existência de doença que predisponha ao desenvolvimento de infecção. Algumas infecções mais sérias provocadas por este patógeno são: bacteremia, pneumonia, osteomielite, endocardites, síndrome da pele escaldada, síndrome do choque tóxico e abscessos (CALDERÓN et al, 2001).

São responsáveis por cerca de 80% das doenças supurativas encontradas na prática médica e constituem um problema crescente nas unidades hospitalares, como um dos principais agentes de bacteriemia muitas vezes adquiridas no próprio ambiente hospitalar, sendo muitas vezes transportado por paciente, membros da equipe hospitalar e visitante, aumentando o risco de infecção hospitalar principalmente em pacientes pós-cirúrgicos, pós-traumáticos, queimados, neonatais, pacientes hospitalizados em unidades de queimados, enfermarias e durante epidemias de infecção por cepas multirresistentes (FERNANDES et al., 2000).

As infecções hospitalares por cepas multi-resistentes de *Staphylococcus aureus* tornaram-se bastante relevantes nas últimas décadas, sendo responsáveis por altos índices de morbidade e letalidade. Atualmente *S. aureus* resistentes à oxacilina ou metilicina é reconhecido como um dos mais importantes patógenos causadores de infecções nosocomiais em todo o mundo; e o surgimento e a disseminação de cepas cada vez mais virulentas e multirresistentes, há necessidade de rever o panorama dos fatores que contribuem à patogênese da resistência desta bactéria (VELASQUEZ-MEZA, 2005).

Inúmeras pesquisas avaliaram a natureza da resistência em *S. aureus* à diversas drogas. Em 1970, o isolamento de linhagens mostrando resistência à metilicina (MRSA) ou ORSA (oxacilina) foi observado inicialmente na Inglaterra, ocorrendo posteriormente em muitos países. Em 1980, foram observadas linhagens ORSA que apresentaram também resistência a todos os antibióticos beta-lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas e carbenicilinas) e a muitos outros agentes antimicrobianos incluindo aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e rifampicina. O aumento da resistência de 2% para 80% a fluoroquinolonas no período de 1987 a 1997 foi a mais importante alteração (ROSSI e ANDREAZZI, 2005).

Dessa forma, a vancomicina passou a ser então, o único recurso terapêutico para o tratamento de muitas

infecções causadas por ORSA (COHEN, 1992, OLIVEIRA et al, 2001).

Os fatores de patogenicidade associados ao *S.aureus* são adesinas e formação de biofilme. Outros fatores como invasinas (proteases, lipases) e toxinas, também tem sido bastante estudados.

Considerando a habilidade das bactérias produzirem o filme extracelular *in vitro*, propõe-se uma marca de patogenicidade associando ser um organismo virulento (ALCARÁZ et al, 2003).

Um dos grandes avanços da medicina tem sido o controle de infecções através do uso de antibióticos. Entretanto, há dois problemas que podem interferir nesta terapia: emergência de germes resistentes e bactérias que residem em biofilmes. Estas últimas podem ser mil vezes mais resistentes a antibióticos do que o mesmo organismo crescido de forma plantônica, sendo ainda parcialmente protegidos da ação destruidora dos fagócitos (DAVEY e O'TOOLE, 2000). Infecções provocadas por bactérias nestas comunidades continuam a se propagar mesmo após o término do tratamento, pois somente células plantônicas são destruídas (COSTERTON et al., 1999).

2. Objetivos

Avaliar em isolados de *Staphylococcus aureus*, a resistência à agentes antimicrobianos e fatores de patogenicidade.

3. Desenvolvimento

Doze isolados de *S. aureus*, dos quais, três foram obtidos de amostras clínicas (Laboratório Clínico) e nove de portadores assintomáticos (Ambiente Hospitalar) de Piracicaba, designadas por números foram utilizadas nesta pesquisa. Estas bactérias, cujas características de resistência ao antibiótico oxacilina já havia sido determinada em pesquisa anterior, estavam devidamente estocadas a -20° C em glicerol estéril.

Foram utilizadas as cepas de números 7, 8, 18, 35, 36, 49, 64, 68, 108, 115, 116, 135 e cepas padrões: *S. aureus* ATCC 29213 e ATCC 25923.

Os meios de cultura, soluções e reagentes utilizados nos ensaios foram: Agar Manitol, Mueller-Hinton (agar e caldo), BHI (caldo), Agar Sangue, Tween 20 Agar, TSB+gelatina, TSB+glicose, Fucsina alcóolica, Tampão PBS. Foram utilizados discos de antibióticos (CECON) e solução de oxacilina (SIGMA).

a) Antibiograma por difusão em disco (Tabela do NCCLS, 2004).

Inóculo de cada bactéria crescido em caldo BHI, padronizado na escala 0,5 McFarland; foi semeado em placa com ágar Mueller-Hinton e discos do antibiótico foram colocados sobre a superfície do meio. As placas foram incubadas por 24 horas a 35°C, observando-se posteriormente o diâmetro da zona de inibição, medindo e comparando com a tabela NCCLS M100-S (tabela atualizada anualmente).

b) Antibiograma por difusão em agar (Tabela do NCCLS, 2004).

Método usado para detecção de resistência à oxacilina através do ágar Mueller Hinton suplementado com 4% de NaCl e 6 mg de oxacilina/mL.

Suspensão direta da colônia até obtenção de turvação na escala 0,5 de MacFarland., foi semeada no Ágar *Screening* Oxacilina incubadas por 24 horas completas à 35°C, observando-se a ocorrência de crescimento, sendo que qualquer colônia (> 1) indicou resistência.

Após confirmação destas cepas ORSA, foram testadas quanto a sua Concentração Inibitória Mínima. Foram diluídas convenientemente (cerca de 10⁸ bactérias/mL) e inoculadas em tubos contendo caldo MH acrescido de diferentes concentrações de oxacilina: 4, 6, 12,16, 24, 32, 48, 64, 96, 128, 192 e 256mg/mL. A Concentração Inibitória Mínima para as cepas padrões é de £ 2mg/mL e o ponto de corte estabelecido pelo NCCLS/2004 para caracterizar cepa resistente, o MIC de oxacilina é ³ 4mg/mL (ROSSI e ANDREAZZI, 2005).

Para a detecção dos fatores de patogenicidade foram seguidos o seguinte protocolo:

Para a verificação da atividade hemolítica, os isolados foram inoculados em Agar Sangue de coelho (5%).

Para a verificação da atividade proteolítica, os isolados foram inoculados em Triplice Soy Agar (TSA), acrescido de gelatina (0,75%).

Para a verificação da atividade lipolítica, os isolados foram inoculados em Agar Tween 20.

Para a verificação da produção de biofilme, os isolados foram inoculados em caldo TSB + 0,25g de glicose (10mL no tubo), incubados por 24 horas à 35° C e após isso, foram diluídos em TSB

e colocados na microplaca para produção do biofilme.

4. Resultados

Foi realizado com os 12 isolados de *S. aureus* para determinação da resistência a oxacilina a técnica do disco difusão do antibiótico oxacilina 1mg e confirmados pela técnica da difusão em Agar *Screening* no meio Agar MH acrescido de 6mg/mL de Oxacilina. Todos os isolados foram resistentes à oxacilina nestas duas metodologias.

Embora muitas técnicas vêm sendo empregadas para selecionar ORSA, a seleção através de difusão em agar ou incorporação do antibiótico ao meio de cultura, tem mostrado resultados bastante satisfatórios. KAMPF et al., (1998) ao compararar várias metodologias.

Os doze isolados de *S. aureus* resistentes a oxacilina selecionados, foram ensaiados para a determinação

da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e os resultados são apresentados na **Tabela 1**.

O perfil de resistência a outros antibióticos; bem como o modelo e a frequência de resistência de cada uma dos isolados são apresentados na **Tabela 2**.

A bactéria *S. aureus* capaz de desenvolver mecanismos de resistência aos antibióticos beta-lactâmicos, encontrava na oxacilina e na vancomicina medicamentos adequados para o seu combate. Como mostram as pesquisas em relação aos antimicrobianos, ao final do século XX, esse panorama começou a ser modificado, com a demonstração e expansão de estafilococos resistentes não só a oxacilina, mas também às mais modernas cefalosporinas, mantendo, ainda, sensibilidade aos glicopeptídeos. Mas, já é sabido que das 15 cepas existentes em todo o mundo de GISA (*S. aureus* com resistência intermediária aos glicopeptídeos), cinco foram detectados no Brasil.

O tratamento das infecções por *S. aureus* tem se tornado mais difícil por causa das multirresistências às drogas disponíveis (CALDERÓN, et al, 2001).

Os isolados hospitalares de *S. aureus* resistentes à oxacilina estudados neste trabalho mostraram ser altamente resistentes a outros antiestafilocócicos. Dos vinte antibióticos utilizados para o teste de sensibilidade aos isolados ORSA, quase 50% deles foram resistentes a dezessete drogas, apresentando sensibilidade apenas aos glicopeptídeos (Vancomicina e Teicoplanina) e o Imipenen. Isso comprova o que as pesquisas vêm mostrando a respeito da necessidade de um controle emergente destas cepas multirresistente (CALDERÓN, et al, 2001; OZTOPRAK, et al. 2006).

Medidas preventivas de controle devem ser implantadas e/ou intensificadas no sentido de diminuir a disseminação destas bactérias. HUANG et al. (2000), observaram reduções significativas na taxa de ORSA após implantação de medidas de controle no hospital.

Na Figura 1(gráfico), são apresentados os resultados dos seguintes fatores de Patogenicidade: detecção das atividades hemolítica, lipolítica, proteolítica e produção de biofilme dos isolados ORSA.

Os isolados 108 e 116 apresentaram positividade para todas as características estudadas, comprovando seu enorme potencial patogênico como ORSA. Outros como, isolados 36 e 64 apresentaram duas atividades além da formação de biofilme, conforme pode ser observado na Figura 1.

30% e 40% dos isolados apresentaram atividade lipolítica e hemolítica, respectivamente, seguindo-se de 90% com atividades proteolíticas e formação de biofilme.

Estes resultados mostram que a atividade proteolítica e formação de biofilme, podem ser um grande indicativo de virulência dos *S. aureus*.

Ver **Tabela 1**.

A Concentração Inibitória Mínima para a oxacilina, variou-se nas amostras, onde dos doze isolados, mais de 50 % obtiveram MICs superiores a 256 mg/mL. O NCCLS preconiza *breakpoint* para oxacilina susceptíveis com MIC de 2 mg/mL e para oxacilina resistentes com MIC de 4 mg/mL (ROSSI e ANDREAZZI, 2005).

Ver **Tabela 2**.

Ver **Figura 1**.

5. Considerações Finais

- Os isolados da bactéria *S. aureus* mostraram um padrão de resistência a oxacilina semelhante aos relatados mundialmente, o que confirma a sua ampla disseminação no ambiente hospitalar. Esses estafilococos são resistentes não só à oxacilina, mas também às mais modernas cefalosporinas, mantendo, ainda, sensibilidade aos glicopeptídeos.
- É necessário um sistema de vigilância epidemiológica atuante, a valorização das comissões de controle de infecção hospitalar e laboratório de microbiologia de qualidade, com profissionais especializados e atualizados.
- Os isolados apresentaram uma relação com a multirresistência e alguns fatores de patogenicidade como produção de biofilme e atividade proteolítica.
- Essa relação direta entre a formação de biofilmes e produção de fatores de patogenicidade relacionados à adesão pelos microrganismos é um processo multifatorial, necessitando considerar também a influência de outras características, pertinentes ou não à célula bacteriana e que merecem estudos mais aprofundados.
- A detecção e o estudo deste patógeno são de extrema importância, pois proporciona ao Hospital e ao Comitê de Controle de Infecções Hospitalares a contribuição para eventuais medidas preventivas, com objetivos de diminuir a disseminação intra-hospitalar.

Referências Bibliográficas

ALCARÁZ, L.E.; SATORRES, S.E.; LUCERO, R.M. & CENTORBI, O.N.P. Species identification, slime production and oxacilin susceptibility in coagulase – negative staphylococci isolated from nosocomial specimens. **Brazilian Journal of Microbiology**. **34** 45-51, 2003.

:**28**: 1338 - 1341, 1990.

CALDERÓN E. J., MONTEROS L. E. E., BELTRAN R. A. Epidemiology of drug resistance: The case of Staphylococcus aureus and coagulase-negative staphylococci infections. **Saúde Pública do México**, vol.44, n.2 março/abril, 2002.

COHEN, M.L. Epidemiology of drug resistance: implications for a post-antimicrobial era. **Science** **257**: 1050 - 1055, 1992.

DAVEY, M. E.; O'TOOLE, G.A. Microbial biofilms: from Ecology to. Molecular Genetics **Microbiol. Molec. Rev.** 64(4):847 – 867, 2000.

HUANG, A. H. YAN, J.J. & WU, J.J. Rapid dissemination of Staphylococcus aureus with classic oxacillin resistance phenotype at a new university hospital. **J. Hosp. Infect.** **44**: 309-315, 2000.

KAMPF, G.; LECKE, C.; CIMBAL, A.K.; WEIST, K. & RUDEN, H. Evaluation of mannitol salt agar for detection of oxacillin resistance in Staphylococcus aureus by disk diffusion screening. **J. Clin. Microbiol.** **36**: 2254-2257, 1998.

OLIVEIRA Geraldo. A et al., Avaliação da Tolerância à vancomicina em 395 cepas hospitalares de Staphylococcus aureus resistentes à oxacilina. **Journal Brasileiro de Patologia Médica Laboratorial.** V.37, n.4 Rio de Janeiro 2001.

OZTOPRAK, Nefise et al, Risk factors for ICU – acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections. **American Journal Infect. Control**, 34: 1-5, 2006)

ROSSI, F., & ANDREAZZI, D.B. Resistência **Bacteriana - Interpretado o antibiograma**. Editora Atheneu, São Paulo, 34 – 35, 2005

Anexos
