

## Detecção dos genes *mecA* e *femA*, marcadores moleculares de resistência a meticilina, em *Staphylococcus spp.* isolados de pacientes admitidos em uma Unidade Neonatal de Tratamento Intensivo.

Detection of the *mecA* and *femA* genes, molecular markers of methicillin resistance, in *Staphylococcus spp.* isolated from patients admitted to a neonatal intensive care unit.

Bruno Campolino Moussallem,<sup>1</sup> Charbell Miguel Haddad Kury,<sup>2</sup> Enrique Medina-Acosta<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Biólogo pela Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF.

<sup>2</sup> Médico pela Faculdade de Medicina de Campos, mestrando pela Universidade Federal do Rio de Janeiro.

<sup>3</sup> MSc, PhD, Professor Associado, Chefe do Laboratório de Biotecnologia do Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF, Coordenador do Núcleo de Diagnóstico e Investigação Molecular, Convênio UENF - Hospital Escola Álvaro Alvim.

### RESUMO

O mecanismo de resistência aos antibióticos beta-lactâmicos em *Staphylococcus spp.* está associado, em parte, à expressão da proteína de ligação à penicilina, PBP2a (PBP, *penicillin binding protein*), cuja característica principal é a ligação alterada baixa às penicilinas. Os beta-lactâmicos se ligam às proteínas PBP, transpeptidases integrais de membrana que participam da fase inicial de síntese da parede celular, mudando sua conformação e desencadeando um processo, ainda não esclarecido, que leva à morte dos cocos. A proteína PBP2a substitui as PBP que exibem ligação normal às penicilinas, conferindo uma defesa eficiente contra esses medicamentos. PBP2a é o produto do gene *mecA*, que é ausente em cepas susceptíveis a meticilina. O nível de resistência a meticilina é influenciado por uma proteína citoplasmática, produto do gene *femA* (*fem*, *Factor Essential for Methicillin resistance*), que está também envolvida na biossíntese de parede celular. O objetivo do presente estudo foi a detecção dos genes *mecA* e *femA* por meio da reação em cadeia da polimerase, PCR, em estirpes de *Staphylococcus spp.* provenientes de recém nascidos admitidos na Unidade Neonatal do Hospital dos Plantadores de Cana, da cidade de Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil. A frequência de infecções por *Staphylococcus* coagulase negativos foi 88,6%. A frequência de resistência a oxacilina foi de 79,5%. A frequência do genótipo *mecA+* foi 56,8% (62,8% das estirpes resistentes foram *mecA+* e 40% foram *mecA+/femA+*). Esses dados demonstram uma alta prevalência de infecções por *Staphylococcus* coagulase negativos resistentes a meticilina em pacientes admitidos na Unidade de Tratamento Intensivo Neonatal.

**Descritores:** Diagnóstico, Reação em Cadeia da Polimerase, Resistência a meticilina, *Staphylococcus* coagulase negativo.

### ABSTRACT

The mechanism of resistance to beta-lactamic antibiotics in *Staphylococcus spp.* is, in part, associated to the expression of the penicillin-binding protein PBP2a, which main characteristic is the altered low-affinity for penicillins. The beta-lactamics bind to PBPs, membrane integral transpeptidases that participate in the initial phase of cell wall synthesis, changing their conformation and inducing a process, not clear yet, that leads to death of the bacteria. PBP2a substitutes PBPs that exhibit normal penicillin-binding activities, conferring an efficient defense against these drugs. PBP2a is the product of the *mecA* gene that is absent in methicillin susceptible strains. The level of methicillin resistance is influenced by a cytoplasmic protein, the product of the *femA* (*fem*, *Factor Essential for methicillin resistance*) gene, that is also involved in the biosynthesis of cell wall. The objective of the present study was the detection of the *mecA* and *femA* genes by the polymerase chain reaction, PCR, in *Staphylococcus spp.* strains obtained from newborns admitted to Neonatal Intensive Care Unit of the Hospital dos Plantadores de Cana in the city of Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brazil. The frequency of infections with coagulase negative *Staphylococcus* was 88.6%. The frequency of oxacillin resistance was 79.5%. The frequency of the *mecA+* genotype was 56.8% (62.8% of the resistant strains were *mecA+* and 40% were *mecA+/femA+*). These data demonstrate a high prevalence of infections with methicillin resistant coagulase negative *Staphylococcus* in the patients admitted to the Neonatal Intensive Care Unit.

**Keywords:** Diagnosis, Polymerase chain reaction, methicillin resistance, coagulase negative *Staphylococcus*.

Endereço para correspondência  
Enrique Medina-Acosta

Centro de Biociências e Biotecnologia, Laboratório de Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Avenida Alberto Lamego 2000, Parque Califórnia, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, CEP 28013-602, Tel: (022) 2726 1661; e-mail: quique@uenf.br

## INTRODUÇÃO

**Mecanismo de resistência a meticilina:** A resistência a meticilina em *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus coagulase negativos* é mediada primeiramente pela superprodução de PBP2a, uma proteína de ligação à penicilina (PBP) alterada, adicional às normais PBP1 a PBP4, porém com afinidade extremamente baixa aos antibióticos beta-lactâmicos.<sup>1</sup> O gene *mecA*, determinante estrutural que codifica a PBP2a, é muito conservado entre *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* resistentes a meticilina.<sup>2</sup> O gene *mecA* é ausente nos isolados de estafilococos suscetíveis.<sup>3</sup>

O gene *mecA* está contido em um elemento genético móvel chamado de cassete *mec* do cromossomo de *Staphylococcus*, SCCmec, que possui também o elemento de seqüência de inserção *IS431mec* e um cassete único de genes da recombinase, *ccr*, que são responsáveis pela integração e excisão do SCCmec.<sup>4</sup> A tipificação do SCCmec é essencial para compreender a epidemiologia molecular dos *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina. Os elementos de SCCmec são classificados atualmente em tipos I a V baseado na natureza dos complexos do gene *mec* e *ccr*.<sup>5</sup> As cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina adquiriram e integraram em seu genoma o elemento genético móvel, SCCmec, com tamanho entre 21 e 61Kb e que abriga o gene *mecA* e outros determinantes de resistência a antibióticos.<sup>6</sup>

SCCmec tipos I e IV possuem apenas o gene *mecA* como determinante de resistência enquanto os tipos II e III possuem determinantes múltiplos de resistência aos antibióticos não beta-lactâmicos, o que confere multirresistência a antibióticos, característica comum em isolados de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina nosocomiais.<sup>7</sup> As atuais cepas emergentes de estafilococos possuem os elementos SCCmec tipos IV ou V que são transferidos de maneira mais fácil do que os elementos SCCmec maiores tipos I, II, e III.<sup>8</sup>

A propagação dos elementos I, II e III ocorre principalmente pela pressão seletiva da exposição antibiótica/tempo - transferência vertical.<sup>6</sup> Por serem menores, os SCCmec tipos IV e V, possuem uma vantagem evolucionária sobre aqueles sendo mais suscetíveis à propagação horizontal entre uma população bacteriana e são tipicamente suscetíveis a múltiplos antibióticos, não beta-lactâmicos, em testes padrões de susceptibilidade.<sup>9</sup>

Mesmo sendo um pré-requisito para a resistência a meticilina, o gene *mecA* não é o único responsável pelo nível ao qual a resistência é expressa; sabe-se também que o nível de PBP2a não está relacionado diretamente ao nível fenotípico de resistência.<sup>10</sup> Outros fatores cromossomicamente determinados, tais como o operon *femAB*, que atua como gene regulador, são essenciais para a expressão da resistência a meticilina em *Staphylococcus aureus*.<sup>11</sup> A cooperação entre esses determinantes, *femA* e *mecA* parece ser necessária, mas o mecanismo não é bem compreendido.

O operon cromossômico *femAB* pertence aos genes críticos para o metabolismo celular (house-keeping genes) dos *Staphylococcus aureus* e é encontrado em todas as cepas dessa espécie,<sup>12</sup> e alelos *femAB* similares na organização e na seqüência foram identificados nos *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus haemolyticus*.<sup>13</sup> O operon surgiu por duplicação do gene e codifica para duas proteínas citoplásmicas similares que são produzidas, principalmente, durante a fase exponencial de crescimento.<sup>14</sup> *femA* e *femB* estão envolvidos na formação da cadeia lateral da pentaglicina que é ligada a L-lisina da haste peptídica do peptidoglicano. Os peptídeos da pentaglicina são longos e flexíveis, e permitem uma elevada ligação cruzada entre o grupo funcional dos peptídeos da única cadeia de peptidoglicano observada em paredes celulares de *Staphylococcus aureus*. Enquanto em células sem o gene *femB* as pontes cruzadas de triglicina podem ser formadas, a composição da parede celular de mutantes com *femAB* pouco transcrito é indicativa que *femA* é responsável pela adição dos segundos e terceiros resíduos de glicina.<sup>15</sup>

A perda do operon *femAB* causa resistência dos cocos ao efeito bactericida da proteína lisostafina, uma potente hidrolase de peptidoglicano secretada pelo *Staphylococcus simulans*, devido ao encurtamento da ponte interpeptídica de glicina; adicionalmente, causa a hipersusceptibilidade a meticilina, apesar da presença da proteína PBP2a em *Staphylococcus aureus mecA* positivos. Portanto, a inativação do operon *femAB* e os beta-lactâmicos parecem agir de maneira sinérgica.

**Ocorrência de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina em neonatos:** Crianças internadas em unidades neonatais de tratamento intensivo (UTI neonatais) apresentam risco elevado de adquirir infecções por *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina.<sup>16</sup> Estas

cepas são responsáveis por 40 a 70% das infecções por *S. aureus* em UTI.<sup>17</sup> Os recém nascidos e os pacientes severamente comprometidos quanto os imunodeprimidos são os mais susceptíveis devido a apresentarem funções imunes diminuídas,<sup>18</sup> e que estão sujeitos a procedimentos invasivos que abrem as portas para patógenos oportunistas causarem infecções primárias.<sup>4</sup> Esses pacientes podem permanecer por meses na UTI, de forma que passam a funcionar como reservatório, o que pode contribuir para o estabelecimento de infecção cruzada.<sup>19</sup>

**Ocorrência de estafilococos coagulase negativos resistentes a meticilina em neonatos:** Os *Staphylococcus* coagulase negativos são os microorganismos mais comumente encontrados colonizando a pele e as mucosas de recém-nascidos e representam hoje uma importante causa de infecções nosocomiais, particularmente nas UTI neonatais.<sup>20</sup> A septicemia tardia nosocomial neonatal (>72 h após o nascimento) por *Staphylococcus* coagulase negativos continua a ser uma importante causa de morbidade e mortalidade entre estes recém-nascidos, correspondendo a mais de 50% dos casos registrados.<sup>21</sup>

A freqüente colonização e infecção dos pacientes e da equipe de funcionários com *Staphylococcus* coagulase negativos resistentes a meticilina transformaram-se num problema sério em muitas partes do mundo por causa das limitações terapêuticas.<sup>22</sup> A colonização da pele pode ser confirmada em mais de 90% das admissões das UTI neonatais; estes organismos podem, então, cair na corrente sanguínea durante um procedimento invasivo causando sepse estafilocócica. Foi demonstrado que cepas endêmicas de *Staphylococcus* coagulase negativos podem permanecer em UTI neonatais por muitos anos, até uma década.<sup>23</sup>

A emergência de resistência aos beta-lactâmicos decorrente do uso indiscriminado de antibióticos, conduzindo a limitações significativas nas opções terapêuticas,<sup>4</sup> é um dos principais fatores que contribui para a ocorrência de graves surtos de bacteremia envolvendo recém-nascidos prematuros.<sup>24</sup> A utilização de métodos mais precisos para detecção de cepas resistentes é muito importante para auxiliar o diagnóstico da doença ou casos clínicos de infecção e, assim, permitir a escolha do antibiótico apropriado.<sup>25</sup>

## OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo a detecção dos

genes *mecA* e *femA* por meio da reação em cadeia da polimerase, PCR, a partir de DNA genômico extraído de estirpes de *Staphylococcus spp.* provenientes de recém nascidos da unidade neonatal do Hospital dos Plantadores de Cana da cidade de Campos dos Goytacazes, RJ e classificados como resistentes a meticilina por testes de antibiograma, visando à determinação da prevalência de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* coagulase negativos resistentes a meticilina.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Isolados de *Staphylococcus spp.*: Foram estudadas 44 estirpes, remetidas pelo Laboratório de Análises Clínicas do Hospital dos Plantadores de Cana de Campos dos Goytacazes, RJ. As estirpes foram obtidas de crianças internadas na UTI durante o período de Fevereiro-Agosto 2005. Os isolados foram tipificados por testes de antibiogramas e prova de coagulase como estafilococos coagulase negativos ou *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina pelo laboratório remetente. Como controle positivo foi utilizada a cepa COL de referência para *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Olney Vieira da Motta, Laboratório de Sanidade Animal, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

Extração de DNA Genômico: Os isolados de *Staphylococcus spp.* foram crescidos em meio BHI, por 18 horas a 37°C. O cultivo foi centrifugado e o DNA cromossômico foi extraído pelo método de TELT.<sup>26</sup>

Iniciadores: As seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores específicos para os genes *mecA*, *femA*, *16S rDNA* e os tamanhos esperados dos respectivos produtos de amplificação são listados na Tabela 1. As seqüências dos pares A, B, C e D de iniciadores foram baseadas na literatura 27, 28 e confirmadas por busca em banco público de dados (NCBI >gi2791983:3472-5478 *Staphylococcus aureus mecA*; NCBI AB266532. gi:110624450; NCBI BA000017. gi:47208328; NCBI >gi|57634611:530475-532029 *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Mu50, complete genome). Para ratificar as estirpes positivas para o gene *mecA* foi utilizado o par B de iniciadores específicos para esse gene, utilizando seqüências publicadas.27, Tabela 1. Para afastar a possibilidade de falsos negativos foram desenhados neste trabalho iniciadores para o gene ribossômico *16S rDNA*.

PCR Uniplex para a seqüência *mecA* com o par A de iniciadores A: O DNA extraído foi usado para a

amplificação do gene *mecA* e as condições de amplificação foram 95°C por 5 minutos e 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C por 2,5 minutos e 72°C por 2,5 minutos seguido de 72°C para o alongamento final das fitas. A reação em cadeia da polimerase foi realizada utilizando aproximadamente 20-50ng de DNA em tampão da PCR 1x; mistura de desoxirribonucleotídeos na concentração final de 0,01 mM e 1 mM de cloreto de magnésio; 25 picomoles de cada iniciador, 0,1 U de Taq polimerase e água ultrapura q.s.p com um volume final de 25 µL.

PCR Uniplex para a seqüência *mecA* com par B de iniciadores: O DNA extraído foi usado para a amplificação do gene *mecA* e as condições de amplificação foram 95°C por 5 minutos e 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 54°C por 2,5 minutos e 72°C por 2,5 minutos seguido de 72°C para o alongamento final das fitas. A reação em cadeia da polimerase foi realizada utilizando aproximadamente 20-50ng de DNA em tampão da PCR 1x; mistura de desoxirribonucleotídeos na concentração final de 0,01 mM e 1 mM de cloreto de magnésio; 25 picomoles de cada iniciador, 0,1 U de Taq polimerase e água ultrapura q.s.p 25 µL.

PCR Uniplex para a seqüência *femA*: O DNA extraído foi usado para a amplificação do gene *femA* e as condições de amplificação foram 95°C por 5 minutos e 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 57°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto seguido de 72°C para o alongamento final das fitas. A reação em cadeia da polimerase foi realizada utilizando aproximadamente 20-50ng de DNA em tampão da PCR 1x; mistura de desoxirribonucleotídeos na concentração final de 0,01 mM e 1 mM de cloreto de magnésio; 25 picomoles de cada iniciador, 0,1 U de Taq polimerase e água ultrapura q.s.p 25 µL.

PCR Bplex para as seqüências *mecA* e 16S rDNA: O DNA extraído foi usado para a amplificação do gene *mecA* e do gene 16S rDNA e as condições de amplificação foram 95°C por 5 minutos e 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 50°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto seguido de 72°C para o alongamento final das fitas. A reação em cadeia da polimerase foi realizada utilizando 20-50 ng de DNA em tampão da PCR 1x; mistura de desoxirribonucleotídeos na concentração final de 0,01 mM e 2 mM de cloreto de magnésio; 25 picomoles de iniciador para *mecA*, 10 picomoles de iniciador para 16SrDNA, 0,1 U de Taq polimerase e água ultrapura q.s.p 25 µL.

Análise dos resultados da PCR: Os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de Agarose 1% contendo brometo de etídeo. Os géis foram visualizados em luz Ultra Violeta (UV) e fotodocumentados em equipamento VDS.

## RESULTADOS

Com o intuito de assegurar a fidelidade dos resultados os marcadores *mecA* e *16S rDNA* foram amplificados concomitantemente. A Figura 1 ilustra os perfis dos produtos de amplificação para esses marcadores. A tabela 2 resume a distribuição das freqüências fenotípicas e genotípicas observadas para as estirpes analisadas neste estudo. Todas as amostras de DNA estudadas foram positivas para o marcador *16S rDNA* e 56,8% das amostras foram positivas para o marcador *mecA*. Dentre estas estirpes, 88% foram resistentes a meticilina/oxacilina, 96% a penicilina e 84% foram resistentes a ampicilina. Em relação aos outros beta-lactâmicos, (cefalosporinas e carbepenem), 56% apresentaram resistência a cefalotina, 52% a cefoxitina e imipenem, 60% foram resistentes a cefotaxima, 72% a ceftriaxona, 80% a cefalexina e 100% a meropenem.

Para confirmar os resultados positivos do PCR bplex foi realizada a amplificação de validação do gene *mecA* para as 25 estirpes *mecA* positivas utilizando o par B de iniciadores (Tabela 1). A figura 2 ilustra o perfil do produto de amplificação para esse marcador. Todas (100%) as amostras apresentaram amplificação de um fragmento de 163 pares de bases, correspondente a uma região interna do gene *mecA*.

A presença do gene *femA* confere um elevado nível de resistência a beta-lactâmicos em estirpes *mecA*<sup>+</sup>. Para determinar a freqüência deste genótipo, *femA*<sup>+</sup> e *mecA*<sup>+</sup>, nas estirpes sob estudo, foi realizada a amplificação da seqüência relativa ao gene *femA* nas 25 estirpes *mecA*<sup>+</sup>. Como ilustrado na Figura 3, 40% das estirpes *mecA*<sup>+</sup> apresentaram o marcador *femA* (Tabela 2). Dessas, 100% foram resistentes a meticilina, oxacilina e penicilina e 78% foram resistentes a ampicilina. Em relação aos outros beta-lactâmicos, (cefalosporinas e carbepenem), 44% foram resistentes a imipenem, 56% apresentaram resistência a cefalotina, cefoxitina e cefotaxima, 78% a ceftriaxona, 89% a cefalexina e 100% a meropenem.

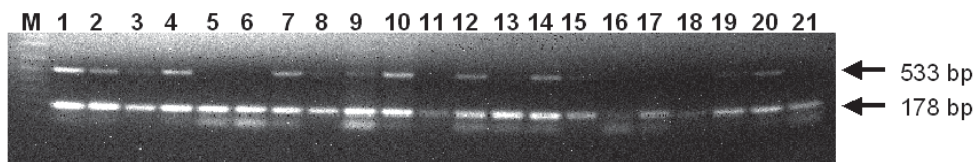


Figura 1. Visualização dos produtos de amplificação específicos para os genes *mecA* e 16S rDNA. Gel de agarose 1% tratado com brometo de etídeo. M: marcador de DNA 1 Kb Plus DNA ladder, amostras de DNA das estirpes (raias) 1: 438, 2: 439, 3: 445, 4: 446, 5: 452, 6: 458, 7: 469, 8: 483, 9: 500, 10: 501, 11: 502, 12: 513, 13: 520, 14: 521, 15: 524, 16: 526, 17: 527, 18: 558, 19: 582, 20: 588 e 21: 598. As setas indicam os fragmentos de DNA correspondentes ao gene *mecA* (533 pares de bases, bp) e ao gene 16S rDNA (178 bp).

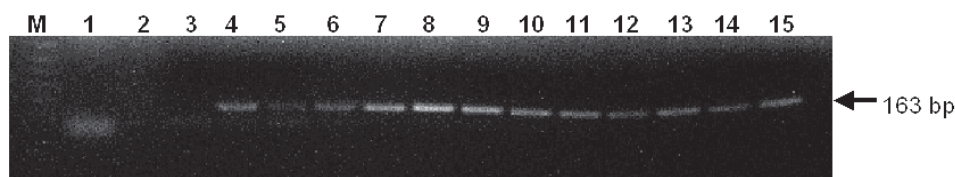


Figura 2. Visualização dos produtos de amplificação específicos para validação da seqüência *mecA* (par B de iniciadores). Gel de agarose 1% tratado com brometo de etídeo. M: marcador de DNA 1 Kb Plus DNA ladder, amostras de DNA das estirpes (raias) 1: controle negativo (água), 2: 300, 3: 306, 4: 310, 5: 318, 6: 405, 7: 426, 8: 438, 9: 439, 10: 445, 11: 446, 12: 483, 13: 500, 14: 469 15: (cepa COL, controle positivo). A seta indica o fragmento de 163 bp correspondente ao gene *mecA*.

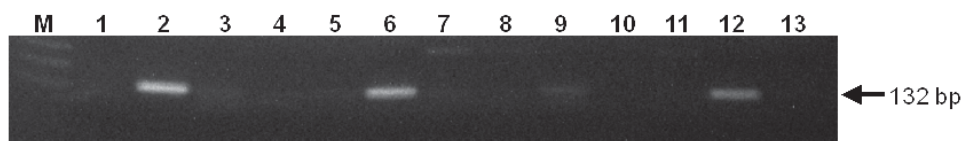


Figura 3. Visualização da amplificação específica do gene *femA*. Gel de agarose 1,3% tratado com brometo de etídeo. M: marcador de DNA 1 Kb Plus DNA ladder; amostras de DNA das estirpes *mecA* positivas (raias) 1-13. O fragmento de 132 bp corresponde à amplificação do gene *femA*.

**Tabela 1.** Características dos iniciadores usados neste estudo.

Par	Iniciadores	Seqüência (5'- 3')	Amplicon (pb)
A	<i>mecA</i> 1	AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC	533
	<i>mecA</i> 2	AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC	
B	<i>mecA</i> 1	ACTGCTATCCACCCTCAAAC	163
	<i>mecA</i> 2	CTGGTGAAGTTGTAATCTGG	
C	<i>femA</i> 1	AAAAAGCACATAACAAGCG	132
	<i>femA</i> 2	GATAAAGAAGAAACCAGCAG	
D	<i>16SrDNA</i> 1	CAGCTCGTGTCGTGAGATGT	178
	<i>16SrDNA</i> 2	GTCCATTGTAGCACGTGTGTA	

**Tabela 2.** Frequências fenotípicas e genotípicas observadas no presente estudo.

Genótipo	<i>mecA</i> +		<i>mecA</i> +/femA+	<i>mecA</i> -/femA+	<i>16S rDNA</i>
	n (%)		n (%)	n (%)	n (%)
<b>Iniciadores (pareados)</b>	A + D	B + D	A + C	A + C	D
	25 (56,8)	25 (56,8)	10 (40)	2 (10,5,2)	44 (100)
<b>Fenótipo de resistência</b>	%		%	%	%
Oxacilina	88		100	100	79,5
Penicilina	96		100	100	90,9
Ampicilina	84		78	100	75,0
Cefalexina	80		89	100	63,6
Meropenem	100		100	100	100

## DISCUSSÃO

A análise dos dados relativos aos antibiogramas indicou que 79,5% das estirpes estudadas eram resistentes a oxacilina e, por conseqüência, a metilina. A análise das ampliações por PCR do gene *mecA* indica que 62,8% das estirpes fenotipicamente resistentes a metilina possuíam o gene de resistência específica a esse antibiótico.

A técnica da PCR pode ser considerada de maior sensibilidade e especificidade para identificação de cepas resistentes a metilina, uma vez que esta requer quantidades mínimas de DNA alvo.<sup>12, 27, 28</sup> Embora a presença do gene *mecA*, obrigatoriamente, não indique que a cepa seja de fato resistente ao antibiótico, o que pode ser conseqüência de, por exemplo, mutações no elemento SCCmec, a diferença nas freqüências estabelecidas pelos dois métodos (PCR e antibiograma) é significativa (37,1% das cepas resistentes a metilina foram negativas por PCR). Essa diferença não pode ser devido à ocorrência de falsos negativos pela técnica da PCR, uma vez que 100% das amostras de DNA utilizadas foram positivas para o gene *16S rDNA*, utilizado como gene alvo para controle interno. O DNA extraído das cepas foi utilizado para a amplificação duplex para os genes *mecA* e *16S rDNA*, e as estirpes positivas para o duplex foram confirmadas posteriormente por meio da reação de amplificação por PCR utilizando o segundo par de iniciadores para o gene *mecA*. Nossos resultados nos levam a crer que a discrepância entre os diagnósticos feitos por antibiograma e por PCR reside na metodologia utilizada nos antibiogramas.

Dentre as estirpes positivas para o gene *mecA* (25 no total) 22 (88%) apresentaram, pelo antibiograma, resistência a metilina. Considerando a PCR o método mais sensível,<sup>5</sup> esses dados significam que as 3 estirpes *mecA*+/oxacilina susceptíveis poderiam estar associadas com ocorrência de casos clínicos de resistência ou apresentar mutações na seqüência *mecA*.

De acordo com a classificação laboratorial, baseada em provas de coagulase, 88,6% das estirpes eram coagulase negativas. Resultado similar foi encontrado na literatura,<sup>29</sup> que aponta uma predominância de mais de 70% de *Staphylococcus* coagulase negativos em ambientes neonatais. Esses dados demonstram a alta prevalência de *Staphylococcus* coagulase negativos na UTI neonatal, assim como, um elevado índice de resistência a metilina (89% dos isolados de *Staphylococcus* coagulase negativos), alertando sobre os riscos de disseminação de

cepas inerentemente resistentes a metilina, porém com fenótipo coagulase negativo.<sup>18, 21, 23</sup>

A amplificação do gene *femA*, relacionado com o nível de resistência a metilina, em 40% dos isolados *mecA* positivos é de preocupante relevância epidemiológica. Esses dados significam que uma boa parte das estirpes *mecA* circulantes possuiriam níveis elevados de tolerância a metilina. Para constatação de tal inferência é necessária a determinação da concentração mínima inibitória nesses isolados.

Uma análise mais profunda das estirpes relacionadas e do seu leque de resistência deve ser realizada. Tal análise conduziria a uma terapia anti-estafilocócica mais eficiente para o controle e prevenção das doenças causadas por esses microrganismos, assim como, serviria de guia para o uso de antibióticos que possam solucionar o problema sem induzir resistência nas cepas envolvidas com a patologia.

## CONCLUSÕES

As infecções por estafilococos resistentes a metilina, nessa unidade neonatal, são causadas predominantemente por *Staphylococcus* coagulase negativos, enquanto aproximadamente 10% são atribuídas a *Staphylococcus aureus*.

A freqüência de estirpes que possuem o gene determinante de resistência a metilina *mecA* é alta, e a ocorrência do gene *femA* nessas estirpes indica uma prevalência de níveis elevados de resistência a metilina nos isolados de pacientes admitidos na unidade neonatal.

Considerando a PCR como teste padrão ouro de detecção de marcadores moleculares de resistência, a discrepância observada nas freqüências fenotípica e genotípica (apenas 62,8% das estirpes fenotipicamente resistentes a metilina foram *mecA*+) sugere que a freqüência de isolados resistentes a metilina estaria superestimada. O presente estudo aponta que os diagnósticos feitos por antibiograma não são os ideais para uma precisa identificação dos agentes patogênicos que assolam os recém-nascidos da UTI neonatal do Hospital.

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho é parte do trabalho de conclusão de curso de graduação em Ciências Biológicas por Bruno Campolino Moussallem. À Zila Sousa de Macedo (UENF) pelo auxílio no cultivo dos isolados de *Staphylococcus*. Ao Laboratório de Pesquisas Clínicas Ltda Plínio Bacelar

(Campos dos Goytacazes, RJ) pelos antibiogramas. Este trabalho foi parcialmente financiado com verba da Fundação de Amparo à Pesquisa Carlos Chagas – FAPERJ, programa Cientistas do Nosso Estado, outorgada a Enrique Medina-Acosta.

## REFERÊNCIAS

1. Hackbarth CJ, Chambers HF. Methicillin-resistant staphylococci: genetics and mechanisms of resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33: 991-994.
2. Ryffel C, Tesch W, Birch-Machin I, Reynolds PE, Barberis-Maino L, Kayser FH et al. Sequence comparison of *mecA* genes isolated from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Gene* 1990; 94: 137-138.
3. Suzuki E, Hiramatsu K, Yokota T. Survey of methicillin-resistant clinical strains of coagulase-negative staphylococci for *mecA* gene distribution. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36: 429-434.
4. Chambers HF. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10: 781-791.
5. Zhang K, McClure JA, Elsayed S, Louie T, Conly JM. Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome *mec* types I to V in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 5026-5033.
6. Ito T, Ma XX, Takeuchi F, Okuma K, Yuzawa H, Hiramatsu K. Novel type V staphylococcal cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccrC*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 2637-2651.
7. Zetola N, Francis JS, Nuermberger EL, Bishai WR. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging threat. *Lancet Infect Dis* 2005; 5: 275-286.
8. Charlebois ED, Perdreau-Remington F, Kreiswirth B, Bangsberg DR, Ciccarone D, Diep BA et al. Origins of community strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis* 2004; 39: 47-54.
9. Daum RS, Ito T, Hiramatsu K, Hussain F, Mongkolrattanothai K, Jamklang M et al. A novel methicillin-resistance cassette in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates of diverse genetic backgrounds. *J Infect Dis* 2002; 186: 1344-1347.
10. Murakami K, Tomasz A. Involvement of multiple genetic determinants in high-level methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 1989; 171: 874-879.
11. Suzuki E, Kuwahara-Arai K, Richardson JF, Hiramatsu K. Distribution of *mec* regulator genes in methicillin-resistant *Staphylococcus* clinical strains. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 1219-1226.
12. Kobayashi N, Wu H, Kojima K, Taniguchi K, Urasawa S, Uehara N et al. Detection of *mecA*, *femA*, and *femB* genes in clinical strains of staphylococci using polymerase chain reaction. *Epidemiol Infect* 1994; 113: 259-266.
13. Alborn WE, Jr., Hoskins J, Unal S, Flokowitsch JE, Hayes CA, Dotzlaw JE et al. Cloning and characterization of *femA* and *femB* from *Staphylococcus epidermidis*. *Gene* 1996; 180: 177-181.
14. Berger-Bachi B, Barberis-Maino L, Strassle A, Kayser FH. *FemA*, a host-mediated factor essential for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: molecular cloning and characterization. *Mol Gen Genet* 1989; 219: 263-269.
15. de Jonge BL, Sidow T, Chang YS, Labischinski H, Berger-Bachi B, Gage DA et al. Altered mucopeptide composition in *Staphylococcus aureus* strains with an inactivated *femA* locus. *J Bacteriol* 1993; 175: 2779-2782.
16. Jarvis WR, Thornsberry C, Boyce J, Hughes JM. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at children's hospitals in the United States. *Pediatr Infect Dis* 1985; 4: 651-655.
17. Sahn DF, Marsilio MK, Piazza G. Antimicrobial resistance in key blood-stream bacterial isolates: electronic surveillance with the Surveillance Network Database—USA. *Clin Infect Dis* 1999; 29: 259-263.
18. Rossi FS, Cecon MEJR, Krebs VLJ. Infecções estafilocócicas adquiridas em unidades de terapia intensivas neonatais. *Pediatria (São Paulo)* 2005; 27: 38-47.
19. Morgan MG, Jackson B, Anderson D. Long-term methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) carriage and tagging of patient records. *J Hosp Infect* 1997; 36: 78-80.
20. Bogado I, Limansky A, Sutich E, Marchiaro P, Marzi M, Putero J et al. Molecular characterization of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from a neonatal intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2002; 23: 447-451.
21. Stoll BJ, Hansen N, Fanaroff AA, Wright LL, Carlo WA, Ehrenkranz RA et al. Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: the experience of the NICHD Neonatal Research Network. *Pediatrics* 2002; 110: 285-291.
22. Jarvis WR, Martone WJ. Predominant pathogens in hospital infections. *J Antimicrob Chemother* 1992; 29 Suppl A: 19-24.
23. Huebner J, Pier GB, Maslow JN, Muller E, Shiro H, Parent M et al. Endemic nosocomial transmission of *Staphylococcus epidermidis* bacteremia isolates in a neonatal intensive care unit over 10 years. *J Infect Dis* 1994; 169: 526-531.
24. Noel GJ, Kreiswirth BN, Edelson PJ, Nesin M, Projan S, Eisner W et al. Multiple methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains as a cause for a single outbreak of severe disease in hospitalized neonates. *Pediatr Infect Dis J* 1992; 11: 184-188.
25. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1997; 18: 426-439.
26. Medina-Acosta E, Cross GA. Rapid isolation of DNA from trypanosomatid protozoa using a simple 'mini-prep' procedure. *Mol Biochem Parasitol* 1993; 59: 327-329.
27. Mehrotra M, Wang G, Johnson WM. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1032-1035.
28. Strommenger B, Kettlitz C, Werner G, Witte W. Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 4089-4094.
29. Diekema DJ, Pfaller MA, Schmitz FJ, Smayevsky J, Bell J, Jones RN et al. Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. *Clin Infect Dis* 2001; 32 Suppl 2: S114-132.