



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO – UFPE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – CCS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL**

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DA
RESISTÊNCIA AOS MACROLÍDEOS, LINCOSAMIDAS E
ESTREPTOGRAMINAS B DE ISOLADOS CLÍNICOS DE
Staphylococcus spp.**

JUSSYÊGLES NIEDJA DA PAZ PEREIRA

**RECIFE/PE
2014**

JUSSYÊGLES NIEDJA DA PAZ PEREIRA

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DA
RESISTÊNCIA AOS MACROLÍDEOS, LINCOSAMIDAS E
ESTREPTOGRAMINAS B DE ISOLADOS CLÍNICOS DE
Staphylococcus spp.**

Dissertação de Mestrado apresentada à Banca examinadora do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Medicina Tropical.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Maria Amélia Vieira Maciel

Co-orientadora: Prof^ª Dr^ª Ana Catarina de Souza Lopes

**RECIFE/PE
2014**

Ficha catalográfica elaborada pela
Bibliotecária: Mônica Uchôa - CRB4-1010

P436c Pereira, Jussyêgles Niedja da Paz.
Caracterização fenotípica e molecular da resistência aos macrolídeos,
lincosamidas e estreptograminas b de isolados clínicos de *staphylococcus*
spp. / Jussyêgles Niedja da Paz Pereira. – Recife : O autor, 2014.
87 f. : il. ; tab. ; 30 cm.

Orientadora: Maria Amélia Vieira Maciel.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2014.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Staphylococcus. 2. Meticilina. 3. Clindamicina. 4. Eritromicina. 5.
Genes. I. Maciel, Maria Amélia Vieira (Orientadora). II. Título.

618.9883

CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2014-104)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)
PRÓ-REITORIA PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO (PROPESQ)
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE (CCS)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL (PPGMEDTROP)

RELATÓRIO DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DA MESTRANDA

JUSSYÊGLES NIEDJA DA PAZ PEREIRA

No dia 26 de fevereiro de 2014, às 14h00, na Sala de Aula do PPGMEDTROP, os Membros Doutores Prof. Dr. Fábio André Brayner dos Santos (CPqAM/FIOCRUZ) - Presidente da Banca, a Profª. Drª. Janete Magali de Araújo (UFPE) e a Profª. Drª. Nilma Cintra Leal (CPqAM/FIOCRUZ), componentes da Banca Examinadora, em sessão pública, arguíram a mestranda Jussyêgles Niedja da Paz Pereira sobre a sua Dissertação intitulada “**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DA RESISTÊNCIA AOS MACROLÍDEOS, LINCOSAMIDAS E ESTREPTOGRAMINAS B DE ISOLADOS CLÍNICOS DE *Staphylococcus spp.***”, a qual foi orientada pela Profª Drª Maria Amélia Vieira Maciel (UFPE) e co-orientada pela Profª. Drª. Ana Catarina de Souza Lopes. Ao final da arguição de cada membro da Banca Examinadora e resposta da mestranda, as seguintes menções foram publicamente fornecidas.

Prof. Dr. Fábio André Brayner dos Santos

APROVADA

Profª. Drª. Janete Magali de Araújo

APROVADA

Profª. Drª. Nilma Cintra Leal

APROVADA

Prof. Dr. Fábio André Brayner dos Santos

Profª. Drª. Janete Magali de Araújo

Profª. Drª. Nilma Cintra Leal



**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

Francisco de Souza Ramos

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Nicodemos Teles 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**

Vera Magalhães de Silveira

CORPO DOCENTE PERMANENTE

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 Rosângela Cunha Duarte Coelho

Marli Tenório Cordeiro

Ricardo Arraes de Alencar Ximenes

Valdênia Maria Oliveira de Souza

Vlúdia Maria Assis Costa

Vera Magalhães de Silveira

CORPO DOCENTE COLABORADOR

Maria de Fátima Pessoa Militão de Albuquerque

Rejane Pereira Neves

Este trabalho, dedico a Deus, por sempre me guiar e porque sem ele nada é possível e aos meus pais, Adilson Pereira e Sonia Maria, pelo amor, incentivo e pela presença tão especial em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela presença constante em minha vida, dando-me força e perseverança, permitindo minha vitória espiritual e material.

À minha mãe, Sonia Maria e ao meu pai, Adilson Pereira, pelo amor, estímulo, amizade, atenção, apoio, sábios conselhos, paciência, compreensão, ensinamentos e orações dedicadas a mim.

Aos meus irmãos, pelo carinho e incentivo.

À professora Amélia Maciel pela orientação, amizade, atenção, ensinamentos e confiança.

À professora Ana Lopes, por ter aceitado ser minha co-orientadora, pela ajuda, paciência, ensinamentos e atenção.

À Elizabeth Galdino, pela amizade e por ter feito impressões de vários artigos para mim.

À Marcelle, pela disponibilidade e ajuda.

À Dona Dejanira, pelo carinho e atenção.

A Jailton, pela amizade e estímulo.

Aos professores da Pós-graduação em Medicina Tropical, pelos ensinamentos.

Ao CNPq, pela bolsa de estudo.

Aos parceiros da turma de mestrado, pelos momentos compartilhados.

Aos alunos do Laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular do Departamento de Medicina Tropical da UFPE, pelo acolhimento e apoio.

A Walter Galdino, por estar sempre disposto a ajudar.

A todos que direta ou indiretamente, contribuíram para concretização deste trabalho.

Amanhã, este amanhã que imaginamos de maneira tão inquieta, não nos pertence: está nas mãos de Deus, isto é, nas mãos do mais terno e compreensivo dos pais.

(L. Veillot)

RESUMO

Os *Staphylococcus* spp. demonstraram, ao longo do tempo, a notável capacidade de desenvolver resistência a maioria dos antimicrobianos. Há um mecanismo de resistência aos macrolídeos, em *Staphylococcus* spp. que atinge também as lincosamidas e as estreptograminas B caracterizando a denominada resistência MLS_B, cuja expressão pode ser constitutiva (MLS_{BC}) ou induzível (MLS_{Bi}) e é codificada principalmente pelos genes *ermA* e *ermC*. A resistência MLS_{BC} é facilmente detectada pelos testes de susceptibilidade utilizados na rotina laboratorial, mas a resistência MLS_{Bi} não é. A terapia com clindamicina nos casos de infecção por isolados com resistência MLS_{Bi} pode falhar. O objetivo deste estudo foi caracterizar o perfil fenotípico (ocorrência dos fenótipos MLS_{BC} e MLS_{Bi}) e molecular (ocorrência dos genes *ermA* e *ermC*) da resistência MLS_B dos isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* e SCN (*Staphylococcus* coagulase negativos) sensíveis e resistentes à meticilina provenientes de pacientes do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC-UFPE), durante o ano de 2012. A susceptibilidade antimicrobiana de 103 isolados foi determinada pela técnica de disco difusão em ágar Mueller-Hinton. Posteriormente, foi realizado o *screening* de oxacilina. O fenótipo MLS_{Bi} foi detectado através do teste D. Foram submetidos a reação em cadeia da polimerase (PCR), 13 isolados com fenótipos MLS_{BC} e MLS_{Bi} para a detecção dos genes *ermA* e *ermC*. Os fenótipos MLS_{BC} e MLS_{Bi} foram identificados respectivamente em 39 (37,9%) e cinco (4,9%) isolados. O fenótipo MLS_{Bi} foi encontrado apenas em quatro (10,8%) dos *S. aureus* sensíveis à meticilina e em um (4,5%) dos *S. aureus* resistentes a meticilina. Dos 13 isolados submetidos a PCR, seis (46,2%) apresentaram um gene *erm*. Foi verificada a mesma frequência três (23,1%) dos genes *ermA* e *ermC* entre os isolados. Os genes *ermA* e *ermC* se fizeram presentes entre alguns dos isolados de *Staphylococcus* spp. do hospital estudado e apesar do fenótipo MLS_{Bi} ter sido menos frequente que o MLS_{BC}, é importante a realização do teste D para detectá-lo e assim, orientar condutas terapêuticas.

Palavras-chave: *Staphylococcus*. Meticilina. Clindamicina. Eritromicina. Genes.

ABSTRACT

Staphylococcus spp. demonstrated, over time, the remarkable ability to develop resistance to most antibiotics. There is a mechanism of resistance to macrolides in *Staphylococcus* spp. which also affects lincosamides and streptogramins B characterizing called MLS_B resistance, whose expression can be constitutive (cMLS_B) or inducible (iMLS_B) and is encoded mainly by *ermA* and *ermC* genes. The cMLS_B resistance is easily detected by susceptibility testing used in laboratorial routine, but the iMLS_B resistance is not. Therapy with clindamycin in cases of infection by isolates with resistance iMLS_B may fail. The aim of this study was to characterize the phenotypic profile (occurrence of cMLS_B and iMLS_B phenotypes) and molecular (occurrence of *ermA* and *ermC* genes) of MLS_B resistance of clinical isolates of susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and CNS (coagulase-negative *Staphylococcus*) of patients from the Clinical Hospital of Federal University of Pernambuco (HC-UFPE), during the year 2012. The antimicrobial susceptibility of 103 isolates was determined by disk diffusion technique on Mueller-Hinton agar. Posteriorly, oxacillin screening was performed. The iMLS_B phenotype was detected by D test. Were subjected to polymerase chain reaction (PCR), 13 isolates with cMLS_B and iMLS_B phenotypes to detect *ermA* and *ermC* genes. cMLS_B and iMLS_B phenotypes were identified respectively in 39 (37,9%) and five (4,9%) isolates. The iMLS_B phenotype was only observed in four (10,8%) of methicillin-susceptible *S. aureus* and one (4,5%) of methicillin-resistant *S. aureus*. Of the 13 isolates subjected to PCR, six (46,2%) showed one *erm* gene. The same frequency three (23,1%) of *ermA* and *ermC* genes among the isolates was observed. The *ermA* and *ermC* genes were present among some of the isolates of *Staphylococcus* spp. of the hospital studied and despite the phenotype iMLS_B have been less frequent than cMLS_B, it is important to perform the D test to detect it and thus guide treatment management.

Keywords: *Staphylococcus*. Methicillin. Clindamycin. Erythromycin. Genes.

LISTA DE FIGURAS

Artigo

- Figura 1** - Teste D positivo, demonstrando o achatamento do halo de clindamicina adjacente ao disco de eritromicina (denominado halo “D”)..... 49
- Figura 2** - Caracterização fenotípica da resistência MLS_B dos MSSA..... 49
- Figura 3** - Caracterização fenotípica da resistência MLS_B dos MRSA. 50
- Figura 4** - Caracterização fenotípica da resistência MLS_B dos MSCNS..... 50
- Figura 5** - Caracterização fenotípica da resistência MLS_B dos MRCNS..... 51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Variáveis relacionadas à caracterização fenotípica e molecular da resistência MLS_B. 29

Tabela 2 - Primers utilizados para a pesquisa dos genes de resistência *ermA* e *ermC* 32

Artigo

Tabela 1 - Perfil de susceptibilidade à eritromicina e à clindamicina dos isolados de *S. aureus* e SCN sensíveis e resistentes à meticilina. 48

Tabela 2 - Distribuição dos genes *ermA* e *ermC* entre os isolados de *Staphylococcus* spp. com resistência MLS_B 51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Infusão de cérebro e coração
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfato
<i>erm</i>	erythromycin ribosome methylase
HA-MRSA	<i>healthcare-associated</i> MRSA
HC	Hospital das Clínicas
MLS_B	Resistência aos macrolídeos, às lincosamidas e estreptograminas B
MLS_{BC}	Resistência MLS _B constitutiva
MLS_{Bi}	Resistência MLS _B induzível
MRCNS	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativo resistente à meticilina
MRS	<i>Staphylococcus</i> resistente à meticilina
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
MS_B	Resistência aos macrolídeos e às estreptograminas B
MSCNS	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativo sensível à meticilina
MSSA	<i>Staphylococcus aureus</i> sensível à meticilina
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
PIA	Pristinamicina IA
PIIA	Pristinamicina IIA
pb	Pares de base
PBP	Proteína ligadora de penicilina

PCR	Reação em cadeia da polimerase
RNAm	Ácido ribonucléico mensageiro
RNAr	Ácido ribonucléico ribossomal
SCCmec	Cassete Cromossômico Estafilocócico mec
SCN	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativo
Tn	Transposon
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
ULAB	Unidade Laboratório
UTI	Unidade de Terapia Intensiva

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 Características do gênero <i>Staphylococcus</i>	18
2.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	19
2.3 <i>Staphylococcus</i> coagulase negativos	20
2.4 Outros <i>Staphylococcus</i> coagulase negativos	20
2.5 <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à meticilina (MRSA): surgimento e disseminação hospitalar.	21
2.6 Macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas	23
2.7 Resistência aos macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas B em <i>Staphylococcus</i> spp.	24
3 OBJETIVOS	27
3.1 Objetivo geral	27
3.2 Objetivos específicos	27
4 METODOLOGIA	28
4.1 Desenho do estudo	28
4.2 Local do Estudo	28
4.3 População do estudo	28
4.4 Definição e Categorização das Variáveis do Estudo	28
4.5 Operacionalização da pesquisa	29
4.5.1 Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos	29
4.5.2 <i>Screening</i> de oxacilina	30
4.5.3 Teste D	30
4.5.4 Extração de DNA total	30
4.5.5 Detecção dos genes <i>ermA</i> e <i>ermC</i> pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR)	31
4.5.6 Eletroforese em gel de agarose	32
4.6 Considerações éticas	32
5 RESULTADOS	33
6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	34
REFERÊNCIAS	35
APÊNDICES	40

APÊNDICE A – Artigo	41
APÊNDICE B – Versão do Artigo em Inglês	61
ANEXOS	81
ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética	82
ANEXO B – Instruções aos Autores do The Brazilian Journal of Infectious Diseases	83

1 INTRODUÇÃO

O aumento da prevalência da resistência à meticilina em *Staphylococcus* spp. é um problema crescente. Isto tem levado a novos interesses relativos ao uso dos antimicrobianos macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas B para o tratamento das infecções estafilocócicas, com a clindamicina, uma lincosamida, representando uma escolha frequente para algumas dessas infecções, particularmente para infecções da pele e de tecidos moles, e uma alternativa em casos de intolerância à penicilina ou de resistência à meticilina (DAUREL *et al.*, 2007; FIEBELKORN *et al.*, 2003; PRABHU; RAO; RAO, 2011). Em *Staphylococcus* spp, um dos mecanismos de resistência aos macrolídeos consiste na modificação do alvo ribossomal, atingindo macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas B, caracterizando a denominada resistência MLS_B , cuja expressão pode ser constitutiva (MLS_{BC}) ou induzível (MLS_{Bi}) e é codificada pelos genes *ermA* (erythromycin ribosome methylase) e *ermC*, que são os principais determinantes nos estafilococos (FIEBELKORN *et al.*, 2003; LECLERCQ, 2002; MAHESH; RAMAKANT; JAGADEESH, 2013).

Conhecer o tipo de resistência MLS_B é importante para o estabelecimento da terapia, uma vez que isolados de *Staphylococcus* spp. com resistência constitutiva apresentam *in vitro* resistência a todos os macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas B e *in vivo*, a terapia com clindamicina nos casos de infecção por isolados de *Staphylococcus* spp. com resistência induzível pode selecionar mutantes *erm* constitutivos, resultando em falha terapêutica (DRINKOVIC *et al.*, 2001; FOKAS *et al.*, 2005; LECLERCQ, 2002; PRABHU, RAO; RAO, 2011). Vale ressaltar que a resistência MLS_{BC} é facilmente detectada pelos testes de susceptibilidade utilizados na rotina laboratorial, enquanto que a resistência MLS_{Bi} não é, porque por estes métodos, os isolados de *Staphylococcus* spp. com resistência induzível aparecem *in vitro* resistentes à eritromicina e sensíveis à clindamicina (DRINKOVIC *et al.*, 2001; KUMAR *et al.*, 2012; MAHESH; RAMAKANT; JAGADEESH, 2013; SHOUVAL *et al.*, 2011).

Para detectar a resistência induzível à clindamicina nos isolados de *Staphylococcus* spp., um dos testes indicados pelo CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) é o teste de difusão de disco-duplo (teste D) e quando os isolados apresentam este tipo de resistência, o CLSI recomenda citá-los como resistentes à clindamicina (CLSI, 2012). Então, os dados relativos à susceptibilidade aos antimicrobianos são importantes para a conduta frente às infecções, mas resultados de falsa sensibilidade podem ser obtidos, se os isolados não são

submetidos a testes que detectam a resistência induzível à clindamicina (YILMAZ *et al.*, 2007).

Trabalhos realizados em dois estados brasileiros com isolados hospitalares de *Staphylococcus* spp. relataram o fenótipo MLS_{BC} como o mais frequente (AMORIM *et al.*, 2009; COUTINHO *et al.*, 2010). Coutinho *et al.* (2010) avaliaram também a ocorrência dos genes *erm* entre os isolados analisados. No entanto a frequência da resistência MLS_{BC} e MLS_{Bi} varia entre os diferentes hospitais e existem outros mecanismos de resistência que conferem resistência a apenas uma ou duas das classes do complexo MLS_B (ROBERTS *et al.*, 1999; SEIFI *et al.*, 2012).

O objetivo deste estudo foi caracterizar o perfil fenotípico (ocorrência dos fenótipos MLS_{BC} e MLS_{Bi}) e molecular (ocorrência dos genes *ermA* e *ermC*) da resistência MLS_B dos isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* e SCN (*Staphylococcus coagulase* negativos) sensíveis e resistentes à meticilina provenientes de pacientes do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC-UFPE), a fim de se obter dados locais referentes à resistência que podem ser úteis para orientar condutas terapêuticas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Características do gênero *Staphylococcus*

O gênero *Staphylococcus* é composto de diversas espécies, muitas das quais podem ser encontradas em amostras clínicas humanas. Os estafilococos são geralmente encontrados na pele e em mucosas do homem e de outros animais (WINN *et al.*, 2008). O nome *Staphylococcus* é derivado da palavra grega *staphylé*, que significa “cacho de uvas”. Esse nome se refere ao fato de que as células desses cocos gram-positivos crescem em um padrão semelhante a um cacho de uvas (MURRAY *et al.*, 2004).

A maioria dos estafilococos apresenta diâmetro compreendido entre 0,5 a 1 µm, são micro-organismos imóveis (MURRAY *et al.*, 2004) e ubíquos na natureza (STROHL; ROUSE; FISHER, 2004). As espécies são, em sua maioria, anaeróbios facultativos, exceto *S. aureus* subesp. *anaerobius* e *S. saccharolyticus*. Essas duas espécies crescem em condições anaeróbicas e, ao contrário das espécies facultativas, são frequentemente catalase negativas (WINN *et al.*, 2008). Os estafilococos são robustos, sendo relativamente resistentes ao calor e à dessecação, podendo, portanto, persistir por longos períodos em fômites, que podem servir como fonte de infecção (STROHL; ROUSE; FISHER, 2004).

Este gênero é constituído por importantes patógenos humanos, causando um amplo espectro de doenças sistêmicas potencialmente fatais; infecções cutâneas, de tecidos moles, ossos e das vias urinárias; e infecções oportunistas (MURRAY *et al.*, 2004). As infecções por estafilococos podem ser bastante difíceis de tratar, especialmente as contraídas em hospitais, por causa da extraordinária habilidade destes micro-organismos adquirirem determinantes de resistência aos antibióticos (STROHL; ROUSE; FISHER, 2004).

As espécies mais comumente associadas à doença humana são *Staphylococcus aureus* (o membro mais virulento e mais bem conhecido do gênero), *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus capitis* e *Staphylococcus haemolyticus*. *Staphylococcus aureus* é a única espécie encontrada no ser humano que produz a enzima coagulase; assim, todas as outras espécies são normalmente referidas como *Staphylococcus* coagulase negativos (MURRAY *et al.*, 2004).

2.2 *Staphylococcus aureus*

S. aureus é uma das bactérias patogênicas mais importantes, uma vez que atua como agente de uma ampla gama de infecções, variando desde aquelas localizadas, geralmente superficiais, até algumas disseminadas, com elevada gravidade (TRABULSI; TEIXEIRA; BUERIS, 2005).

Esta bactéria pode determinar doenças clinicamente manifestas ou o estado de portador assintomático, também denominado colonização ou simplesmente portador, quando presente no organismo do hospedeiro sem ocasionar lesões aparentes. O *S. aureus* faz parte da flora transitória da pele em até um terço da população em geral, tendo como principais sítios reservatórios o vestíbulo nasal (35%) e a região perineal (20%), além das regiões umbilical, axilar e interpododáctila (5% a 10%), de onde poderá ocorrer disseminação, provocando doença e transmissão a outros indivíduos. Tais sítios podem estar colonizados persistentemente, intermitentemente ou ser resistentes à colonização pela bactéria (CAVALCANTI *et al.*, 2006). Os portadores servem como fonte de infecção para eles próprios e para os outros, por contato direto, por contaminação de fômites ou de alimentos, podendo, neste caso, resultar em intoxicação alimentar (STROHL; ROUSE; FISHER, 2004).

S. aureus possui diversos fatores de virulência que podem contribuir para sua capacidade de produzir doença. Entretanto, essas propriedades, e genotipicidade não são constantes em todas as cepas desta bactéria. Os principais fatores de virulência são cápsula, peptidoglicano, ácidos teicóicos, proteína A, adesinas, enzimas e toxinas extracelulares. As toxinas estafilocócicas também são responsáveis pela necrose epidérmica tóxica (síndrome estafilocócica da pele escaldada), síndrome do choque tóxico e intoxicação de origem alimentar (RATTI; SOUSA, 2009; SANTOS *et al.*, 2007).

Apesar de haver uma grande variedade de quadros clínicos causados pelo *S. aureus*, estes podem ser divididos em três principais tipos: as infecções superficiais, tais como os abscessos cutâneos e as infecções de feridas; as infecções sistêmicas, tais como osteomielite, miosite tropical, endocardite, pneumonia e septicemia e os quadros tóxicos, tais como síndrome do choque tóxico, síndrome da pele escaldada e a intoxicação alimentar (TRABULSI; TEIXEIRA; BUERIS, 2005).

O *S. aureus* é distinguido dos SCN principalmente pela positividade para coagulase. Além disso, as colônias de *S. aureus* tendem a ser amarelas (*aureus* significa ouro) e hemolíticas, em vez de cinzas e não hemolíticas como as colônias dos SCN. Este micro-

organismo é também distinguido da maioria dos SCN por ser positivo para manitol (STROHL; ROUSE, FISHER, 2004).

Embora o *S. aureus* possa ser susceptível à ação de vários antimicrobianos ativos contra bactérias gram-positivas (tais como penicilinas, cefalosporinas, eritromicina, aminoglicosídeos, tetraciclina e cloranfenicol), é também reconhecido pela sua elevada capacidade de desenvolver resistência a todas. Assim, a antibioticoterapia adequada das infecções estafilocócicas deve ser precedida da escolha do antimicrobiano com base nos resultados de testes de susceptibilidade (TRABULSI; TEIXEIRA; BUERIS, 2005).

2.3 *Staphylococcus coagulase negativos*

Das espécies de SCN que têm sido recuperadas como comensais normais da pele humana e das narinas anteriores, a mais abundante e importante é o *S. epidermidis*. O segundo mais importante SCN é o *S. saprophyticus*, que tem um nicho clínico especial (STROHL; ROUSE; FISHER, 2004).

O *S. epidermidis* faz parte da flora humana normal da pele e das membranas mucosas (LEVINSON; JAWETZ, 2005). As principais doenças causadas por este micro-organismo estão associadas ao uso de dispositivos médicos implantados, tais como cateteres e próteses. Além disso incluem bacteremias/septicemias, endocardites, meningites, peritonites, endoftalmite, osteomielites, artrites, infecções do trato urinário e várias outras, dependendo do tipo de cateter ou prótese bem como da localização destes dispositivos (BUERIS *et al.*, 2005). Dentre as espécies de SCN, *S. epidermidis* é a mais prevalente em bacteremias, situando-se entre 74% e 92% dos *Staphylococcus spp.* isolados em hemoculturas (JUNIOR *et al.*, 2009).

S. saprophyticus é, depois da *Escherichia coli*, o agente mais comum de infecção urinária em mulheres na faixa de 20 a 40 anos de idade. Pode também causar infecção urinária no homem, principalmente depois dos 50 anos. A patogenicidade está relacionada a sua capacidade de aderir as células do epitélio urinário. Este micro-organismo é um habitante normal da pele e da região periuretral do homem e de mulheres (BUERIS *et al.*, 2005).

2.4 Outros *Staphylococcus coagulase negativos*

Embora as espécies coagulase-negativas diferentes de *S. epidermidis* e *S. saprophyticus* sejam frequentemente encontradas como contaminantes de amostras clínicas,

os avanços médicos estabeleceram um importante papel para muitos dos outros estafilococos coagulase-negativos nas infecções e doenças humanas. Várias outras espécies foram descritas como causadoras de infecções em humanos, principalmente infecções de feridas, urinárias, bacteremia, osteomielite, sepse relacionada ao uso de cateteres, infecções de derivação ventriculoperitoneal e endocardite de valvas nativas e próteses valvares. Esses agentes estão sendo cada vez mais reconhecidos como importantes patógenos em pacientes imunocomprometidos, incluindo lactentes prematuros, pacientes neutropênicos com câncer, indivíduos idosos com doenças subjacentes graves e pacientes hospitalizados após procedimentos invasivos e com dispositivos de plástico de demora. As infecções causadas por muitas dessas outras espécies são adquiridas no ambiente hospitalar. As espécies mais comumente implicadas incluem *S. haemolyticus*, *S. lugdunensis*, *S. schleiferi*, *S. warneri*, *S. hominis*, *S. simulans* e *S. saccharolyticus* (WINN *et al.*, 2008).

2.5 *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA): surgimento e disseminação hospitalar

S. aureus é um patógeno que se destaca por sua facilidade de propagação, principalmente no ambiente intra-hospitalar, 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). A resistência bacteriana é importante devido a sua elevada prevalência hospitalar, a sua relação com falhas nos tratamentos com antimicrobianos, aumento de morbimortalidade e aumento nos custos relacionados ao tratamento dos pacientes envolvidos (LICHTENFELS *et al.*, 2010).

A implantação da antibioticoterapia no início da década de 1930, com o emprego da sulfanilamida (descoberta por Gerard Domagk, em 1932), aparentemente ditava o fim das doenças infecciosas. Contudo, já no final daquela década, surgiam as primeiras cepas de *S. aureus* resistentes aquele quimioterápico. Com a entrada da penicilina em uso clínico, o *S. aureus* passou a desenvolver resistência a esse betalactâmico pela produção de betalactamase (penicilinase), capaz de hidrolisar o anel betalactâmico da penicilina, tornando-a inativa (SANTOS *et al.*, 2007).

Na década de 1940, a grande maioria dos *S. aureus* era sensível à penicilina. No fim dos anos 50, a espécie *S. aureus* tinha adquirido resistência a praticamente todos os antibióticos de uso parenteral, incluindo a eritromicina e a tetraciclina. A introdução das

penicilinas resistentes às penicilinas, na década de 1960, possibilitou um avanço na terapêutica antiestafilocócica. Com o uso das penicilinas semi-sintéticas, como a meticilina empregada no tratamento de infecções estafilocócicas, surgiram cepas resistentes à meticilina denominadas MRSA (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) (SOUZA; REIS; PIMENTA, 2005), também resistentes aos demais betalactâmicos (SANTOS *et al.*, 2007).

A resistência à meticilina é conferida pelo gene *mecA* que é transportado por um elemento genético móvel, conhecido como Cassete Cromossômico Estafilocócico *mec* (*SCCmec*) que codifica uma proteína de ligação à penicilina modificada, chamada PBP2a ou PBP2', que possui uma baixa afinidade para betalactâmicos, incluindo penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos (COSTA *et al.*, 2011).

As cepas MRSA rapidamente se disseminaram em ambientes hospitalares, limitando, assim, a antibioticoterapia de combate às estafilocóccias por *S. aureus* aos glicopeptídeos vancomicina e teicoplanina. No entanto, em 1997 foi descrito, pelo professor Keich Hiramatsu, da Universidade de Jutendo, Japão, um caso de uma cepa MRSA resistente à vancomicina isolada de uma ferida cirúrgica de um garoto de quatro meses. Em 2000 foram encontradas, no Brasil, as primeiras cepas de *S. aureus* com resistência à vancomicina em um hospital de referência do município de Queimados, no Rio de Janeiro (SANTOS *et al.*, 2007).

Mundialmente, o MRSA tem sido considerado como um dos patógenos mais importantes relacionados à saúde humana (FERREIRA *et al.*, 2009). As infecções hospitalares ou doenças associadas ao cuidado são comuns e problemáticas devido a sua frequência, morbidade e mortalidade. A frequência de infecções ocasionadas por MRSA tem apresentado crescimento contínuo em instituições hospitalares a nível mundial (RATTI; SOUSA, 2009). No Brasil, o MRSA é uma das principais causas de infecções relacionadas à assistência à saúde (COSTA *et al.*, 2011).

A prevalência de cepas MRSA associadas aos serviços de saúde, também denominadas HA-MRSA (*healthcare-associated MRSA*), é variável, dependendo do país, instituição ou setor hospitalar em estudo. No Brasil, os índices encontrados são, em média, bastante elevados (40% a 80%) especialmente, entre as cepas isoladas em unidades de terapia intensiva (UTIs). Os fatores de risco relacionados a infecções por HA-MRSA incluem geralmente, idade superior a 60 anos, uso de corticóides, uso prévio de antibióticos, internação prolongada e presença de dispositivos médicos invasivos (TIZOTTI *et al.*, 2010).

Os glicopeptídeos, como vancomicina e teicoplanina, ainda constituem a terapêutica de escolha nas infecções por MRSA. Contudo, relatos de cepas de *S. aureus* apresentando

susceptibilidade reduzida aos glicopeptídeos em diversos países, incluindo o Brasil, têm levado a dilemas terapêuticos na prática clínica (TIZOTTI *et al.*, 2010).

2.6 Macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas

Os antimicrobianos macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas são amplamente usados no tratamento de infecções estafilocócicas (LINA *et al.*, 1999; ZELAZNY *et al.*; 2005).

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 (CHAMBERS, 2010; LECLERCQ, 2002). 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) (LECLERCQ, 2002). Estas classes diferem em suas propriedades farmacocinéticas e em suas respostas aos mecanismos de resistência bacteriana (LECLERCQ; COURVALIN, 1991).

As lincosamidas (lincomicina e o mais ativo derivado semi-sintético, clindamicina) são derivados alquil de prolina e são desprovidos de um anel de lactona (LECLERCQ; COURVALIN, 1991). A clindamicina é usada no tratamento de infecções de pele e tecidos moles causadas por estafilococos. Boa absorção oral faz deste antimicrobiano uma opção importante na terapia ambulatorial ou como seguimento após terapia intravenosa (CIRAJ *et al.*, 2009; 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 micro-organismo (LECLERCQ; COURVALIN, 1991; SOUZA; REIS; PIMENTA, 2005). 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 (SOUZA; REIS; PIMENTA, 2005).

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

Os macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas B são antimicrobianos quimicamente distintos, mas têm efeito inibitório similar na síntese protéica bacteriana (ADALETI *et al.*, 2009; JUYAL *et al.*, 2013).

Os macrolídeos são agentes bacteriostáticos que inibem a síntese protéica pela ligação reversível à subunidade ribossomal 50S dos micro-organismos sensíveis (SCHERECKENBERGER; ILENDO; RISTOW, 2004). A eritromicina foi introduzida em 1952 como o primeiro antimicrobiano macrolídeo. Infelizmente, dentro de um ano, estafilococos resistentes à eritromicina foram descritos nos Estados Unidos, Europa e Japão (ROBERTS *et al.*, 1999).

Dois mecanismos primários resultam em resistência aos antimicrobianos macrolídeos. O primeiro envolve o efluxo de macrolídeos e é relativamente comum em *S. aureus* em algumas áreas geográficas. Uma bomba de efluxo específico é codificada pelo gene *msrA* nos estafilococos. 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 (FIEBELKORN *et al.*, 2003; LEWIS; JORGENSEN, 2005; MAHESH; RAMAKANT; JAGADEESH, 2013; ZELAZNY *et al.*, 2005). O segundo mecanismo de resistência aos macrolídeos em estafilococos consiste na modificação do local de ligação do antimicrobiano no ribossomo (LEWIS; JORGENSEN, 2005). 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 (LEWIS; JORGENSEN, 2005; SCHMITZ, *et al.* 2000). 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; LEWIS; JORGENSEN, 2005; ROBERTS, *et al.*, 1999; TEKIN *et al.*, 2013).

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 (LECLERCQ, 2002).

A resistência MLS_B constitutiva 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). Curiosamente a combinação de estreptograminas B e A, quinupristina-dalfopristina parece manter sua atividade contra os isolados com fenótipo MLS_{Bc} , embora a presença deste fenótipo altere a atividade destes antimicrobianos de bactericida para bacteriostática (LEWIS; JORGENSEN, 2005).

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_B induzível 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; LEWIS; JORGENSEN, 2005).

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_B induzível, quando os discos de eritromicina e clindamicina são colocados em posições não adjacentes (COUTINHO *et al.*, 2010; FIEBELKORN *et al.*, 2003; KUMAR *et al.*, 2012). O problema criado pela resistência MLS_B induzível em estafilococos consiste em não saber se os resultados de sensibilidade *in vitro* gerados para a clindamicina são confiáveis (LEWIS; JORGENSEN, 2005).

Em 2004 o NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards), atual CLSI, abordou a questão da detecção e notificação da resistência MLS_{Bi} em *Staphylococcus*

spp. e descreveu métodos que podem rotineiramente detectar a resistência induzível à clindamicina (LEWIS; JORGENSEN, 2005).

De acordo com o CLSI (2012), 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, 2012).

O uso da clindamicina (ou de um macrolídeo não indutor) para o tratamento de infecção causada por estafilococos com resistência induzível não está desprovido de risco (CIRAJ *et al.*, 2009; LECLERCQ, 2002). Embora a clindamicina seja um não indutor, a exposição a este antimicrobiano de estafilococos com resistência MLS_B induzível pode resultar em resistência cruzada aos macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas B, *in vitro* ou *in vivo*. Isto ocorre devido à seleção de mutantes *erm* constitutivos preexistentes, levando à falha terapêutica (DAUREL *et al.*, 2007; PRABHU, RAO; RAO, 2011; YILMAZ *et al.*, 2007). É possível também que mutações ocorram espontaneamente e transformem o fenótipo MLS_{Bi} dos estafilococos em MLS_{Bc} na ausência de um macrolídeo indutor. A preocupação consiste no fato de que esta mudança na expressão pode ser selecionada no meio da terapia com uma lincosamida (LEWIS; JORGENSEN, 2005).

Portanto, se a resistência induzível pode ser detectada de forma confiável, na rotina em isolados significantes clinicamente, a clindamicina pode ser seguramente e efetivamente usada nos pacientes infectados por isolados com verdadeira sensibilidade à clindamicina (FIEBELKORN *et al.*, 2003).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar o perfil fenotípico (ocorrência dos fenótipos MLS_{BC} e MLS_{Bi}) e molecular (ocorrência dos genes *ermA* e *ermC*) da resistência MLS_B dos isolados clínicos de *S. aureus* e SCN sensíveis e resistentes à meticilina (MSSA, MRSA, MSCNS e MRCNS) provenientes de pacientes do HC-UFPE, durante ano de 2012.

3.2 Objetivos específicos

- Classificar como MSSA, MRSA, MSCNS e MRCNS os isolados de *S. aureus* e SCN provenientes de pacientes do HC-UFPE, durante o ano de 2012.
- Determinar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos eritromicina e clindamicina dos isolados clínicos de *S. aureus* e SCN sensíveis e resistentes à meticilina provenientes de pacientes do HC-UFPE, durante o ano de 2012.
- Determinar a frequência dos fenótipos MLS_{BC} e MLS_{Bi} nos isolados clínicos de *S. aureus* e SCN sensíveis e resistentes à meticilina provenientes de pacientes do HC-UFPE, durante o ano de 2012.
- Determinar a frequência dos genes *ermA* e *ermC*, nos isolados clínicos de *S. aureus* e SCN sensíveis e resistentes à meticilina, que apresentarem os fenótipos MLS_{BC} e MLS_{Bi} provenientes de pacientes do HC-UFPE, durante o ano de 2012.

4 METODOLOGIA

4.1 Desenho do estudo

Trata-se de um estudo descritivo de base laboratorial. Através deste estudo foram obtidos dados concernentes à resistência de isolados clínicos de *S. aureus* e SCN sensíveis e resistentes à meticilina provenientes de pacientes do HC-UFPE, durante o ano de 2012, que poderão servir de auxílio nas condutas terapêuticas diante das infecções estafilocócicas neste hospital.

4.2 Local do Estudo

Os isolados clínicos utilizados neste estudo foram provenientes de pacientes do HC-UFPE durante o ano de 2012. Este hospital oferta atendimento à população nas mais variadas áreas e apresenta disponíveis para a mesma 413 leitos. Os isolados foram cedidos pela orientadora e fazem parte da coleção de isolados de um projeto preexistente.

Os testes fenotípicos e a etapa molecular deste estudo foram realizados no Laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular do Departamento de Medicina Tropical/UFPE.

4.3 População do Estudo

A população deste estudo foi constituída pelos pacientes infectados por *S. aureus* ou SCN do HC-UFPE, sendo os isolados clínicos oriundos de amostras diversas e fornecidos pela Unidade Laboratório (ULAB)/HC/UFPE durante o ano de 2012.

4.4 Definição e Categorização das Variáveis do Estudo

As variáveis deste estudo estão descritas na tabela seguinte:

Tabela 1 - Variáveis relacionadas à caracterização fenotípica e molecular da resistência MLS_B.

Variável	Definição	Categorização
Fenótipo sensível	Corresponde ao fenótipo dos isolados de <i>S. aureus</i> e SCN que no antibiograma, pela técnica de disco difusão em ágar Mueller-Hinton, apresentaram sensibilidade à eritromicina e à clindamicina.	1. Presente 2. Ausente
MLS _{BC}	Fenótipo de resistência MLS _B constitutiva. Corresponde ao fenótipo dos isolados de <i>S. aureus</i> e SCN que no antibiograma, pela técnica de disco difusão em ágar Mueller-Hinton, apresentaram resistência à eritromicina e à clindamicina.	1. Presente 2. Ausente
MLS _{Bi}	Fenótipo de resistência MLS _B induzível. Corresponde ao fenótipo dos isolados de <i>S. aureus</i> e SCN que no antibiograma, pela técnica de disco difusão em ágar Mueller-Hinton, apresentaram resistência à eritromicina e sensibilidade ou resistência intermediária à clindamicina e foram teste D positivos.	1. Presente 2. Ausente
MS _B	Fenótipo de resistência aos macrolídeos e às estreptograminas B. Corresponde ao fenótipo dos isolados de <i>S. aureus</i> e SCN que no antibiograma, pela técnica de disco difusão em ágar Mueller-Hinton, apresentaram resistência à eritromicina e sensibilidade ou resistência intermediária à clindamicina e foram teste D negativos.	1. Presente 2. Ausente
<i>ermA</i>	Gene relacionado à resistência MLS _B , identificado pela técnica da PCR.	1. Presente 2. Ausente
<i>ermC</i>	Gene relacionado à resistência MLS _B , identificado pela técnica da PCR.	1. Presente 2. Ausente

4.5 Operacionalização da Pesquisa

4.5.1 Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos

Os isolados clínicos da referida coleção estavam estocados em glicerol (25%) a -20°C, inicialmente foram inoculados em caldo Brain Heart Infusion (BHI) e após incubação, foram semeados em ágar sangue, para verificação da pureza das colônias. Com os mesmos, foi realizado o antibiograma através da técnica de disco difusão em ágar Mueller-Hinton também conhecida como método de Kirby-Bauer (1966), conforme os padrões estabelecidos pelo CLSI (2012) para *Staphylococcus*, utilizando os seguintes antimicrobianos: clindamicina 2 µg, eritromicina 15 µg, cefoxitina 30 µg e oxacilina 1 µg. A leitura dos halos de inibição formados foi efetuada por meio do paquímetro. Os resultados foram expressos em milímetros e interpretados de acordo com os padrões determinados pelo CLSI (2012) (BAUER; KIRBY, 1966; CLSI, 2012).

4.5.2 Screening de oxacilina

Após a execução do antibiograma, foram selecionados os isolados que apresentaram resistência à oxacilina e/ou cefoxitina. Posteriormente à seleção dos isolados, foi realizada a suspensão direta das colônias, a partir do ágar sangue de carneiro 5%, para que fosse obtida uma turbidez equivalente a uma solução padrão 0,5 da escala de McFarland. Uma alça de platina de 1 μ L foi mergulhada nessa suspensão e em seguida foi feito o inóculo em uma área com diâmetro de 10 a 15mm em placas contendo ágar Mueller-Hinton com NaCl (4% v/v; 0,68 mol/L) acrescido de 6 μ g/mL de oxacilina. Em seguida, estas placas foram incubadas a 35°C durante 24 horas e após a leitura dos resultados, foram consideradas como: > 1 colônia = resistente (CLSI, 2012). Como controle de qualidade, foram utilizadas as cepas padrão para MRSA e MSSA: *S. aureus* ATCC 29213- Sensível e *S. aureus* ATCC 33591- Resistente (PEREZ; D'AZEVEDO, 2008).

4.5.3 Teste D

De acordo com o CLSI (2012), foram selecionados os isolados de *S. aureus* e SCN que no antibiograma, pela técnica de disco difusão em ágar Mueller-Hinton, realizado anteriormente apresentaram resistência à eritromicina e sensibilidade ou resistência intermediária à clindamicina. Para a execução deste teste um disco de 2 μ g de clindamicina foi colocado a uma distância de 15mm a 26 mm da borda de um disco de eritromicina de 15 μ g numa placa contendo ágar Mueller-Hinton semeada do mesmo modo como foi no antibiograma. Após a incubação a 35°C por 16-18 horas, os isolados que não apresentaram achatamento do halo de clindamicina foram relatados como sensíveis à clindamicina (teste D negativo) e os isolados que apresentaram achatamento do halo de clindamicina adjacente ao disco de eritromicina (Halo "D") indicaram resistência induzível à clindamicina (teste D positivo) (CLSI, 2012).

4.5.4 Extração do DNA total

Para a pesquisa dos genes *ermA* e *ermC*, foi realizada a extração rápida do DNA total de um grupo de isolados selecionado aleatoriamente entre os isolados que apresentaram os fenótipos MLS_{BC} e MLS_{Bi}, através da técnica modificada de lise térmica diretamente da colônia (HU; ZHANG; MEITZLER, 1999). Uma colônia de cada isolado semeado em ágar

nutriente foi inoculada em 5mL de BHI e incubada a 37°C durante 24 horas. Após a incubação, 1 mL da cultura bacteriana foi centrifugada a 15000 rpm durante 5 minutos. Em seguida o sobrenadante foi desprezado, o pellet foi ressuspensão em 200 µL de água milli Q estéril e a suspensão bacteriana foi aquecida a 100°C durante 10 minutos no termociclador. Após o aquecimento, esta suspensão foi centrifugada a 15000 rpm durante 5 minutos. Em seguida foram retirados 100 µL do sobrenadante, transferidos para eppendorf e congelados a -20°C até o momento do uso. Três amostras do DNA extraído foram quantificadas, através de espectrofotometria. A partir dos valores encontrados, foi calculada uma média correspondente à quantidade de DNA extraído, que foi utilizada para todas as amostras. Posteriormente o DNA extraído de cada amostra foi diluído, para se obter uma concentração final de 40 ng/µL.

4.5.5 Detecção dos genes *ermA* e *ermC* pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para a realização da PCR, foram utilizados os primers descritos por Lina *et al.* (1999) 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') (Tabela 2). 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 desoxirribonucleotídeo trifosfato (dNTP) (8 mM), 5,0 µL de tampão (5x), 1,5µL de MgCl₂ (25 mM), 0,4 µL de *Taq* DNA polimerase (5U) e 14,5 µL de água milli Q 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 *Taq* DNA polimerase (5U) e de água milli Q 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) acrescidas de modificação realizada no laboratório onde esta pesquisa foi realizada. 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. Quanto aos controles positivos, durante a execução das primeiras reações, os mesmos não foram inclusos, uma vez que não foram obtidos. No entanto, quando houve a identificação de isolado positivo para o gene *ermA* e de isolado

positivo para o gene *ermC*, estes passaram a ser utilizados como controles positivos dos respectivos genes.

Tabela 2 - Primers utilizados para a pesquisa dos genes de resistência *ermA* e *ermC*.

Genes	Primers	Fragmento (pb)
<i>ermA</i>	F (5'-GTTCAAGAACAATCAATACAGAG-3')	421
	R (5'-GGATCAGGAAAAGGACATTTTAC-3')	
<i>ermC</i>	F (5'-GCTAATATTGTTTAAATCGTCAATTCC-3')	572
	R (5'-GGATCAGGAAAAGGACATTTTAC-3')	

F: forward, R: reverse, pb: pares de base.

Fonte: LINA *et al.*, 1999.

4.5.6 Eletroforese em gel de agarose

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 0,5x. Foi utilizado um marcador de peso molecular de 100 pb. Esses produtos foram corados com Blue, visualizados em transiluminador de luz ultravioleta e fotodocumentados.

4.6 Considerações Éticas

Os isolados clínicos fornecidos pela ULAB/HC/UFPE durante o ano de 2012, fazem parte de um projeto previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFPE (CEP/CCS/ UFPE) com registro nº 009/11 (Anexo A).

5 RESULTADOS

Os resultados desta pesquisa serão apresentados na forma de artigo científico (Apêndice A) que será submetido ao *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* (Anexo B).

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

- A maioria dos *S. aureus* foi classificada como MSSA, enquanto que a maioria dos SCN foi classificada como MRCNS.
- Foi observado um maior percentual de isolados com fenótipo sensível (ERY-S, CLI-S).
- Verificou-se o fenótipo MLS_{BC} nos MSSA, MRSA, MSCNS e MRCNS.
- O fenótipo MLS_{BC} apresentou maior frequência que os fenótipos MLS_{Bi} e MS_B.
- Detectou-se o fenótipo MLS_{Bi} apenas nos *S. aureus*, tanto nos MSSA quanto nos MRSA.
- O teste D distinguiu cinco (4,9%) isolados com fenótipo MLS_{Bi} de 12 (11,6%) com fenótipo MS_B. Apesar da frequência do fenótipo MLS_{Bi} ter sido baixa, é importante fazer esta distinção para auxiliar condutas terapêuticas.
- Os genes *ermA* e *ermC* foram encontrados com a mesma frequência.
- A obtenção de dados locais fenotípicos e moleculares sobre um determinado mecanismo de resistência é útil, visto que pode servir de auxílio para salientar a importância do estabelecimento de medidas que visem ao controle da propagação deste mecanismo no hospital onde o estudo foi realizado.
- Será realizada PCR, para detecção dos genes *ermA* e *ermC* com os 31 isolados restantes que apresentaram os fenótipos MLS_{BC} e MLS_{Bi};
- Serão submetidos ao sequenciamento um produto de PCR positivo para o gene *ermA* e um positivo para o gene *ermC*.

REFERÊNCIAS

- ADALETI, R. *et al.* Prevalence of phenotypic resistance of *Staphylococcus aureus* isolates to macrolide, lincosamide, streptogramin B, ketolid and linezolid antibiotics in Turkey. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 1, p. 11-14, 2009.
- AMORIM, D. M. R. *et al.* Resistência induzível à clindamicina entre isolados clínicos de *Staphylococcus aureus*. **O Mundo da Saúde**, v. 33, n. 4, p. 401-405, 2009.
- BAUER, A.W.; KIRBY, E. M. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, p. 493-496, 1966.
- BUERIS, V. *et al.* *Staphylococcus epidermidis* e outras espécies de *Staphylococcus*, *Micrococcus* e *Rothia* (*Stomatococcus*). In: Trabulsi, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 2005, p. 183-187.
- CAVALCANTI, S. M. M. *et al.* Estudo comparativo da prevalência de *Staphylococcus aureus* importado para as unidades de terapia intensiva de hospital universitário, Pernambuco, Brasil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 9, n. 4, p. 436-46, 2006.
- 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, 2010, p. 929-953.
- CHAVEZ-BUENO, S. *et al.* Inducible clindamycin resistance and molecular epidemiologic trends of pediatric community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Dallas, Texas. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 6, p. 2283-2288, 2005.
- CIRAJ, A. M. *et al.* Inducible clindamycin resistance among clinical isolates of staphylococci. **Indian Journal of Pathology and Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 49-51, 2009.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement (January 2012). **CLSI document M100-S22**, v. 32, n. 3, 2012.
- COSTA, T. M. *et al.* Características clínicas e esquema de tratamento medicamentoso de infecções por *Staphylococcus aureus*: uma possível proposta de identificação para o laboratorista e tratamento para o clínico. **Revista Práxis**, v. 3, n. 5, p. 15-24, 2011.
- COUTINHO, V. L. S. *et al.* Distribution of *erm* genes and low prevalence of inducible resistance to clindamycin among *staphylococci* isolates. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 6, p. 564- 568, 2010.
- DAUREL, C. *et al.* Differences in potential for selection of clindamycin-resistant mutants between inducible *erm(A)* and *erm(C)* *Staphylococcus aureus* genes, **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 546-550, 2007.

DRINKOVIC, D. *et al.* Clindamycin treatment of *Staphylococcus aureus* expressing inducible clindamycin resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, p. 315-316, 2001.

FERREIRA, W. A. *et al.* Prevalência de *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (MRSA) em pacientes atendidos em ambulatório de dermatologia geral em Manaus-Amazonas. **Revista de Patologia Tropical**, v. 38, n. 2, p. 83-92, 2009.

FIEBELKORN, K. R. *et al.* Practical disk diffusion method for detection of inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 10, p. 4740-4744, 2003.

FOKAS, S. *et al.* Prevalence of inducible clindamycin resistance in macrolide-resistant *Staphylococcus* spp. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 11, n. 4, p. 337-340, 2005.

FRANÇA, C. A. *et al.* Antimicrobial resistance of *Staphylococcus* spp. from small ruminant mastitis in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 8, p. 747-753, 2012.

HU, Y.; ZHANG, Q.; MEITZLER, J. C. Rapid and sensitive detection of *Escherichia coli* O157:H7 in bovine faeces by a multiplex PCR. **Journal of Applied Microbiology**, v. 87, n. 6, p. 867-876, 1999.

JUNG, Y. H. *et al.* Prevalence and characterization of macrolide-lincomycin-streptogramin B-resistant *Staphylococcus aureus* in Korean hospitals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, n. 2, p. 458-460, 2008.

JUNIOR, F. C. S. *et al.* Prevalência de *Staphylococcus* spp. resistentes à meticilina isolados em uma maternidade escola da Cidade de Natal, Estado do Rio Grande do Norte. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 2, p. 179-182, 2009.

JUYAL, D. *et al.* The prevalence of inducible clindamycin resistance among Staphylococci in a tertiary care hospital – A study from the Garhwal Hills of Uttarakhand, India. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 7, n. 1, p. 61-65, 2013.

KUMAR, S. *et al.* Inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus* isolates from a tertiary care hospital in eastern India. **Annals of Tropical Medicine and Public Health**, v. 5, n. 5, p. 468-470, 2012.

LECLERCQ, R. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. **Clinical Infectious Diseases**, v. 34, p. 482- 492, 2002.

LECLERCQ, R.; COURVALIN, P. Bacterial resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin antibiotics by target modification. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 35, n. 7, p. 1267- 1272, 1991.

LEVINSON, W.; JAWETZ, E. Cocos Gram-positivos. In: _____. **Microbiologia Médica e Imunologia**. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005, p. 103-114.

LEWIS, J. S.; JORGENSEN, J. H. Inducible clindamycin resistance in staphylococci: should clinicians and microbiologists be concerned? **Clinical Infectious Diseases**, v. 40, p. 280-285, 2005.

LICHTENFELS, E. *et al.* Prevalência de resistência bacteriana nas infecções de ferida operatória causadas por estafilococos em cirurgia vascular periférica. **Revista da Associação Médica do Rio Grande do Sul**, v. 54, n. 2, p. 141-146, 2010.

LINA, G. *et al.* Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins among staphylococci. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 5, p. 1062-1066, 1999.

MAHESH, C. B.; RAMAKANT, B. K.; JAGADEESH, V. S. The prevalence of inducible and constitutive clindamycin resistance among the nasal isolates of *Staphylococci*. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 7, n. 8, p. 1620-1622, 2013.

MERINO-DÍAZ, L. *et al.* Detección de resistência inducible a clindamicina em aislados cutâneos de *Staphylococcus* spp. por métodos fenotípicos y genotípicos. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 25, n. 2, p. 77-81, 2007.

MURRAY, P. R. *et al.* *Staphylococcus* e microrganismos relacionados. In: _____. **Microbiologia Médica**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, p. 188-201.

PEREZ, L. R. R.; D'AZEVEDO, P. A. Evaluation of the accuracy of various phenotypic tests to detect oxacilin resistance in coagulase-negative staphylococci. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 12, n.3, p. 210-212, 2008.

PRABHU, K.; RAO, S.; RAO V. Inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from clinical samples. **Journal of Laboratory Physicians**, v. 3, n. 1, p. 25-27, 2011.

RAITTI, R. P.; SOUSA, C. P. *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (MRSA) e infecções nosocomiais. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 2, p. 137-143, 2009.

ROBERTS, M. C. *et al.* Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 12, p. 2823-2830, 1999.

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.

SANTOS, A. L. *et al.* *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.

SCHMITZ, F. J. *et al.* Prevalence of macrolide-resistance genes in *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecium* isolates from 24 european university hospitals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 45, p. 891-894, 2000.

SCHRECKENBERGER, P. C.; ILENDÓ, E.; RISTOW, K. L. Incidence of constitutive and inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci in a community and a tertiary care hospital. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 6, p. 2777-2779, 2004.

SEIFI, N. *et al.* Inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* isolates recovered from Mashhad, Iran. **Iranian Journal of Microbiology**, v. 4, n. 2, p. 82-86, 2012.

SHOUVAL, D. S. *et al.* Inducible clindamycin resistance among methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* infections in pediatric patients. **Israel Medical Association Journal**, v. 13, p. 605- 608, 2011.

SHRESTHA, B.; POKHREL, B. M.; MOHAPATRA, T. M. Phenotypic characterization of nosocomial isolates of *Staphylococcus aureus* with reference to MRSA. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 3, n. 7, p. 554-560, 2009.

SOUSA, L. U. *et al.* 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.

SOUZA, M. V.; REIS, C.; PIMENTA, F. C. Revisão sobre a aquisição gradual de resistência de *Staphylococcus aureus* aos antimicrobianos. **Revista de Patologia Tropical**, v. 34, n. 1, p. 27-36, 2005.

SPILIOPOULOU, I. *et al.* *erm(C)* is the predominant genetic determinant for the expression of resistance to macrolides among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates in Greece. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 53, n. 5, p. 814-817, 2004.

STROHL, W. A.; ROUSE, H; FISHER, B. D. Estafilococos. In:_____. **Microbiologia ilustrada**. Porto Alegre: Artmed, 2004, p. 151-158.

TEKIN, A. *et al.* Assessment of methicillin and clindamycin resistance patterns in *Staphylococcus aureus* isolated from a tertiary hospital in Turkey. **Le Infezioni in Medicina**, v. 21, n. 2, p. 111-116, 2013.

TIZOTTI, M. K. *et al.* Prevalência e perfil de sensibilidade de *Staphylococcus aureus* isolados em um hospital escola na cidade de Santa Maria, Brasil. **Revista Saúde (Santa Maria)**, v. 36, n. 1, p. 47-56, 2010.

TRABULSI, L. R.; TEIXEIRA, L. M.; BUERIS, V. *Staphylococcus aureus*. In: Trabulsi, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 2005, p. 175-182.

WINN, W. C. *et al.* Cocos Gram-positivos: Parte I: Estafilococos e Cocos Gram-Positivos Relacionados. In: _____. **Koneman Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008, p. 617-665.

YILMAZ, G. *et al.* Detection and prevalence of inducible clindamycin resistance in staphylococci. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, p. 342-345, 2007.

ZELAZNY, A. M. *et al.* Selection of strains for quality assessment of the disk induction method for detection of inducible clindamycin resistance in staphylococci: a CLSI collaborative study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 2613-2615, 2005.

ZORGANI, A. *et al.* Inducible clindamycin resistance among staphylococci isolated from burn patients. **Libyan Journal of Medicine**, v. 4, n. 3, p. 104-106, 2009.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Artigo

Caracterização fenotípica e molecular da resistência aos macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas B de isolados clínicos de *Staphylococcus* spp.

Jussyêgles Niedja da Paz Pereira¹; Marcelle Aquino Rabelo¹; Lílian Rodrigues Alves¹; Jailton Lobo da Costa Lima²; Ana Catarina de Souza Lopes¹; Maria Amélia Vieira Maciel.¹

¹Departamento de Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, PE, Brasil.

²Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco, Pernambuco, PE, Brasil.

Endereço para correspondência:

Jussyêgles Niedja da Paz Pereira

Departamento de Medicina Tropical/Universidade Federal de Pernambuco

Av. Prof. Moraes Rego, nº 1235, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco-Brasil

CEP: 50670-901

Telefone: (81) 2126-8526

E-mail: ju-biomed@hotmail.com

Resumo

Introdução: Existe um mecanismo de resistência aos macrolídeos, em *Staphylococcus* spp. que atinge também as lincosamidas e as estreptograminas B caracterizando a denominada resistência MLS_B, cuja expressão pode ser constitutiva (MLS_{BC}) ou induzível (MLS_{Bi}) e é codificada principalmente pelos genes *ermA* e *ermC*. A resistência MLS_{BC} é facilmente

detectada pelos testes de susceptibilidade utilizados na rotina laboratorial, mas a resistência MLS_{Bi} não é. A terapia com clindamicina nos casos de infecção por isolados com resistência MLS_{Bi} pode falhar. **Objetivo:** caracterizar o perfil fenotípico (ocorrência dos fenótipos MLS_{Bc} e MLS_{Bi}) e molecular (ocorrência dos genes *ermA* e *ermC*) da resistência MLS_B dos isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* coagulase negativos sensíveis e resistentes à metilina provenientes de pacientes do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC-UFPE), durante o ano de 2012. **Métodos:** A susceptibilidade antimicrobiana de 103 isolados foi determinada pela técnica de disco difusão em ágar Mueller-Hinton. Posteriormente, foi realizado o *screening* de oxacilina. O fenótipo MLS_{Bi} foi detectado através do teste D. Foram submetidos a reação em cadeia da polimerase (PCR), 13 isolados com fenótipos MLS_{Bc} e MLS_{Bi} para a detecção dos genes *ermA* e *ermC*. **Resultados:** Os fenótipos MLS_{Bc} e MLS_{Bi} foram identificados respectivamente em 39 (37,9%) e cinco (4,9%) isolados. O fenótipo MLS_{Bi} foi encontrado apenas em quatro (10,8%) dos *S. aureus* sensíveis à metilina e em um (4,5%) dos *S. aureus* resistentes a metilina. Dos 13 isolados submetidos a PCR, seis (46,2%) apresentaram um gene *erm*. Foi verificada a mesma frequência três (23,1%) dos genes *ermA* e *ermC* entre os isolados. **Conclusão:** os genes *ermA* e *ermC* se fizeram presentes entre alguns dos isolados de *Staphylococcus* spp. do hospital estudado e apesar do fenótipo MLS_{Bi} ter sido menos frequente que o MLS_{Bc} , é importante a realização do teste D para detectá-lo e assim, orientar condutas terapêuticas.

Palavras-chave: *Staphylococcus*; metilina; clindamicina; eritromicina; genes.

Introdução

O aumento da prevalência da resistência à metilina em *Staphylococcus* spp. é um problema crescente. Isto tem levado a novos interesses relativos ao uso dos antimicrobianos

macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas B para o tratamento das infecções estafilocócicas, com a clindamicina, uma lincosamida, representando uma escolha frequente para algumas dessas infecções, particularmente para infecções da pele e de tecidos moles, e uma alternativa em casos de intolerância à penicilina ou de resistência à meticilina.¹⁻³ Em *Staphylococcus* spp, um dos mecanismos de resistência aos macrolídeos consiste na modificação do alvo ribossomal, atingindo macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas B, caracterizando a denominada resistência MLS_B, cuja expressão pode ser constitutiva (MLS_{BC}) ou induzível (MLS_{Bi}) e é codificada pelos genes *ermA* (erythromycin ribosome methylase) e *ermC*, que são os principais determinantes nos estafilococos.^{2,4,5}

Conhecer o tipo de resistência MLS_B é importante para o estabelecimento da terapia, uma vez que isolados de *Staphylococcus* spp. com resistência constitutiva apresentam *in vitro* resistência a todos os macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas B e *in vivo*, a terapia com clindamicina nos casos de infecção por isolados de *Staphylococcus* spp. com resistência induzível pode selecionar mutantes *erm* constitutivos, resultando em falha terapêutica.^{3,4,6,7} Vale ressaltar que a resistência MLS_{BC} é facilmente detectada pelos testes de susceptibilidade utilizados na rotina laboratorial, enquanto que a resistência MLS_{Bi} não é, porque por estes métodos, os isolados de *Staphylococcus* spp. com resistência induzível aparecem *in vitro* resistentes à eritromicina e sensíveis à clindamicina.^{5,6,8,9}

Para detectar a resistência induzível à clindamicina nos isolados de *Staphylococcus* spp., um dos testes indicados pelo CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) é o teste de difusão de disco-duplo (teste D) e quando os isolados apresentam este tipo de resistência, o CLSI recomenda citá-los como resistentes à clindamicina.¹⁰ Então, os dados relativos à susceptibilidade aos antimicrobianos são importantes para a conduta frente às infecções, mas resultados de falsa sensibilidade podem ser obtidos, se os isolados não são submetidos a testes que detectam a resistência induzível à clindamicina.¹¹

Trabalhos realizados em dois estados brasileiros com isolados hospitalares de *Staphylococcus* spp. relataram o fenótipo MLS_{BC} como o mais frequente.^{12,13} Coutinho et al.¹³ avaliaram também a ocorrência dos genes *erm* entre os isolados analisados. No entanto a frequência da resistência MLS_{BC} e MLS_{Bi} varia entre os diferentes hospitais e existem outros mecanismos de resistência que conferem resistência a apenas uma ou duas das classes do complexo MLS_B.^{14,15}

O objetivo deste estudo foi caracterizar o perfil fenotípico (ocorrência dos fenótipos MLS_{BC} e MLS_{Bi}) e molecular (ocorrência dos genes *ermA* e *ermC*) da resistência MLS_B dos isolados clínicos de *S. aureus* e SCN (*Staphylococcus* coagulase negativos) sensíveis e resistentes à metilina provenientes de pacientes do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC-UFPE), a fim de se obter dados locais referentes à resistência que podem ser úteis para orientar condutas terapêuticas.

Materiais e métodos

Isolados clínicos

Os isolados clínicos foram provenientes de amostras diversas oriundas de pacientes infectados por *S. aureus* ou SCN do HC-UFPE, durante o ano de 2012 e estavam estocados em glicerol (25%) a -20°C. Para a verificação da pureza das colônias, foram inoculados em caldo Brain Heart Infusion (BHI) e após incubação, foram semeados em ágar sangue.

Susceptibilidade aos antimicrobianos

O antibiograma foi realizado através da técnica de disco difusão em ágar Mueller-Hinton, conforme os padrões estabelecidos pelo CLSI¹⁰ para *Staphylococcus*, utilizando os seguintes antimicrobianos: clindamicina 2 µg, eritromicina 15 µg, cefoxitina 30 µg e oxacilina

1 µg. A leitura dos halos de inibição formados foi efetuada por meio do paquímetro. Os resultados foram expressos em milímetros e interpretados de acordo com os padrões determinados pelo CLSI.¹⁰

Screening de oxacilina

Os isolados que apresentaram resistência à oxacilina e/ou cefoxitina foram submetidos ao *screening* de oxacilina. Foi realizada a suspensão direta das colônias, a partir do ágar sangue de carneiro 5%, para que fosse obtida uma turbidez equivalente a uma solução padrão 0,5 da escala de McFarland. Uma alça de platina de 1µL foi mergulhada nessa suspensão e em seguida foi feito o inóculo em uma área com diâmetro de 10 a 15mm em placas contendo ágar Mueller-Hinton com NaCl (4% v/v; 0,68 mol/L) acrescido de 6 µg/mL de oxacilina. Em seguida, estas placas foram incubadas a 35°C durante 24 horas e após a leitura dos resultados, foram consideradas como: > 1 colônia = resistente.¹⁰ Como controle de qualidade, foram utilizadas as cepas padrão para MRSA e MSSA: *S. aureus* ATCC 29213- Sensível e *S. aureus* ATCC 33591- Resistente.¹⁶

Teste D

Foram selecionados os isolados de *S. aureus* e SCN que no antibiograma apresentaram resistência à eritromicina e sensibilidade ou resistência intermediária à clindamicina. Para a execução deste teste um disco de 2 µg de clindamicina foi colocado a uma distância de 15mm a 26 mm da borda de um disco de eritromicina de 15 µg numa placa contendo ágar Mueller-Hinton semeada do mesmo modo como foi no antibiograma. Após a incubação a 35°C por 16-18 horas, os isolados que não apresentaram achatamento do halo de clindamicina foram relatados como sensíveis à clindamicina (teste D negativo) e os isolados que apresentaram

achatamento do halo de clindamicina adjacente ao disco de eritromicina (Halo “D”) indicaram resistência induzível à clindamicina (teste D positivo).¹⁰

Extração do DNA total

Para a pesquisa dos genes *ermA* e *ermC*, foi realizada a extração rápida do DNA total de um grupo de isolados selecionado aleatoriamente entre os isolados que apresentaram os fenótipos MLS_{Bc} e MLS_{Bi}, através da técnica modificada de lise térmica diretamente da colônia.¹⁷ Uma colônia de cada isolado semeado em ágar nutriente foi inoculada em 5mL de BHI e incubada a 37°C durante 24 horas. Após a incubação, 1 mL da cultura bacteriana foi centrifugada a 15000 rpm durante 5 minutos. Em seguida o sobrenadante foi desprezado, o pellet foi ressuspensão em 200 µL de água milli Q estéril e a suspensão bacteriana foi aquecida a 100°C durante 10 minutos no termociclador. Após o aquecimento, esta suspensão foi centrifugada a 15000 rpm durante 5 minutos. Em seguida foram retirados 100 µL do sobrenadante, transferidos para eppendorf e congelados a -20°C até o momento do uso. Três amostras do DNA extraído foram quantificadas, através de espectrofotometria. A partir dos valores encontrados, foi calculada uma média correspondente à quantidade de DNA extraído, que foi utilizada para todas as amostras. Posteriormente o DNA extraído de cada amostra foi diluído, para se obter uma concentração final de 40 ng/µL.

Detecção dos genes *ermA* e *ermC* pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para a realização da PCR, foram utilizados os primers descritos por Lina et al.¹⁸ 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'). 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 desoxirribonucleotídeo trifosfato (dNTP) (8 mM), 5,0 µL de tampão (5x), 1,5µL de MgCl₂ (25 mM), 0,4 µL de *Taq* DNA polimerase (5U) e 14,5 µL de água milli Q 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 *Taq* DNA polimerase (5U) e de água milli Q 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.¹⁹ acrescidas de modificação realizada no laboratório onde esta pesquisa foi realizada. 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. Quanto aos controles positivos, quando houve a identificação de isolado positivo para o gene *ermA* e de isolado positivo para o gene *ermC*, estes passaram a ser utilizados como controles positivos dos respectivos genes. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 0,5x. Foi utilizado um marcador de peso molecular de 100 pb. Esses produtos foram corados com Blue, visualizados em transiluminador de luz ultravioleta e fotodocumentados.

Resultados

Foram analisados 59 (57,3%) isolados clínicos de *S. aureus* e 44 (42,7%) de SCN, totalizando 103 isolados. Destes 103 isolados, 37 (35,9%), 22 (21,4%), 14 (13,6%) e 30 (29,1%) foram classificados respectivamente como *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina (MSSA), *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), *Staphylococcus*

coagulase negativo sensível à meticilina (MSCNS) e *Staphylococcus* coagulase negativo resistente à meticilina (MRCNS) (Tabela 1).

Tabela 1 - Perfil de susceptibilidade à eritromicina e à clindamicina dos isolados de *S. aureus* e SCN sensíveis e resistentes à meticilina.

Fenótipos	MSSA n (%)	MRSA n (%)	MSCNS n (%)	MRCNS n (%)	Total n (%)
ERY-S, CLI-S (sensível)	25 (67,6)	5 (22,7)	4 (28,6)	7 (23,3)	41 (39,8)
ERY-S, CLI-I	1 (2,7)	0 (0)	1 (7,1)	0 (0)	2 (1,9)
ERY-S, CLI-R	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
ERY-I, CLI-S	1 (2,7)	0 (0)	2 (14,3)	0 (0)	3 (2,9)
ERY-I, CLI-I	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
ERY-I, CLI-R	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (3,3)	1 (1)
ERY-R, CLI-R (MLS _{Bc})	4 (10,8)	15 (68,2)	3 (21,4)	17 (56,7)	39 (37,9)
ERY-R, CLI-S/I, Teste D + (MLS _{Bi})	4 (10,8)	1 (4,5)	0 (0)	0 (0)	5 (4,9)
ERY-R, CLI-S/I, Teste D - (MS _B)	2 (5,4)	1 (4,5)	4 (28,6)	5 (16,7)	12 (11,6)
Total	37 (35,9)	22 (21,4)	14 (13,6)	30 (29,1)	103 (100)

Nota: ERY: eritromicina; CLI: clindamicina; S: sensível; I: intermediário; R: resistente; MSSA: *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina; MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina; MSCNS: *Staphylococcus* coagulase negativo sensível à meticilina; MRCNS: *Staphylococcus* coagulase negativo resistente à meticilina; MLS_B: macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas B; MLS_{Bc}: fenótipo de resistência MLS_B constitutiva; MLS_{Bi}: fenótipo de resistência MLS_B induzível; MS_B: fenótipo de resistência aos macrolídeos e às estreptograminas B.

O fenótipo sensível (ERY-S, CLI-S) foi detectado em 25 (67,6%), cinco (22,7%), quatro (28,6%) e sete (23,3%) dos MSSA, MRSA, MSCNS e MRCNS, respectivamente (Tabela 1). Detectou-se o fenótipo MLS_{Bc} (ERY-R, CLI-R) respectivamente em quatro (10,8%), 15 (68,2%), três (21,4%) e 17 (56,7%) dos MSSA, MRSA, MSCNS e MRCNS. O fenótipo MLS_{Bi} (ERY-R, CLI-S, teste D positivo) (Figura 1) foi encontrado apenas em quatro (10,8%) dos MSSA e em um (4,5%) dos MRSA. Detectou-se o fenótipo MS_B (ERY-R, CLI-

S, teste D negativo) em dois (5,4%), um (4,5%), quatro (28,6%) e cinco (16,7%) dos MSSA, MRSA, MSCNS e MRCNS, respectivamente (Tabela 1) (Figuras 2, 3, 4 e 5).



Figura 1 - Teste D positivo, demonstrando o achatamento do halo de clindamicina adjacente ao disco de eritromicina (denominado halo “D”).

Fonte: PEREIRA, 2014.

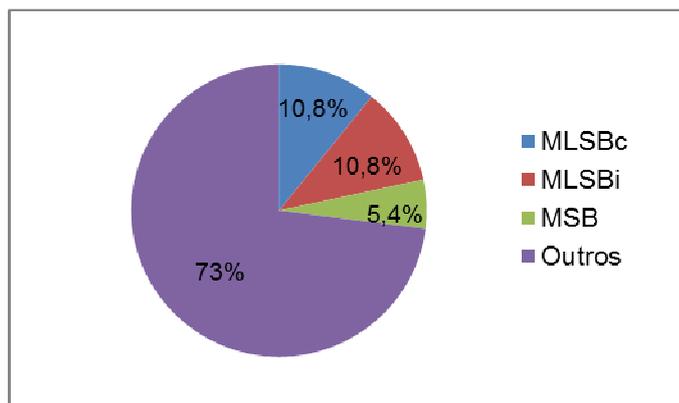


Figura 2 - Caracterização fenotípica da resistência MLS_B dos MSSA.

Nota: MLS_B : macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas B; MSSA: *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina; MLS_{Bc} : fenótipo de resistência MLS_B constitutiva; MLS_{Bi} : fenótipo de resistência MLS_B induzível; MS_B : fenótipo de resistência aos macrolídeos e às estreptograminas B.

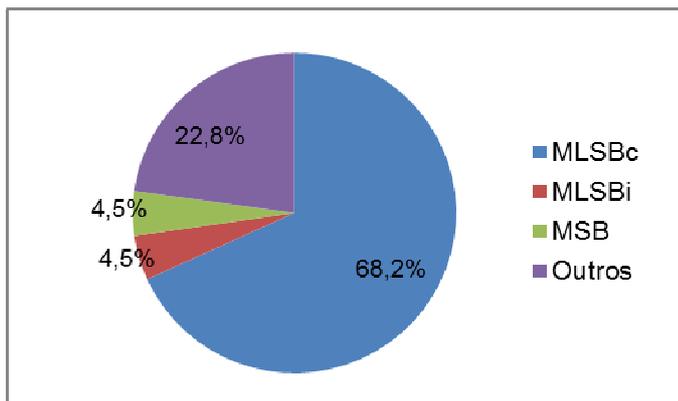


Figura 3 - Caracterização fenotípica da resistência MLS_B dos MRSA.

Nota: MLS_B : macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas B; MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina; MLS_{Bc} : fenótipo de resistência MLS_B constitutiva; MLS_{Bi} : fenótipo de resistência MLS_B induzível; MS_B : fenótipo de resistência aos macrolídeos e às estreptograminas B.

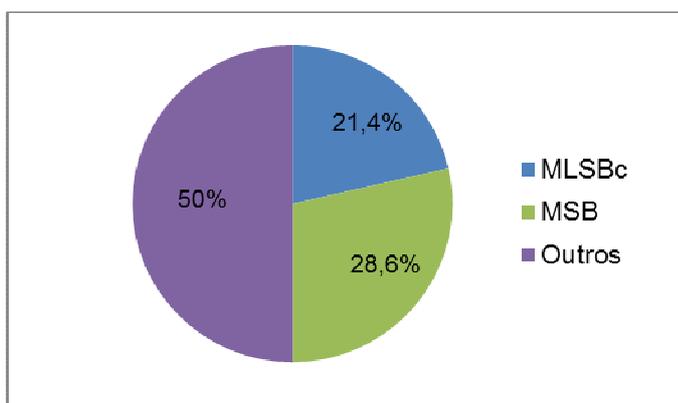


Figura 4 - Caracterização fenotípica da resistência MLS_B dos MSCNS.

Nota: MLS_B : macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas B; MSCNS: *Staphylococcus* coagulase negativo sensível à meticilina; MLS_{Bc} : fenótipo de resistência MLS_B constitutiva; MS_B : fenótipo de resistência aos macrolídeos e às estreptograminas B.

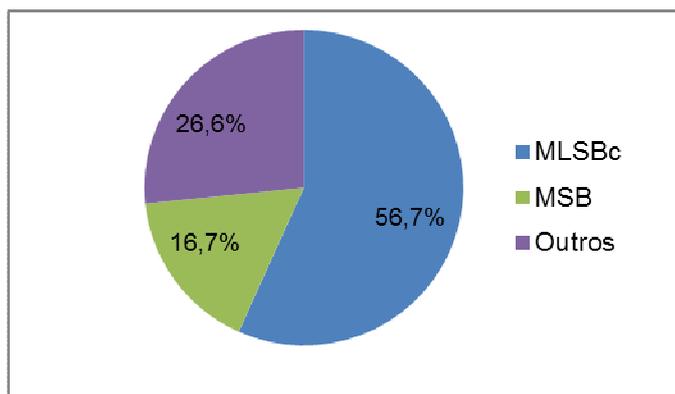


Figura 5 - Caracterização fenotípica da resistência MLS_B dos MRCNS.

Nota: MLS_B : macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas B; MRCNS: *Staphylococcus* coagulase negativo resistente à meticilina; MLS_{Bc} : fenótipo de resistência MLS_B constitutiva; MS_B : fenótipo de resistência aos macrolídeos e às estreptograminas B.

Para a identificação dos genes *ermA* e *ermC*, entre os 44 isolados com fenótipos MLS_{Bc} e MLS_{Bi} , 13 foram escolhidos aleatoriamente e submetidos à PCR. Destes 13 isolados, seis (46,2%) apresentaram um gene *erm*. Foi verificada a mesma frequência três (23,1%) dos genes *ermA* e *ermC* entre os isolados. Em nenhum dos isolados foi verificada a associação destes genes e sete (53,8%) não apresentaram os referidos genes (Tabela 2).

Tabela 2 - Distribuição dos genes *ermA* e *ermC* entre isolados de *Staphylococcus* spp. com resistência MLS_B .

Genes	Isolados (%)
<i>ermA</i>	3 (23,1)
<i>ermC</i>	3 (23,1)
<i>ermA</i> + <i>ermC</i>	0 (0)
Nenhum	7 (53,8)
Total	13 (100)

Discussão

Neste estudo verificou-se que a frequência de MSSA 25 (67,6%) foi maior que a de MRSA cinco (22,7%) e, que a de MSCNS quatro (28,6%) foi menor que a de MRCNS sete (23,3%). Em um trabalho executado na Índia, entre os 313 isolados de *Staphylococcus* spp. analisados, foram encontrados 83 (64,84%) MSSA e 45 (35,15%) MRSA, de forma similar ao presente estudo e, contrariamente ao mesmo, foram encontrados 124 (67,02%) MSCNS e 61 (32,97%) MRCNS.⁵ Um total de 1687 isolados de *Staphylococcus* spp. investigados na Turquia, consistiu de 419 (24,8%) MSSA e 464 (27,5%) MRSA, diferentemente deste estudo e, o restante dos isolados, de modo semelhante a este, consistiu de 196 (11,6%) MSCNS e 608 (36,1%) MRCNS.¹¹

O fenótipo sensível (ERY-S, CLI-S) 41 (39,8%) neste estudo, predominou entre os isolados avaliados. Este fenótipo também foi predominante em trabalhos desenvolvidos na Índia, na Líbia e na Turquia os quais detectaram o referido fenótipo em 192 (51,5%), 87 (54,7%) e 688 (40,8%) isolados, respectivamente.^{20,11,21}

No presente estudo, o fenótipo MLS_{BC} 39 (37,9%) foi predominante em relação ao fenótipo MLS_{Bi} cinco (4,9%) e ao fenótipo de resistência aos macrolídeos e às estreptograminas B (MS_B) 12 (11,6%), em concordância com outras pesquisas realizadas no Brasil.^{12,13} Uma destas pesquisas foi efetuada em São Paulo, e revelou respectivamente 37 (25,17%) e nove (6,12%) isolados com fenótipos MLS_{BC} e MLS_{Bi}, enquanto que o MS_B não foi detectado.¹² A outra foi realizada no Rio Grande do Sul, e identificou 71 (46,7%), cinco (3,3%) e cinco (3,3%) isolados com fenótipos MLS_{BC}, MLS_{Bi} e MS_B, respectivamente.¹³

Observou-se, neste estudo que o fenótipo MLS_{BC} prevaleceu entre os isolados resistentes à meticilina, o que está em concordância com estudos desenvolvidos em outros países^{3,5,11,15,21} e no Brasil.¹²

O fenótipo MS_B apresentou maior frequência 12 (11,6%) que o MLS_{Bi} cinco (4,9%), no presente estudo. Divergindo deste, o trabalho elaborado por Kumar et al.,⁸ na Índia detectou a mesma frequência 33 (16,9%) dos fenótipos MS_B e MLS_{Bi} entre os isolados de *S. aureus* analisados. Merino-Díaz et al.,²² na Espanha identificaram o gene *msrA* em todos os isolados de *Staphylococcus* spp. com fenótipo MS_B. Em *Staphylococcus* spp. esse gene é responsável por um mecanismo de efluxo que confere resistência aos macrolídeos e as estreptograminas B, mas não à clindamicina.^{5,23}

Apenas os *S. aureus* apresentaram o fenótipo MLS_{Bi} e a frequência do mesmo foi maior entre os MSSA quatro (10,8%) que entre os MRSA um (4,5%), neste estudo. Uma pesquisa executada em dois hospitais de Chicago detectou em um deles, o fenótipo MLS_{Bi} em 59 (20%) isolados entre os MSSA e em 14 (7%) isolados entre os MRSA, no outro hospital o fenótipo MLS_{Bi} foi identificado em 94 (19%) e em 30 (12%) isolados entre os MSSA e MRSA, respectivamente.²⁴ Em um trabalho efetuado na Turquia, oito (5,8%) isolados entre os MSSA e dois (1,7%) isolados entre os MRSA apresentaram o fenótipo MLS_{Bi}.²⁵ No trabalho desenvolvido em São Paulo, observou-se o fenótipo MLS_{Bi} em sete (6,73%) isolados entre os MSSA e em dois (4,65%) entre os MRSA.¹² Estes dados gerados pelos trabalhos anteriormente citados são similares aos do presente estudo. No entanto, há outras pesquisas realizadas a nível internacional nas quais o fenótipo MLS_{Bi} foi prevalente entre os MRSA.^{3,8,15,26}

Portanto dados relevantes de susceptibilidade aos antimicrobianos são significativos para o estabelecimento de uma terapia adequada, por isso que a realização do teste D é importante.^{20,24} Reportar um isolado de *Staphylococcus* spp. como sensível à clindamicina sem verificar se o mesmo apresenta resistência induzível, pode resultar na instituição de uma terapia inadequada com clindamicina. Em contrapartida, um resultado negativo para

resistência induzível à clindamicina, confirma a sensibilidade a este antimicrobiano, proporcionando uma opção terapêutica muito boa.^{3,8}

No presente estudo, cada um dos genes *ermA* e *ermC* foi detectado em três (23,1%) isolados com fenótipos de resistência MLS_B analisados. Em alguns estudos, contrários a este, o gene *ermA* foi identificado com maior frequência que o gene *ermC*, como em um realizado no Irã, no qual os genes *ermA* e *ermC* foram encontrados em 76 (60,3%) e 69 (54,8%) isolados de *S. aureus*, respectivamente.²⁷ Schmitz et al.,²⁸ ao analisarem isolados de *S. aureus* provenientes de 24 hospitais universitários europeus detectaram o gene *ermA* em 571 (67%) isolados e o *ermC* em 192 (23%). Jung et al.,²⁹ na Coreia identificaram entre 280 isolados de *S. aureus*, o gene *ermA* em 250 isolados e o *ermC* em 14.

Em outros estudos, também discordantes deste, o gene *ermC* predominou em relação ao gene *ermA*, como no trabalho desenvolvido na Espanha, no qual o gene *ermC* foi mais frequentemente detectado, tanto nos isolados de *S. aureus* quanto nos de SCN com fenótipos constitutivo e induzível.²² Spiliopoulou et al.,³⁰ na Grécia identificaram os genes *ermA* e *ermC* em 22% e 70% dos isolados de *S. aureus*, respectivamente.

Há relatos da associação dos referidos genes nos isolados de *Staphylococcus* spp.,²⁷⁻²⁹ porém no presente estudo, esta não foi observada.

Neste estudo, os sete (53,8%) isolados do grupo analisado, que não apresentaram os genes *ermA* ou *ermC*, podem conter o gene *ermB*. Os isolados que apresentaram os genes *ermA* ou *ermC* também podem contê-lo, uma vez que a associação destes genes é possível. O gene *ermB* não foi pesquisado porque é geralmente detectado em isolados de *Staphylococcus* spp. de procedência animal^{13,22,28} e encontra-se disseminado principalmente entre estreptococos e enterococos.⁴ Coutinho et al.,¹³ no Rio Grande do Sul, relataram a baixa frequência do gene *ermB*. Eles verificaram que entre os 152 isolados de *Staphylococcus* spp. analisados, 77 apresentaram um ou mais gene *erm*, os genes *ermA*, *ermC* e *ermB* foram

encontrados respectivamente em 49, 29 e três isolados e, a combinação destes genes foi encontrada em quatro isolados,¹³ dados discordantes deste estudo. No entanto, em um trabalho desenvolvido no Texas, com isolados de *S. aureus* de origem pediátrica, entre 67 isolados avaliados, o gene *ermB* foi identificado em 31 destes e, os genes *ermA* e *ermC* foram detectados em 12 e 24 isolados, respectivamente.³¹

Então foi possível verificar a variação das frequências dos fenótipos da resistência MLS_B e dos genes *erm* entre os hospitais e regiões geográficas, já reportada por outros autores.^{13,15,21,27} Diante disso, salienta-se a importância da determinação dessas frequências em um local específico.^{13,21}

A boa correlação entre os métodos fenotípicos e genotípicos permite inferir o mecanismo de resistência à eritromicina e à clindamicina, estabelecer o tratamento antimicrobiano mais adequado, assim como apreciar as diferenças epidemiológicas em sua distribuição.²²

Conclusão

Portanto os genes *ermA* e *ermC* foram detectados e apresentaram a mesma frequência entre os isolados de *Staphylococcus* spp. com fenótipos MLS_{BC} e MLS_{Bi} selecionados. Apesar do fenótipo MLS_{Bi} ter sido menos frequente que o MLS_{BC} e que o MS_B , é importante a realização do teste D para identificá-lo e dessa forma orientar condutas terapêuticas. Como os dados fenotípicos e moleculares acerca de um determinado mecanismo de resistência aos antimicrobianos variam entre os hospitais e regiões geográficas, a obtenção de dados locais referentes ao mesmo é útil, uma vez que pode servir de auxílio para ressaltar a importância da implementação de procedimentos que visem ao controle da disseminação deste mecanismo, no hospital onde o estudo foi realizado.

Referências

1. Daurel C, Huet C, Dhalluin A, Bes M, Etienne J, Leclercq R. Differences in potential for selection of clindamycin-resistant mutants between inducible *erm(A)* and *erm(C)* *Staphylococcus aureus* genes. J Clin Microbiol. 2007; 46: 546-50.
2. Fiebelkorn KR, Crawford SA, McElmeel ML, Jorgensen JH. Practical disk diffusion method for detection of inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. J Clin Microbiol. 2003; 41: 4740-4.
3. Prabhu, K; Rao, S; Rao V. Inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from clinical samples. J Lab Physicians. 2011; 3: 25-7.
4. Leclercq R. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. Clin Infect Dis. 2002; 34: 482- 92.
5. Mahesh CB, Ramakant BK, Jagadeesh VS. The prevalence of inducible and constitutive clindamycin resistance among the nasal isolates of *Staphylococci*. J Clin Diagn Res. 2013; 7:1620-2.
6. Drinkovic D, Fuller ER, Shore KP, Holland DJ, Ellis-Pegler R. Clindamycin treatment of *Staphylococcus aureus* expressing inducible clindamycin resistance. J Antimicrob Chemother. 2001; 48: 315-6.

7. Fokas S, Fokas S, Tsironi M, Kalkani M, Dionysopouloy M. Prevalence of inducible clindamycin resistance in macrolide-resistant *Staphylococcus* spp. Clin Microbiol Infect. 2005; 11: 337-40.
8. Kumar S, Bandyopadhyay M, Bhattacharya K, et al. Inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus* isolates from a tertiary care hospital in eastern India. Ann Trop Med Public Health. 2012; 5: 468-70.
9. Shouval DS, Samra Z, Shalit I, et al. Inducible clindamycin resistance among methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* infections in pediatric patients. Isr Med Assoc J. 2011; 13: 605- 8.
10. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement. M100-S22. Wayne, PA: CLSI; 2012.
11. Yilmaz G, Aydin K, Iskender S, Caylan R, Koksall I. Detection and prevalence of inducible clindamycin resistance in staphylococci. J Med Microbiol. 2007; 56: 342-5.
12. Amorim DMR, Person OC, Amaral PJ, Tanaka II. Resistência induzível à clindamicina entre isolados clínicos de *Staphylococcus aureus*. O Mundo da Saúde. 2009; 33: 401-5.
13. Coutinho VL, Paiva RM, Reiter KC, de-Paris F, Barth AL, Machado AB. Distribution of *erm* genes and low prevalence of inducible resistance to clindamycin among *staphylococci* isolates. Braz J Infect Dis. 2010; 14: 564- 8.

14. Roberts MC, Sutcliffe J, Courvalin P, Jensen LB, Rood J, Seppala H. Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; 43: 2823-30.
15. Seifi N, Kahani N, Askari E, Mahdipour S, Naderi NM. Inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* isolates recovered from Mashhad, Iran. *Iran J Microbiol.* 2012; 4: 82-6.
16. Perez LR, d'Azevedo PA. Evaluation of the accuracy of various phenotypic tests to detect oxacilin resistance in coagulase-negative staphylococci. *Braz J Infect Dis.* 2008; 12: 210-2.
17. Hu Y, Zhang Q, Meitzler JC. Rapid and sensitive detection of *Escherichia coli* O157:H7 in bovine faeces by a multiplex PCR. *J Appl Microbiol.* 1999; 87: 867–76.
18. Lina G, Quaglia A, Reverdy ME, Leclercq R, Vandenesch F, Etienne J. Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins among staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; 43: 1062-6.
19. França CA, Peixoto RM, Cavalcante MB, et al. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus* spp. from small ruminant mastitis in Brazil. *Pesq Vet Bras.* 2012; 32: 747-53.
20. Juyal D, Shamanth AS, Pal S, Sharma MK, Prakash R, Sharma N. 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.* 2013; 7: 61-5.

21. Zorgani A, Shamerf O, Tawil K, El-Turki E, Ghenghesh K. Inducible clindamycin resistance among staphylococci isolated from burn patients. *Libyan J Med.* 2009; 4: 104-6.
22. Merino-Díaz L, Cantos de la Casa A, Torres-Sánchez MJ, Aznar-Martín J. Detección de resistência inducible a clindamicina em aislados cutâneos de *Staphylococcus* spp. por métodos fenotípicos y genotípicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2007; 25: 77-81.
23. Zelazny AM, Ferraro MJ, Glennen A. Selection of strains for quality assessment of the disk induction method for detection of inducible clindamycin resistance in staphylococci: a CLSI collaborative study. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 2613-5.
24. Schreckenberger PC, Ilendo E, Ristow KL. Incidence of constitutive and inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci in a community and a tertiary care hospital. *J Clin Microbiol.* 2004; 42: 2777-9.
25. Tekin A, Dal T, Deveci O, Tekin R, Atmaca S, Dayan S. Assessment of methicillin and clindamycin resistance patterns in *Staphylococcus aureus* isolated from a tertiary hospital in Turkey. *Infez Med.* 2013; 21: 111-6.
26. Shrestha B, Pokhrel BM, Mohapatra TM. Phenotypic characterization of nosocomial isolates of *Staphylococcus aureus* with reference to MRSA. *J Infect Dev Ctries.* 2009; 3: 554-60.
27. 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. *Med Sci Monit.* 2011; 17: 48-53.

28. Schmitz FJ, Sadurski R, Kray A, et al. Prevalence of macrolide-resistance genes in *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecium* isolates from 24 european university hospitals. J Antimicrob Chemother. 2000; 45: 891-4.

29. Jung YH, Kim KW, Lee KM, et al. Prevalence and characterization of macrolide-lincomycin-streptogramin B-resistant *Staphylococcus aureus* in Korean hospitals. J Antimicrob Chemother. 2008; 61: 458-60.

30. Spiliopoulou I, Petinaki E, Papandreou P, Dimitracopoulos G. *erm(C)* is the predominant genetic determinant for the expression of resistance to macrolides among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates in Greece. J Antimicrob Chemother. 2004; 53: 814-7.

31. Chavez-Bueno S, Bozdogan B, Katz K, et al. Inducible clindamycin resistance and molecular epidemiologic trends of pediatric community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Dallas, Texas. Antimicrob Agents Chemother. 2005; 49: 2283-8.

APÊNDICE B – Versão do artigo em inglês

Phenotypic and molecular characterization of resistance to macrolides, lincosamides and type B streptogramins of clinical isolates of *Staphylococcus* spp.

Jussyêgles Niedja da Paz Pereira¹; Marcelle Aquino Rabelo¹; Lílian Rodrigues Alves¹; Jailton Lobo da Costa Lima²; Ana Catarina de Souza Lopes¹; Maria Amélia Vieira Maciel.¹

¹Tropical Medicine Department, Federal University of Pernambuco, Pernambuco, PE, Brasil.

²Institute of Biological Sciences, University of Pernambuco, Pernambuco, PE, Brasil.

Address for correspondence:

Jussyêgles Niedja da Paz Pereira

Department of Tropical Medicine/Federal University of Pernambuco

Av. Prof. Moraes Rego, nº 1235, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco-Brasil

CEP: 50670-901

Phone: (81) 2126-8526

E-mail: ju-biomed@hotmail.com

Abstract

Introduction: There is a mechanism of resistance to macrolides in *Staphylococcus* spp. which also affects lincosamides and type B streptogramins characterizing called MLSB resistance, whose expression can be constitutive (cMLSB) or inducible (iMLSB) and is encoded mainly by *ermA* and *ermC* genes. The cMLS_B resistance is easily detected by susceptibility testing

used in laboratorial routine, but the iMLS_B resistance is not. Therapy with clindamycin in cases of infection by isolates with resistance iMLS_B may fail. **Objective:** characterize the phenotypic profile (occurrence of cMLS_B and iMLS_B phenotypes) and molecular (occurrence of *ermA* and *ermC* genes) of MLS_B resistance of clinical isolates of susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and CNS (coagulase-negative *Staphylococcus*) of patients from the Clinical Hospital of Federal University of Pernambuco (HC-UFPE), during the year 2012. **Methodology:** the antimicrobial susceptibility of 103 isolates was determined by disk diffusion technique on Mueller-Hinton agar. Posteriorly, oxacillin *screening* was performed. The iMLS_B phenotype was detected by D test. Were subjected to polymerase chain reaction (PCR), 13 isolates with cMLS_B and iMLS_B phenotypes to detect *ermA* and *ermC* genes. **Results:** cMLS_B and iMLS_B phenotypes were identified respectively in 39 (37,9%) and five (4,9%) isolates. The iMLS_B phenotype was only observed in four (10,8%) of methicillin-susceptible *S. aureus* and one (4,5%) of methicillin-resistant *S. aureus*. Of the 13 isolates subjected to PCR, six (46,2%) showed one *erm* gene. The same frequency three (23,1%) of *ermA* and *ermC* genes among the isolates was observed. **Conclusion:** the *ermA* and *ermC* genes were present among some of the isolates of *Staphylococcus* spp. of the hospital studied and despite the phenotype iMLS_B have been less frequent than cMLS_B, it is important to perform the D test to detect it and thus guide treatment management.

Keywords: *Staphylococcus*; methicillin; clindamycin; erythromycin; genes.

Introduction

The increasing of prevalence of resistance to methicillin in *Staphylococcus* spp. is a growing problem. This has led to new interests relating to the use of macrolides, lincosamides and type B streptogramins antibiotics for the treatment of staphylococcal infections, with the clindamycin, a lincosamide, representing a common choice for some these infections,

particularly infections of skin and soft tissue and an alternative in case of intolerance to penicillin or resistance to methicillin.¹⁻³ In *Staphylococcus* spp., one of the mechanisms of resistance to macrolides consists in modifying the ribosomal target, reaching macrolides, lincosamides and type B streptogramins, characterizing the so-called MLS_B resistance, whose expression can be constitutive (cMLS_B) or inducible (iMLS_B) and is encoded by genes *ermA* (erythromycin ribosome methylase) and *ermC*, which are the main determinants in staphylococci.^{2,4,5}

Knowing the type of MLS_B resistance is important to establish the therapy, since *Staphylococcus* spp. with constitutive resistance present *in vitro* resistance to all macrolides, lincosamides and type B streptogramins and *in vivo*, the therapy with clindamycin in cases of infection by *Staphylococcus* spp. with inducible resistance can select constitutive *erm* mutants, resulting in therapeutic failure.^{3,4,6,7} It is worth mentioning that the cMLS_B resistance is easily detected by susceptibility testing used in laboratory routine, while iMLS_B resistance is not, because by these methods, the isolates of *Staphylococcus* spp. with inducible resistance appear *in vitro* resistant to erythromycin and sensitive to clindamycin.^{5,6,8,9}

To detect inducible resistance to clindamycin in *Staphylococcus* spp., one of the tests set by the CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) is the double-disk diffusion (D test) and when the isolates exhibit this type of resistance, the CLSI recommends cite them as resistant to clindamycin.¹⁰ Then, the data on antimicrobial susceptibility are important to conduct front to infections, but results of false susceptibility can be obtained if the isolates are not subjected to tests that detect inducible resistance to clindamycin.¹¹

Studies carried out in two Brazilian states with clinical isolates of *Staphylococcus* spp. reported the cMLS_B phenotype as the most frequent.^{12,13} Coutinho et al.¹³ also evaluated the occurrence of *erm* genes among the isolates analyzed. However the frequency of cMLS_B and

iMLS_B resistance varies between different hospitals and there are other resistance mechanisms that confer resistance to only one or two classes of MLS_B complex.^{14,15}

The aim of this study was to characterize the phenotypic profile (occurrence of cMLS_B and iMLS_B phenotypes) and molecular (occurrence of *ermA* and *ermC* genes) of MLS_B resistance of clinical isolates of susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and CNS (coagulase-negative *Staphylococcus*) of patients from the Clinical Hospital of Federal University of Pernambuco (HC-UFPE), in order to obtain local data relating to the resistance that may be helpful in guiding therapeutic management.

Materials and methods

Clinical isolates

Clinical isolates were derived from different samples of patients infected with *S. aureus* or SCN from HC-UFPE during the year 2012 and were stored in glycerol (25%) at -20°C. To check the purity of the colonies, were inoculated in Brain Heart Infusion broth (BHI) and after incubation, were plated on blood agar.

Antimicrobial susceptibility

The antibiogram was performed by disk diffusion technique on Mueller-Hinton agar, according to the standards established by CLSI for *Staphylococcus*, using the following antimicrobials: clindamycin 2 µg, erythromycin 15 µg, cefoxitin 30 µg and oxacillin 1 µg. The reading of inhibition zone formed was effected by the pachymeter. Results were expressed in millimeters and interpreted in accordance with the standards established by CLSI.¹⁰

Oxacillin screening

The isolates that presented resistance to the oxacillin and/or cefoxitin, were submitted to oxacillin screening. Direct suspension of colonies was performed, from sheep blood agar 5%, in order to obtain a turbidity equivalent to a standard solution 0,5 of McFarland scale. A loop of platinum 1µL was dipped in this suspension and then the inoculum was done in an area with a diameter of 10 to 15mm on plates containing Mueller-Hinton agar with NaCl (4% v/v; 0,68 mol/L) added of 6 µg/mL of oxacillin. Then these plates were incubated at 35°C for 24 hours and after reading the results, were considered as: > 1 colony = resistant.¹⁰ For quality control, were used the standard strains for MRSA and MSSA: *S. aureus* ATCC 29213-Susceptible and *S. aureus* ATCC 33591-Resistant.¹⁶

D test

Isolates of *S. aureus* and SCN that in the antibiogram showed resistance to erythromycin and susceptibility or intermediate resistance to clindamycin were selected. For the execution of this test a disk of 2 µg of clindamycin was placed at a distance of 15 mm to 26 mm from the edge of a disc of 15 µg of erythromycin in a plate containing Mueller-Hinton agar sown in the same way as it was in the antibiogram. After incubation at 35°C for 16-18 hours, isolates that showed no flattening of the zone of inhibition around the clindamycin disk were reported as susceptible to clindamycin (negative D test) and isolates that showed flattening of the zone of inhibition around the clindamycin disk adjacent to erythromycin disk ("D" zone) indicated inducible clindamycin resistance (positive D test).¹⁰

Extraction of total DNA

For research *ermA* and *ermC* genes, rapid extraction of total DNA of a group of isolates was carried out randomly selected among isolates exhibiting the cMLS_B and iMLS_B

phenotypes, by modified technique of thermal lysis directly from the colony.¹⁷ A colony of each isolate sown on nutrient agar was inoculated into 5ml of BHI and incubated at 37°C for 24 hours. After incubation, 1 mL of bacterial culture was centrifuged at 15000 rpm for 5 minutes. Then the supernatant was discarded, the pellet was resuspended in 200 µL sterile milli Q water and the bacterial suspension was heated at 100°C for 10 minutes in the thermocycler. After heating, this suspension was centrifuged at 15000 rpm for 5 minutes. Then 100 mL of the supernatant were removed, transferred to eppendorf and frozen at -20° C until the moment of use. Three samples of extracted DNA were quantified, by spectrophotometry. From the values found, a average was calculated corresponding to the quantity of extracted DNA, which was used for all samples. Posteriorly the extracted DNA from each sample was diluted, in order to obtain a final concentration of 40 ng/µL.

Detection of *ermA* and *ermC* genes by the technique of polymerase chain reaction (PCR)

For realization of PCR, primers described by Lina et al.¹⁸ for the *ermA* gene: F (5'-GTTCAAGAACAATCAATACAGAG-3') and R (5'-GGATCAGGAAAAGGACATTTTAC-3') and for the *ermC* gene: F (5'-GCTAATATTGTTTAAATCGTCAATTCC-3') and R (5'-GGATCAGGAAAAGGACATTTTAC-3') were used. For the detection of *ermA* gene, each amplification reaction was prepared in a final volume of 25 µL for each tube and includes: 1µL (40 ng) of total DNA, 1µL (20 pmol) of each primer, 0,6 µL of deoxyribonucleotide triphosphate (dNTP) (8 mM), 5,0 µL of buffer (5x), 1,5µL of MgCl₂ (25 mM), 0,4 µL of *Taq* DNA polymerase (5U) and 14,5 µL of sterile milli Q water. For the detection of *ermC* gene, each amplification reaction was prepared in the same manner as the previous, except in relation to the quantity of *Taq* DNA polymerase (5U) and sterile milli Q water, that in this reaction was 0,3 µL and 14,6 µL, respectively. Amplification reactions were performed in the

thermocycler at the following conditions: 30 cycles of 1 minute at 94°C in the denaturing step, 30 seconds at 49°C in the annealing step and 30 seconds at 72°C in the extension step, according to the conditions described by França et al.¹⁹ added of modification performed in the laboratory where this research was conducted. During the realization of PCR, was included a negative control, corresponding to a tube containing all components of the mixture to which template DNA was not added. As regards positive controls, when there was identification of a isolated positive for the gene *ermA* and a isolated positive for the gene *ermC*, these came to be used as positive controls of the respective genes. The PCR products were subjected to electrophoresis on 1,5% agarose gel in 0,5x TBE buffer. A marker of molecular weight of 100 bp was used. These products were stained with Blue, visualized on an ultraviolet transilluminator and photodocumented.

Results

59 (57.3%) clinical isolates of *S. aureus* and 44 (42.7%) of SCN were analyzed, totaling 103 isolates. Of these 103 isolates, 37 (35.9%) 22 (21.4%) 14 (13.6%) and 30 (29.1%) were classified respectively as methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA), methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), methicillin-susceptible coagulase-negative *Staphylococcus* (MSCNS) and methicillin-resistant coagulase-negative *Staphylococcus* (MRCNS) (Table 1).

Table 1 - Profile of susceptibility to erythromycin and clindamycin of susceptible and methicillin-resistant *S. aureus* and CNS.

Phenotypes	MSSA n (%)	MRSA n (%)	MSCNS n (%)	MRCNS n (%)	Total n (%)
ERY-S, CLI-S (susceptible)	25 (67.6)	5 (22.7)	4 (28.6)	7 (23.3)	41 (39.8)
ERY-S, CLI-I	1 (2.7)	0 (0)	1 (7.1)	0 (0)	2 (1.9)
ERY-S, CLI-R	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
ERY-I, CLI-S	1 (2.7)	0 (0)	2 (14.3)	0 (0)	3 (2.9)
ERY-I, CLI-I	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
ERY-I, CLI-R	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (3,3)	1 (1)
ERY-R, CLI-R (cMLS _B)	4 (10.8)	15 (68.2)	3 (21.4)	17 (56.7)	39 (37.9)
ERY-R, CLI-S/I, + D Test (iMLS _B)	4 (10.8)	1 (4.5)	0 (0)	0 (0)	5 (4.9)
ERY-R, CLI-S/I, - Test D (MS _B)	2 (5.4)	1 (4.5)	4 (28.6)	5 (16.7)	12 (11.6)
Total	37 (35.9)	22 (21.4)	14 (13.6)	30 (29.1)	103 (100)

Note: ERY: erythromycin; CLI: clindamycin; S: susceptible; I: intermediary; R: resistant; MSSA: methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*; MRSA: methicillin-resistant *S. aureus*; MSCNS: methicillin-susceptible coagulase-negative *Staphylococcus*; MRCNS: methicillin-resistant coagulase-negative *Staphylococcus*; MLS_B: macrolides, lincosamides and type B streptogramins; cMLS_B: phenotype of constitutive MLS_B resistance; iMLS_B: phenotype of inducible MLS_B resistance; MS_B: phenotype of resistance to macrolides and type B streptogramins.

The susceptible phenotype (ERY-S, CLI-S) was detected in 25 (67.6%), five (22.7%), four (28.6%) and seven (23.3%) of MSSA, MRSA, MSCNS and MRCNS, respectively (Table 1). The cMLS_B phenotype (ERY-R, CLI-R) was detected respectively in four (10.8%), 15 (68.2%), three (21.4%) and 17 (56.7%) of MSSA, MRSA, MSCNS and MRCNS. The iMLS_B phenotype (ERY-R, CLI-S, positive D test) (Figure 1) was found only in four (10.8%) of MSSA in one (4.5%) of MRSA. The MS_B phenotype (ERY-R, CLI-S, negative D test) was detected in two (5.4%), one (4.5%), four (28.6%) and five (16.7%) of MSSA, MRSA, MSCNS and MRCNS, respectively (Table 1) (Figures 2, 3, 4 and 5).



Figure 1 - Positive D test, showing the flattening of the zone of inhibition around the clindamycin disk adjacent to erythromycin disk (called “D” zone).

Source: PEREIRA, 2014.

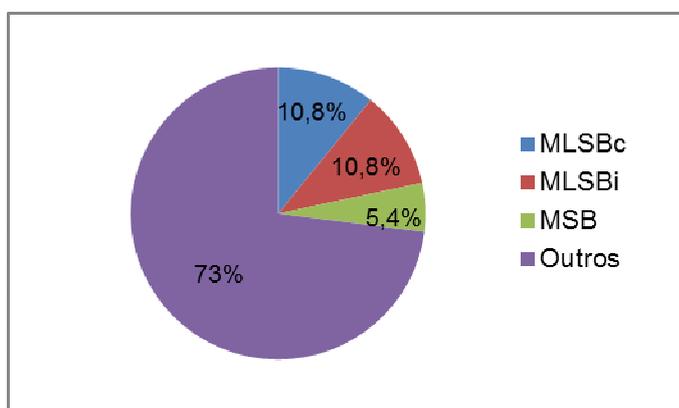


Figure 2 - Phenotypic characterization of MLS_B resistance of MSSA.

Note: MLS_B: macrolides, lincosamides and type B streptogramins; MSSA: methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*; cMLS_B: phenotype of constitutive MLS_B resistance; iMLS_B: phenotype of inducible MLS_B resistance; MS_B: phenotype of resistance to macrolides and type B streptogramins.

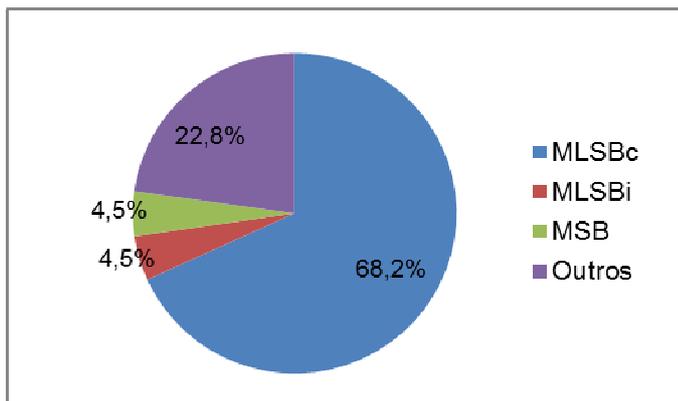


Figure 3 - Phenotypic characterization of MLS_B resistance of MRSA.

Note: MLS_B : macrolides, lincosamides and type B streptogramins; MRSA: methicillin-resistant *S. aureus*; $cMLS_B$: phenotype of constitutive MLS_B resistance; $iMLS_B$: phenotype of inducible MLS_B resistance; MS_B : phenotype of resistance to macrolides and type B streptogramins.

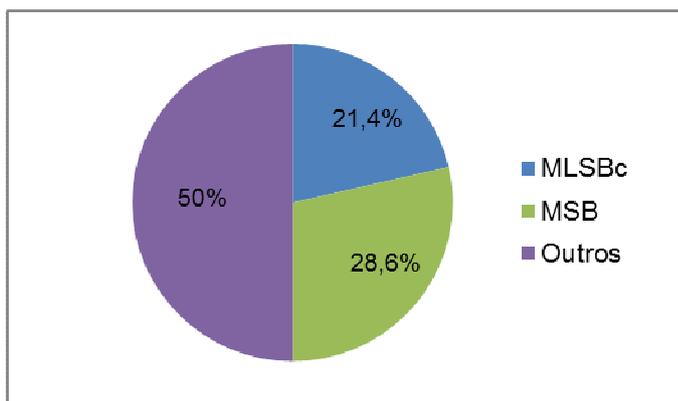


Figure 4 - Phenotypic characterization of MLS_B resistance of MSCNS.

Note: MLS_B : macrolides, lincosamides and type B streptogramins; MSCNS: methicillin-susceptible coagulase-negative *Staphylococcus*; $cMLS_B$: phenotype of constitutive MLS_B resistance; MS_B : phenotype of resistance to macrolides and type B streptogramins.

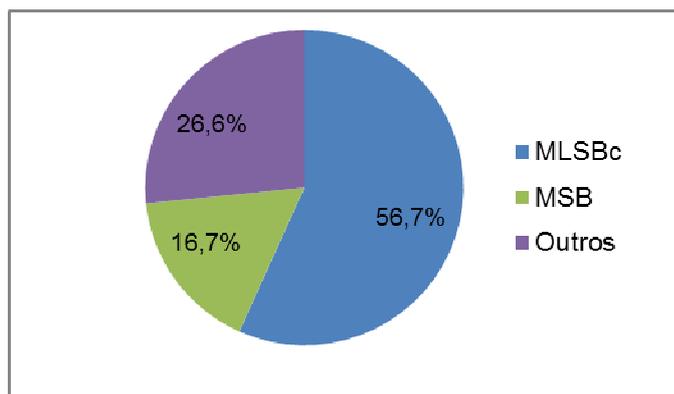


Figure 5 - Phenotypic characterization of MLS_B resistance of MRCNS.

Note: MLS_B : macrolides, lincosamides and type B streptogramins; MRCNS: methicillin-resistant coagulase-negative *Staphylococcus*; $cMLS_B$: phenotype of constitutive MLS_B resistance; MS_B : phenotype of resistance to macrolides and type B streptogramins.

For the identification of *ermA* and *ermC* genes, among the 44 isolates with $cMLS_B$ and $iMLS_B$ phenotypes, 13 were randomly chosen and subjected to PCR. Of these 13 isolates, six (46.2%) presented one *erm* gene. The same frequency was verified three (23.1%) of *ermA* and *ermC* genes among isolates. The association of these genes was not observed in isolates and seven (53.8%) isolates don't present referred genes (Table 2).

Table 2 - Distribution of *ermA* and *ermC* genes among isolates of *Staphylococcus* spp. with MLS_B resistance.

Genes	Isolates (%)
<i>ermA</i>	3 (23.1)
<i>ermC</i>	3 (23.1)
<i>ermA</i> + <i>ermC</i>	0 (0)
None	7 (53.8)
Total	13 (100)

Discussion

In this study it has been found that the frequency of MSSA 25 (67.6%) was higher than that of MRSA five (22.7%) and, that of MSCNS four (28.6%) was less than that of MRCNS seven (23.3%). In a study executed in India, among 313 isolates of *Staphylococcus* spp. analyzed, were found 83 (64.84%) MSSA and 45 (35.15%) MRSA, similarly to the present study and, contrary to the same, were found 124 (67.02%) MSCNS and 61 (32.97%) MRCNS.⁵ A total of 1687 isolates of *Staphylococcus* spp. investigated in Turkey, consisted of 419 (24.8%) MSSA and 464 (27.5%) MRSA, differently this study and, the remainder of the isolates, similarly to this, consisted of 196 (11.6%) MSCNS and 608 (36.1%) MRCNS.¹¹

The susceptible phenotype (ERY-S, CLI-S) 41 (39.8%) in this study, predominated among evaluated isolates. This phenotype was also prevalent in work carried in India, Libya and Turkey which detected the referred phenotype in 192 (51.5%), 87 (54.7%) and 688 (40.8%) isolates, respectively.^{20,11,21}

In the present study, the cMLS_B phenotype 39 (37.9%) was predominant in relation to iMLS_B phenotype five (4.9%) and to phenotype of resistance to macrolides and type B streptogramins (MS_B) 12 (11.6%), in concordance with other studies conducted in Brazil.^{12,13} One of these researches was conducted in São Paulo, and revealed respectively 37 (25.17%) and seven (6.12%) isolates with cMLS_B and iMLS_B phenotypes, whereas MS_B was not detected.¹² The other was accomplished in Rio Grande do Sul, and identified 71 (46.7%), five (3.3%) and five (3.3%) isolates with cMLS_B, iMLS_B and MS_B phenotypes, respectively.¹³

It was observed, in this study that the cMLS_B phenotype prevailed among isolates resistant to methicillin, which is in accordance with studies conducted in other countries^{3,5,11,15,21} and in Brazil.¹²

The MS_B phenotype showed higher frequency 12 (11.6%) than the iMLS_B five (4.9%), in the present study. Diverging from this, the work done by Kumar et al.,⁸ in India detected

the same frequency 33 (16.9%) of MS_B and iMLS_B phenotypes among isolates of *S. aureus* analyzed. Merino-Díaz et al.,²² in Spain identified the *msrA* gene in all isolates of *Staphylococcus* spp. with MS_B phenotype. In *Staphylococcus* spp. this gene is responsible for efflux mechanism which confers resistance to macrolides and type B streptogramins but not to clindamycin.^{5,23}

Only *S. aureus* showed the iMLS_B phenotype and the frequency of the same was higher among MSSA four (10.8%) than among MRSA one (4.5%), in this study. A research carried out in two hospitals of Chicago detected in one of them, the iMLS_B phenotype in 59 (20%) isolates among MSSA and in 14 (7%) isolates among MRSA, in another hospital the iMLS_B phenotype was identified in 94 (19%) and in 30 (12%) isolates among MSSA and MRSA, respectively.²⁴ In a study performed in Turkey, eight (5.8%) isolates among MSSA and two (1.7%) isolates among MRSA presented the iMLS_B phenotype.²⁵ At the work developed in São Paulo, the iMLS_B phenotype was observed in seven (6.73%) isolates among MSSA and in two (4.65%) among MRSA.¹² These data generated by the aforementioned studies are similar to the present study. However, there are other researches conducted internationally in which the iMLS_B phenotype was prevalent among MRSA.^{3,8,15,26}

Therefore relevant antimicrobial susceptibility data are significant to the establishment of appropriate therapy, hence the realization of D test is important.^{20,24} Report an isolate of *Staphylococcus* spp. as susceptible to clindamycin without checking whether the same has inducible resistance, may result in the establishment of inadequate therapy with clindamycin. On the other hand, a negative result for inducible resistance to clindamycin, confirms the susceptibility to this antimicrobial, providing a very good therapeutic option.^{3,8}

In the present study, each of *ermA* and *ermC* genes was detected in three (23.1%) isolates with phenotypes of MLS_B resistance analyzed. In some studies, contrary to this, the *ermA* gene was identified with higher frequency than the *ermC* gene, as in a performed in

Iran, in which *ermA* and *ermC* genes were found in 76 (60.3%) and 69 (54.8%) isolates of *S. aureus*, respectively.²⁷ Schmitz et al.,²⁸ when analyzing *S. aureus* isolates from 24 European university hospitals detected the gene *ermA* in 571 (67%) isolates and the *ermC* in 192 (23%). Jung et al.,²⁹ in Korea identified among 280 isolates of *S. aureus*, the *ermA* gene in 250 isolates and the *ermC* in 14.

In other studies, also discordant of this, the *ermC* gene predominated at relation to *ermA* gene, as in work developed in Spain, in which the *ermC* gene was more frequently detected, in isolates of *S. aureus* and SCN with constitutive and inducible phenotypes.²² Spiliopoulou et al.,³⁰ in Greece identified *ermA* and *ermC* genes in 22% and 70% of isolates of *S. aureus*, respectively.

There are reports of the association of referred genes in isolates of *Staphylococcus* spp.,²⁷⁻²⁹ but in the present study, this was not observed.

In this study, seven (53.8%) isolates of the analyzed group, which did not present the *ermA* or *ermC* genes, may contain the *ermB* gene. Isolates that presented *ermA* or *ermC* genes may also contain it, since the association of these genes is possible. The *ermB* gene was not investigated because it is generally detected in isolates of *Staphylococcus* spp. of animal origin^{13,22,28} and is spread mainly among streptococci and enterococci.⁴ Coutinho et al.,¹³ in Rio Grande do Sul, reported a low frequency of *ermB* gene. They verified that among 152 isolates of *Staphylococcus* spp. analyzed, 77 had one or more *erm* gene, *ermA*, *ermB* and *ermC* genes were found respectively at 49, 29 and three isolates and, the combination of these genes was observed in four isolates,¹³ discordant data from this study. However, in a work developed in Texas with isolates of *S. aureus* of pediatric origin, among 67 isolates evaluated, the *ermB* gene was identified in 31 of these and, *ermA* and *ermC* genes were detected at 12 and 24 isolates, respectively.³¹

So it was possible to verify the variation of frequencies of phenotypes of MLS_B resistance and of *erm* genes among hospitals and geographic regions, already reported by other authors.^{13,15,21,27} Thus, the importance of determination of these frequencies at a specific location is stressed.^{13,21}

The good correlation between phenotypic and genotypic methods allows to infer o the mechanism of resistance to erythromycin and clindamycin, establish the most appropriate antimicrobial treatment, as well as appreciate the epidemiological differences in the distribution.²²

Conclusion

Therefore *ermA* and *ermC* genes were detected and presented the same frequency among isolates of *Staphylococcus* spp. with cMLS_B and iMLS_B phenotypes selected. Despite the iMLS_B phenotype to have been less frequent than the cMLS_B and MS_B, is important the performance of D test to identify it and thereby guide therapeutic conducts. Since phenotypic and molecular data about a determined mechanism of antimicrobial resistance vary among hospitals and geographic regions, obtaining local data concerning the same is useful, since it can be a help to highlight the importance of implementing procedures aimed at controlling the spread of this mechanism, in hospital where the study was conducted.

References

1. Daurel C, Huet C, Dhalluin A, Bes M, Etienne J, Leclercq R. Differences in potential for selection of clindamycin-resistant mutants between inducible *erm(A)* and *erm(C)* *Staphylococcus aureus* genes. J Clin Microbiol. 2007; 46: 546-50.
2. Fiebelkorn KR, Crawford SA, McElmeel ML, Jorgensen JH. Practical disk diffusion method for detection of inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. J Clin Microbiol. 2003; 41: 4740-4.
3. Prabhu, K; Rao, S; Rao V. Inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from clinical samples. J Lab Physicians. 2011; 3: 25-7.
4. Leclercq R. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. Clin Infect Dis. 2002; 34: 482- 92.
5. Mahesh CB, Ramakant BK, Jagadeesh VS. The prevalence of inducible and constitutive clindamycin resistance among the nasal isolates of *Staphylococci*. J Clin Diagn Res. 2013; 7:1620-2.
6. Drinkovic D, Fuller ER, Shore KP, Holland DJ, Ellis-Pegler R. Clindamycin treatment of *Staphylococcus aureus* expressing inducible clindamycin resistance. J Antimicrob Chemother. 2001; 48: 315-6.

7. Fokas S, Fokas S, Tsironi M, Kalkani M, Dionysopouloy M. Prevalence of inducible clindamycin resistance in macrolide-resistant *Staphylococcus* spp. Clin Microbiol Infect. 2005; 11: 337-40.
8. Kumar S, Bandyopadhyay M, Bhattacharya K, et al. Inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus* isolates from a tertiary care hospital in eastern India. Ann Trop Med Public Health. 2012; 5: 468-70.
9. Shouval DS, Samra Z, Shalit I, et al. Inducible clindamycin resistance among methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* infections in pediatric patients. Isr Med Assoc J. 2011; 13: 605- 8.
10. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement. M100-S22. Wayne, PA: CLSI; 2012.
11. Yilmaz G, Aydin K, Iskender S, Caylan R, Koksall I. Detection and prevalence of inducible clindamycin resistance in staphylococci. J Med Microbiol. 2007; 56: 342-5.
12. Amorim DMR, Person OC, Amaral PJ, Tanaka II. Resistência induzível à clindamicina entre isolados clínicos de *Staphylococcus aureus*. O Mundo da Saúde. 2009; 33: 401-5.
13. Coutinho VL, Paiva RM, Reiter KC, de-Paris F, Barth AL, Machado AB. Distribution of *erm* genes and low prevalence of inducible resistance to clindamycin among *staphylococci* isolates. Braz J Infect Dis. 2010; 14: 564- 8.

14. Roberts MC, Sutcliffe J, Courvalin P, Jensen LB, Rood J, Seppala H. Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; 43: 2823-30.
15. Seifi N, Kahani N, Askari E, Mahdipour S, Naderi NM. Inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* isolates recovered from Mashhad, Iran. *Iran J Microbiol.* 2012; 4: 82-6.
16. Perez LR, d'Azevedo PA. Evaluation of the accuracy of various phenotypic tests to detect oxacilin resistance in coagulase-negative staphylococci. *Braz J Infect Dis.* 2008; 12: 210-2.
17. Hu Y, Zhang Q, Meitzler JC. Rapid and sensitive detection of *Escherichia coli* O157:H7 in bovine faeces by a multiplex PCR. *J Appl Microbiol.* 1999; 87: 867–76.
18. Lina G, Quaglia A, Reverdy ME, Leclercq R, Vandenesch F, Etienne J. Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins among staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; 43: 1062-6.
19. França CA, Peixoto RM, Cavalcante MB, et al. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus* spp. from small ruminant mastitis in Brazil. *Pesq Vet Bras.* 2012; 32: 747-53.
20. Juyal D, Shamanth AS, Pal S, Sharma MK, Prakash R, Sharma N. 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.* 2013; 7: 61-5.

21. Zorgani A, Shamerf O, Tawil K, El-Turki E, Ghenghesh K. Inducible clindamycin resistance among staphylococci isolated from burn patients. *Libyan J Med*. 2009; 4: 104-6.
22. Merino-Díaz L, Cantos de la Casa A, Torres-Sánchez MJ, Aznar-Martín J. Detección de resistência inducible a clindamicina em aislados cutâneos de *Staphylococcus* spp. por métodos fenotípicos y genotípicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2007; 25: 77-81.
23. Zelazny AM, Ferraro MJ, Glennen A. Selection of strains for quality assessment of the disk induction method for detection of inducible clindamycin resistance in staphylococci: a CLSI collaborative study. *J Clin Microbiol*. 2005; 43: 2613-5.
24. Schreckenberger PC, Ilendo E, Ristow KL. Incidence of constitutive and inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci in a community and a tertiary care hospital. *J Clin Microbiol*. 2004; 42: 2777-9.
25. Tekin A, Dal T, Deveci O, Tekin R, Atmaca S, Dayan S. Assessment of methicillin and clindamycin resistance patterns in *Staphylococcus aureus* isolated from a tertiary hospital in Turkey. *Infez Med*. 2013; 21: 111-6.
26. Shrestha B, Pokhrel BM, Mohapatra TM. Phenotypic characterization of nosocomial isolates of *Staphylococcus aureus* with reference to MRSA. *J Infect Dev Ctries*. 2009; 3: 554-60.
27. 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. *Med Sci Monit*. 2011; 17: 48-53.

28. Schmitz FJ, Sadurski R, Kray A, et al. Prevalence of macrolide-resistance genes in *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecium* isolates from 24 european university hospitals. J Antimicrob Chemother. 2000; 45: 891-4.

29. Jung YH, Kim KW, Lee KM, et al. Prevalence and characterization of macrolide-lincomycin-streptogramin B-resistant *Staphylococcus aureus* in Korean hospitals. J Antimicrob Chemother. 2008; 61: 458-60.

30. Spiliopoulou I, Petinaki E, Papandreou P, Dimitracopoulos G. *erm(C)* is the predominant genetic determinant for the expression of resistance to macrolides among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates in Greece. J Antimicrob Chemother. 2004; 53: 814-7.

31. Chavez-Bueno S, Bozdogan B, Katz K, et al. Inducible clindamycin resistance and molecular epidemiologic trends of pediatric community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Dallas, Texas. Antimicrob Agents Chemother. 2005; 49: 2283-8.

ANEXOS

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética



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. Multiresistentes de amostras de pacientes e profissionais de saúde do Hospital das Clínicas de Pernambuco.

Pesquisador Responsável: Marcelle Aquino Rabelo

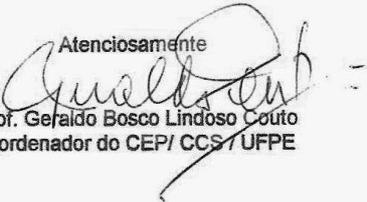
Senhor (a) Pesquisador (a):

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 epígrafe, 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. Gezaído Bosco Lindoso Couto
Coordenador do CEP/CCS/UFPE

A
Mestranda Marcelle Aquino Rabelo
Departamento de Medicina Tropical - CCS/UFPE

ANEXO B - Instruções aos Autores do The Brazilian Journal of Infectious Diseases

Instructions to authors

The Brazilian Journal of Infectious Diseases

SUBMISSION INSTRUCTIONS

The authors should submit their articles via website (<http://ees.elsevier.com/bjid>). All papers must be submitted in English. Instructions for submission can be found on www.bjid.org.br/instructions.

JOURNAL SECTIONS

Manuscripts may be submitted within designated categories of communication, including:

- Original basic or clinical investigation (original papers);
- Brief reports of new methods or observations (brief communications);
- State-of-the-art presentations or reviews (review or mini review papers);
- Case presentation and discussion (case reports);
- Clinical infectious diseases images;
- Letters to the editor concerning previous publications;
- Editor's corner, containing ideas, hypotheses and comments (Editorial).

ORIGINAL ARTICLES

It is the most important section of the Journal. Original articles present new data about researches, issues and matters in the field of infectious diseases. These articles should conform strictly to the rules of publication, containing the following sections: abstract, objective or hypothesis, experimental design and methods used (statistical data), essential features of any interventions, main outcome measures, main results of the study, discussion and conclusion. An Original Paper should contain:

- An abstract of no more than 300 words;
- No more than 7 keywords;
- The text should be divided into separate sections (Introduction, Material and Methods, Results, Discussion, References);
- No more than 50 references;
- Number of authors should not exceed 10;
- Authors should state in the cover letter that the manuscript is intended to be an original paper.

BRIEF COMMUNICATIONS

A brief communication is focused in a single subject, which should be concise and a new point of view presentation of the subject. The scope of this section is intended to be wide and methods, results and discussion should be in the same text. A brief communication should contain:

- An abstract of no more than 200 words;
- No more than 4 keywords;
- Text should not exceed 12 double-spaced typed pages of 23 lines each;

- A maximum of 2 figures or tables (or one of each);
- No more than 20 references;
- The text should not be divided into separate sections;
- Authors should state in the cover letter that the manuscript is intended to be a brief communication;
- Number of authors should not exceed 5.

REVIEW ARTICLE

This section is for an updated presentation on a specific topic. This section should contain critical analysis and a new point of view of a relevant area and not a chronological description of the literature. This section aims to raise discussion among readers about controversial issues and the development of concepts in Infectious Diseases. A review article has to bring the new point of view of the focus of the subject. A minireview is focused on a restricted part of a subject. A minireview and review article should contain:

- An abstract of no more than 300 words;
- No more than 7 keywords;
- No more than 80 references;
- The text may be divided into sections with appropriate titles and subtitles;
- Number of authors should not exceed 5;
- Authors should state in the cover letter that the manuscript is intended to be a review or mini review article.

CASE REPORTS

Reports of clinical cases must contain a brief introduction about the nature of the case diagnosis, whose focus is the importance of the subject. The case has to be described with data and reports of examinations, treatment and prognosis of the case, discussion about the importance of the findings and presentation of the case in relation to literature. A case report should have a special interest to the clinical research community or it has to be a rare case; or to present a new diagnostic method; or new or modified treatment. A case report article should contain:

- An abstract of no more than 150 words;
- No more than 4 keywords;
- No more than 20 references;
- The text may be divided into sections: brief introduction with a review of literature, case reports, and conclusion;
- Number of authors should not exceed 5;
- Authors should state in the cover letter that the manuscript is intended to be a case report article.

CLINICAL INFECTIOUS DISEASES IMAGES

For submission to Clinical Infectious Diseases Images, which is not intended as a vehicle for case reports, all text should contain:

Instructions to authors

- A minimum of references (no more than 4);
- No abstract;
- The text should be uniform and contain no more than 300 words;
- Number of authors should not exceed 5.

LETTERS TO THE EDITOR

Letters may be written in response to previous content published in The Brazilian Journal of Infectious Diseases (BJID) or on any topic of general interest or concern. In the first case, the letter must emphasize the main message of the author of the article, focusing the contribution of that scientific article in the medical practice, drawing attention to the reference and impact it had on the community. The Letter to the Editor should contain:

- Title and the text with no more than 23 line pages;
- No more than 5 references;
- Number of authors should not exceed 5.

MANUSCRIPT FORMATS**COVER LETTER**

For all manuscripts, authors must indicate in a cover letter:

- Title of article;
- Name(s) of all author(s);
- Address, telephone number, fax, and e-mail of the corresponding author;
- A statement signed by the corresponding author confirming that the manuscript content represents the views of the coauthors, that neither the corresponding author nor the coauthors have submitted duplicate or overlapping manuscripts elsewhere, and that the items indicated as personal communications in the text are supported by the referenced person;
- The registration number of all randomized controlled trials and clinical trials, in accordance with the International Committee of Medical Journal Editors;
- In the same case, the corresponding author has to send a statement indicating that written informed consent was obtained from all participants;
- All original articles should indicate the number of the Ethics Committee approval. If the article does not require an approval from the Ethics Committee, the author should write it separately in the article;
- Animal experimentation should be carried out according to institutional guidelines for experimental use of animals;
- The authors should obtain written permission to reproduce figures and tables from other sources;
- If the study was supported by any institution, it has to be indicated in the cover letter.

The cover letter should be in one double-spaced electronic document, title (no more than eight words in the title); no more than five (or ten, when an original article) authors may be listed, including name, institution, address, email address, telephone and fax number of each author; the text should contain no more than 300 words.

Supplements to the BJID include articles under a unifying theme, such as those summarizing presentations of symposia or focusing on a specific pathogenic process or antimicrobial agent. These will be added to the regular bimonthly publication as appropriate, and will be peer reviewed in the same manner as submitted manuscripts.

For each manuscript a registration number will be assigned and the author will be notified that the manuscript is complete and adequate to start the review process.

FORMAT OF ARTICLES AND LETTERS

Contributions should be double-spaced and written in English. All manuscripts are to be typed double-spaced, including text, tables, references and legends; the character should be Time New Roman for all text, including figures, graphics and tables, and the tool "insert > symbol" for Greek character; size 12 should be used in all manuscript. The manuscripts have to be saved in Word document and the figures should be saved in CorelDraw, JPG or TIF document with high resolution - minimum of 300 dpi.

Use of digital resources

Manuscript, Title Page, Cover Letter, and Author Agreement files in DOC format (Winword); bars or lines figures in XLS (Excell standard); photos and figures, with minimum resolution of 300 dpi, in JPG format. Please do not attach titles and letterings to illustrations. Please do not insert illustrations on text. Each illustration shall have an individual file. File name shall express illustration type and numbering (Figure 1, Table 2, for example). Illustration titles and letterings duly numbered shall be in separate text file. Copies or reproductions of other publications will be allowed only with the attachment of express authorization of the Editing company or the author of the original article.

Titles and subtitles

- Titles should be in bold;
- Subtitles should be in underscore;
- Titles should not have abbreviations or acronyms;
- Titles should not exceed two printed lines;
- Do not exceed 80 characters (inc. spaces).

Author affiliations

- Complete name of the authors (do not abbreviate);
- Affiliations of all authors;
- Name, mailing addresses, phone and fax number, e-mail, state, city and country of the corresponding author;
- Acknowledgement of research grants and fellowships (agency and grant number).

Keywords

- Consider the manuscript formats to verify the number of keywords;
- Use capital letter for the first word, the other should be in regular form.

Abstract

- The abstract should briefly contain the objective, data, methods, results and discussion of the study or presentation to ensure the reader's understanding of the manuscript;
- Do not use abbreviations in abstract;
- Do not use references in abstract;
- Consider the manuscript formats to verify the number of words.

Introduction

- In the text of Introduction the authors have to reveal the aim of the study, the purpose of the research, and the basic literature about the subject.

Material and methods

- This section should be subdivided by short underscore headings referring to methods used;
- This section cannot contain figures or tables;
- The material and methods used must be carefully described to allow the study repetition and to determine if the results were possible and correct;
- Papers with statistical testing should state the name of the test, the name for each analysis, the comparisons of interest, a justification of that test, the alpha level for all tests, whether the tests were over two-tailed, and the actual p-value for each test;
- Data sets should be summarized with descriptive statistics, which should include then for each data set, a clearly labeled measure of centre (such as the mean or median), and a clearly labeled measure of variability (such as the standard deviation or range).

Results

- The data of the results should be described concisely;
- Tables, graphics and figures have to be inserted in this section;
- The data presented in this section have to be oriented by universal units;
- Tables should be clear enough to the readers do not need the text to understand them;
- Tables should be presented on separate pages, portrait orientation, and upright on the page;
- Tables should present a short one-line title in bold;
- Tables have to be numbered consecutively with Arabic numerals in the text;
- Symbols and abbreviations are defined immediately below the table;
- More information about the table should be below the symbols and abbreviations;
- If the table is from another source, the authors must indicate the source and send the permission to the journal.

Figures/Graphics

- Figure legend should be listed one after the other, as a part of the text document, separate from the figure files, with a short one-line title in bold.
- Figures should be submitted in CDR, TIF, JPG file (300 dpi);
- Figures should be clear enough that the readers do not need the text to understand them;
- Figures should be presented on separate pages, portrait orientation, and upright on the page;
- Figures have to be numbered consecutively with Arabic numerals in the text;
- Symbols and abbreviations are defined immediately below the figure, as well as any other informations about the figures;
- If the figure is from another source, the authors must indicate the source and send the permission to the journal.

Discussion

- The discussion presents the results comparing and evaluating them to literature and the existing knowledge. References to other studies should appear in the Discussion to compare the data obtained in the methods and results of the paper.

Acknowledgements

- Authors can thank anyone who helped them do the work or study.

Financial support

- The authors must indicate in the cover letter if the study was supported by institutions.

Abbreviations and symbols

- All abbreviations have to be explained in the text, figure and table legends when they first appear;
- Include the abbreviation in parenthesis after they first appearance.
- Abbreviate units [(5 mL, not 5 milliliters (mL))];
- Do not abbreviate institutions;
- Abbreviations must follow the format of the National Library of Medicine (USA) as in Index Medicus.

Units

- Follow the use of the The International System of Units (SI) (<http://physics.nist.gov/cuu/Units>).

References

- They should go in the final part of the article, according to the quotation order in the text, in which should appear the Arabic numerals superscripted. Please quote all the authors in works with until six authors; after six authors, quote the first three followed by the expression et al. Reference Manager or Endnote programs are strongly recommended for use adopting the "Vancouver" style.

Examples for reference citation are presented below. Authors should consult NLM's Citing Medicine for additional information on the reference formats.

Article

Turner SW, Young S, Goldblatt J, Landau LI, Le Souéff PN. Childhood asthma and increased airway responsiveness a relationship that begins in infancy. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009;179:98-104.

Chang ML, Yang CW, Chen JC, et al. Disproportional exaggerated arpartate transaminase is a useful prognostic parameter in late leptospirosis. *World J Gastroenterol.* 2005;11:5553-6.

Book chapter

Taylor DM, Personnet J. Epidemiology and natural history of *Helicobacter pylori* infection. In: Blaser MJ, Smith PD, Ravdin J eds. *Infections of the gastrointestinal tract.* New York: Raven Press, 1994.

Book

Polak JM, Van Noordan S. *An introduction to immunochemistry: current techniques and problems.* Oxford, UK: Oxford University Press, 1987.

Abstract

Blatt SP, Butzin CA, Lucey DR, Melcher GP, Hendrix CR. Anergy status and CD4 CD29 memory T-cells predict progression to AIDS (abstract PoB 3480). In: *Program and abstracts: VIII International Conference on AIDS (Amsterdam).* Amsterdam: CONGREX Holland, 1992.

SCOPE AND POLICY

The aim of *BJID* is to be relevant in the broadest sense to all aspects of Infectious Diseases and its fields. The manuscripts submitted to *BJID* should develop new concepts or experimental approaches; they have to describe new principles or improve-

Instructions to authors

ment of an existing method and their results; they have to bring new data about a subject which will be important to physicians; so they could not be a single presentation of known data.

PUBLICATION ETHICS

- All the listed authors have to agree on all contents (authors must approve the article galley proof) and they are responsible for all informations included in the text.
- The corresponding author is responsible for all communications between the Journal and all coauthors, before and after publication.
- The corresponding author has to make a statement confirming that the content of the manuscript represents the views of the coauthors, that neither the corresponding author nor the coauthors have submitted duplicate or overlapping manuscripts elsewhere, and that the items indicated as personal communications in the text are supported by the referenced person.
- Any changes to the author list after submission, such as a change in the order of the authors, or the deletion or addition of authors, need to be approved by every author.
- The editors of BJID may seek advice about submitted papers not only from technical reviewers but also on any aspect of a paper that raises concerns. These may include, for example, ethical issues or issues of data or materials access.
- The authors warrant that the manuscript is original and contains no matter which is defamatory or is otherwise unlawful or which invades individual privacy or infringes any proprietary right or any statutory copyright.

DUPLICATE PUBLICATION

All manuscripts submitted to BJID must be original and not published or submitted for publication elsewhere.

PLAGIARISM AND FABRICATION

If a case of plagiarism occurs in BJID, a determination of misconduct will lead the BJID to exclude the article from the submission process or, if the article was already published, to exclude from the publication, and the authors will be accountable for the plagiarism.

CONFIDENTIALITY

The Journal editors treat the submitted manuscript and all communication with the authors as confidential between themselves and the peer-reviewers. Similarly, authors must treat communication with the Journal as confidential.

PAGE CHARGES

There is no charge to publish in The Brazilian Journal of Infectious Diseases (BJID).

PERMISSIONS

Copyright 2012 by the Brazilian Society of Infectious Diseases and Elsevier Editora Ltda. All rights reserved. Except as authorized in the accompanying statement, no part of the BJID may be reproduced in any form or by any electronic or mechanical means, including information storage and retrieval systems, without the publisher's written permission. Authorization to photocopy items for internal or personal use, or the internal or personal use by specific clients is granted by the Brazilian Society of Infectious Diseases and Elsevier Editora Ltda. for libraries and other users. This authorization does not extend to other kinds of copying such

as copying for general distribution, for advertising or promotional purposes, for creating new collective works, or for resale.

COPYRIGHT

The authors grant and assign the entire copyright to the Brazilian Society of Infectious Diseases and Elsevier Editora Ltda. for its exclusive use. The copyright consists of any and all rights of whatever kind or nature protected by the copyright laws of Brazil and of all foreign countries, in all languages and forms of communication, and the Brazilian Society of Infectious Diseases and Elsevier Editora Ltda. shall be the sole proprietors thereof. The author(s) agree(s) to indemnify and hold the Brazilian Society of Infectious Diseases and Elsevier Editora Ltda. harmless against any claim to the contrary.

PEER REVIEW

BJID is a peer-review Journal, so all papers (except Letters to the Editor) are evaluated by this system. If the paper follows the scope of the Journal, it will be sent to two or three independent reviewers, selected by the editors (two from the editorial board and one any other expertise).

Authors may suggest appropriate consultants for review of the manuscript, but these suggestions may not be followed.

TIMING

The review process will ordinarily require two months.

PEER REVIEW POLICY**General information**

The reviewers will be invited by the editor of BJID to do the comments about an article, in accordance with the specialty of each referee. Questions about a specific manuscript should be directed to the editor who is handling the manuscript.

Online manuscript review

We ask peer-reviewers to submit their reports via our secure online system. The reviewer will receive a username and a login that provide him/her to download the article and in a specific form write their comments.

The review process

All submitted manuscripts are read by the editorial staff. To save time for authors and peer-reviewers, only those papers that seem most likely to meet our editorial criteria are sent for formal review. Those papers judged by the editors to be of insufficient general interest or otherwise inappropriate are rejected promptly without external review (although these decisions may be based on informal advice from specialists in the field).

Manuscripts judged to be of potential interest to our readership are sent for formal review, typically to two or three reviewers, but sometimes more if special advice is needed (for example on statistics or a particular technique). The editors then make a decision based on the reviewers' advice, from among several possibilities:

- Accept, with minor corrections;
- Invite the authors to revise their manuscript to address specific concerns before a final decision is reached;
- Reject, but indicate to the authors that further work might justify a resubmission;
- Reject outright, typically on grounds of specialist interest, lack of novelty, insufficient conceptual advance or major technical and/or interpretational problems.

LEGAL AND ETHICAL CONSIDERATIONS

According to the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals (International Committee of Medical Journal Editors - February 2006).

CONFLICT OF INTEREST

Public trust in the peer review process and the credibility of published articles depend in part on how well conflict of interest is handled during writing, peer review, and editorial decision making. Conflict of interest exists when an author (or the author's institution), reviewer, or editor has financial or personal relationships that inappropriately influence (bias) his or her actions (such relationships are also known as dual commitments, competing interests, or competing loyalties). These relationships vary from those with negligible potential to those with great potential to influence judgment, and not all relationships represent true conflict of interest. The potential for conflict of interest can exist whether or not an individual believes that the relationship affects his or her scientific judgment. Financial relationships (such as employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony) are the most easily identifiable conflicts of interest and the most likely to undermine the credibility of the journal, the authors, and of science itself. However, conflicts can occur for other reasons, such as personal relationships, academic competition, and intellectual passion.

INFORMED CONSENT

Patients have a right to privacy that should not be infringed without informed consent. Identifying information, including patients' names, initials, or hospital numbers, should not be published in written descriptions, photographs, and pedigrees unless the information is essential for scientific purposes and the patient (or parent or guardian) gives written informed consent for publication. Informed consent for this purpose requires that a patient who is identifiable be shown the manuscript to be published. Authors should identify individuals who provide writing assistance and disclose the funding source for this assistance. Identifying details should be omitted if they are not essential.

Complete anonymity is difficult to achieve, however, and informed consent should be obtained if there is any doubt. For example, masking the eye region in photographs of patients is inadequate protection of anonymity. If identifying characteristics are altered to protect anonymity, such as in genetic pedigrees, authors should provide assurance that alterations do not distort scientific meaning and editors should so note. When informed consent has been obtained it should be indicated in the published article.

ETHICAL TREATMENT

When reporting experiments on human subjects, authors should indicate whether the procedures followed were in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human experimentation (institutional and national) and with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 2000. If doubt exists whether the research was conducted in accordance with the Helsinki Declaration, the authors must explain the rationale for their approach, and demonstrate that the institutional review body explicitly approved the doubtful aspects of the study. When reporting experiments on animals, authors should be asked to indicate whether the institutional and national guide for the care and use of laboratory animals was followed.

CLINICAL TRIALS REGISTRY

Clinical trials must be registered according to WHO recommendation at www.who.int/ictcp/en/. The definition of clinical trial include preliminary trials (phase 0): any study with prospective recruiting of subjects to undergo any health-related intervention (drugs, surgical procedures, equipment, behavioral therapies, food regimen, changes in health care) to evaluate the effects on clinical outcomes (any biomedical or health-related parameter, including pharmacokinetics measurements and adverse reactions).

The Journal has the right not to publish trials not complying with these and other legal and ethical standards determined by international guidelines.