



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia
2009

Maria Arménia Almeida Santos **Prevalência e caracterização fenotípica de MRSA num estudo hospitalar**



Maria Arménia Almeida Santos **Prevalência e caracterização fenotípica de MRSA num estudo hospitalar**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de mestre em Microbiologia, realizada sob a orientação científica da Prof. Doutora Sónia Alexandra Leite Velho Mendo Barroso, Prof. Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

o júri

presidente

Prof. Dr. Maria Adelaide Pinho de Almeida

Prof. Auxiliar, do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Prof. Dr Sónia Alexandra Leite Velho Mendo Barroso

Prof. Auxiliar, do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Dr. Anabela de Oliveira Pereira

Investigadora Pós-Doc, CESAM

agradecimentos

Ao Professor Doutor António Correia, pela disponibilidade demonstrada no esclarecimento de algumas questões ocorridas ao longo deste mestrado.

À Professora Doutora Sónia Mendo, minha orientadora, por me ter recebido no seu laboratório e pelo excelente acompanhamento, disponibilidade, incentivo e optimismo demonstrados durante a realização deste trabalho.

À minha Directora e amiga Dra. Isabel Loureiro, que me possibilitou a realização deste estudo contribuindo para o meu crescimento profissional e pessoal.

À minha amiga Emília, pela amizade, paciência e estímulo, decisivos na concretização deste estudo.

Às colegas do Laboratório de Microbiologia Molecular da Universidade de Aveiro, em particular, à Sónia Ferreira, pelo acompanhamento e disponibilidade na demonstração prática, da caracterização genotípica.

Aos meus colegas do hospital, pelo apoio e compreensão demonstrados ao longo da concretização deste projecto de investigação.

À Bio-rad, à Roche, à Sigma e Bioportugal, por gentilmente me terem cedido os reagentes necessários para caracterização molecular, ainda a decorrer.

A todos aqueles que, de alguma forma, tenham contribuído para que este projecto se tornasse realidade.

palavras-chave

Staphylococcus aureus resistentes à metilina (MRSA), resistência aos antibióticos, portadores de MRSA; prevalência, rastreio, infecção nosocomial, Portugal

resumo

Staphylococcus aureus resistentes à metilina (MRSA), é actualmente um importante e grave problema de saúde pública devido à morbidade e mortalidade que lhe estão associados. Outrora associado, apenas a infecções hospitalares, hoje é encontrado e adquirido na comunidade encontrando-se disseminado por todos os continentes.

Este estudo teve como objectivo determinar a prevalência de MRSA no internamento do serviço de medicina do hospital S Miguel, através do rastreio de MRSA por colheita efectuada na orofaringe e fossas nasais.

A prevalência de MRSA, foi de 14.4% no total de rastreios efectuados. Dos rastreios positivos 41 (43.1%) são do sexo feminino e 54 (56.9%) são do sexo masculino. Encontraram-se 7 perfis de resistência aos antibióticos, entre os diversos isolados. No entanto nenhum destes isolados foi resistente à Vancomicina.

keywords

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), antimicrobial resistance, MRSA carriers, prevalence, screening, nosocomial infection, Portugal.

abstract

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), is currently a important and serious public health problem due to morbidity and mortality associated with it. Once associated only hospital infections, is now found and acquired in the community at large and is spread over all continents.

The aim of this study is to determine the prevalence of MRSA in the medicine service of S. Miguel Hospital, through the screening of MRSA collections made in the throat and anterior nares.

The results show a prevalence of 14.4% of the total MRSA screened. Of the 41 screened positive (43.1%) were female and 54 (56.9%) were male. It was found 7 profiles of antibiotic resistance among different isolates, but none was resistant to Vancomycin.

“A ocupação do Planeta Terra pelo Homem conduziu-nos à presunção de que a nossa espécie está no topo máximo da cadeia alimentar, predadora de todas as outras espécies, destruindo rapidamente os seus habitats naturais, e diminuindo a diversidade genética da espécies domesticadas. Carnívoros, que em tempos passados aterrorizaram as populações humanas, foram praticamente exterminados. Os roedores continuam abundantes e causam problemas em alguns supermercados, mas podem ser afastados com cimento e rede de arame. Os nossos excedentes alimentares são debicados por Insectos; mas mesmo no seu auge, os bandos de gafanhotos, são pestes locais, não mundiais. Excluindo a hipótese de geno-suicídio, a supremacia humana enfrenta na verdade apenas um verdadeiro adversário: os microrganismos patogénicos, para os quais o Homem é a presa, e eles os predadores.”

Joshua Lederberg.

ÍNDICE

Índice

Lista de abreviaturas

Lista de figuras

1 - INTRODUÇÃO	1
2 - ESTAFILOCOCOS AUREUS METICILINA - RESISTENTES (MRSA).....	5
2.1 - Epidemiologia do género Staphylococcus.....	5
2.2 - Características morfológicas e culturais.....	5
2.3 - Mecanismos de patogenicidade.....	6
2.4 - Significado clínico	7
2.5 - Meticilina.....	8
2.5.1 - Mecanismo de acção dos antibióticos β -Lactâmicos.....	8
2.5.2 - Mecanismos de resistência	9
3 - OBJECTIVOS.....	11
4 - MATERIAL E MÉTODOS	12
4.1 - Amostra Populacional	12
4.2-Amostra Laboratorial.....	12
4.3 - Processamento das amostras.....	12
4.4 - Caracterização fenotípica	14
4.4.1 - Meios de cultura.....	14
4.4.2 - Testes Serológicos.....	15
4.4.3 -Avaliação da Susceptibilidade aos Antibióticos	16
5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
6 - CONCLUSÃO	31
7 - BIBLIOGRAFIA.....	33
Anexos	43

Lista de abreviaturas

CA-MRSA - *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina adquirido na comunidade

CCI – Comissão de Controlo de Infecção

CDC –Centers for Disease Control and Prevention

CLSI- Clinical and Laboratory Standards Institute

EARSS- European Antimicrobial Resistance Surveillance System

HA–MRSA - *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina adquirido em meio hospitalar

HELICS- Hospital In Europe Link for Infection Control through Surveillance

IN – Infecção nosocomial

MRSA - *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina

MSSA - *Staphylococcus aureus* sensíveis à meticilina

NNIS - National Nosocomial Infections Surveillance System

PBPs - Penicillin-Binding Proteins

PNCI- Programa Nacional de Controlo de Infecção

SHEA- Society for Healthcare Epidemiology of America

TSA – Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos

VE – Vigilância epidemiológica

VISA- *Staphylococcus aureus* intermédio à vancomicina

VRSA- *Staphylococcus aureus* resistentes à vancomicina

Lista de figuras

Figura 1 – Estrutura da parede celular dos Estafilococos	6
Figura 2 – Estrutura química da meticilina	8
Figura 3 – Localização do gene <i>mecA</i> em MRSA	10
Figura 4 – Fluxograma de processamento das amostras.....	13
Figura 5 – Colónias características de MRSA em gelose MRSA-ID.....	14
Figura 6 – Dispersão dos indivíduos rastreados por idade e sexo.	18
Figura 7 – Distribuição dos rastreios efectuados, positivos e negativos durante o período estudado	18
Figura 8 – Distribuição das estirpes <i>S. aureus</i> resistentes à Meticilina, isoladas no ano de 2008 no Hospital de S. Miguel.....	19
Figura 9 – Distribuição do número de rastreios positivos e negativos	20
Figura 10 – Distribuição dos resultados positivos e negativos para MRSA nos serviços estudados	20
Figura 11 – Distribuição dos resultados positivos para MRSA por sexo.....	21
Figura 12 – Distribuição dos rastreios positivos para MRSA de acordo com a faixa etária dos indivíduos.	22
Figura 13 – Distribuição dos rastreios positivos por produto	23
Figura 14 – Distribuição das amostras positivas por produto biológico	24
Figura 15 – Distribuição dos rastreios positivos de acordo com o produto biológico, idade e sexo dos indivíduos.....	25
Figura 16 – Principais perfis de resistência aos antibióticos testados da carta Vitek de antibiograma Gram Positivo (GPS 539) encontrados nos isolados de estafilococos para MRSA estudados.	27
Figura 17 – Distribuição dos perfis encontrados nas amostras estudadas.....	28
Figura 18 – Percentagem de resistências dos isolados estudados em função do antibiótico e ao grupo a que pertence.	29

1 - INTRODUÇÃO

Uma das maiores preocupações na área da saúde, a nível mundial, é a alta incidência de Infecção Nosocomial (IN), e as consequências epidemiológicas e económicas que lhe estão associadas (PNCI 2005). O índice de IN varia significativamente de hospital para hospital, pois está directamente relacionado com o nível de atendimento e complexidade de cada instituição. O ambiente hospitalar é inevitavelmente um grande reservatório de agentes patogénicos virulentos e oportunistas, de modo que infecções hospitalares podem ser adquiridas não apenas por pacientes, mas também, por visitantes e funcionários do próprio hospital (Crisóstomo et al. 2001; PNCI 2004a; Piteira 2007; Ratnaraja e Hawkey 2008).

Na Europa, o *Hospital In Europe Link for Infection Control through Surveillance* (HELICS), funciona como uma "rede de redes", de acordo com a filosofia da Decisão nº 2119/98/CE, da Comissão Europeia, que institui uma rede de vigilância epidemiológica e de controlo das doenças transmissíveis na comunidade. As redes associadas ao HELICS recolhem dados da IN de acordo com protocolos estabelecidos por este programa (HELICS 2006).

Em Portugal, existe o Programa Nacional de Controlo de Infecção (PNCI 2004a), que colabora com o HELICS com uma vigilância a nível das UCI's, das cirurgias, bem como nos estudos de prevalência. Além disso tem, ainda, como projectos em curso, a vigilância epidemiológica de Infecção Nosocomial da Corrente Sanguínea (INCS) (baseado no *Nosocomial Infection National Surveillance Scheme* do Reino Unido) e IN nas UCI recém-nascidos (baseado no sistema de referência alemão NEO-KISS).

Staphylococcus aureus, é um dos principais agentes etiológicos de infecção nosocomial (IN) ou adquirida na comunidade (Barber 1961; Cristino et al. 1999; Trindade et al. 2003; de Lencastre et al. 2007; Faria et al. 2008). As doenças associadas a este microrganismo variam desde simples infecções cutâneas a infecções sistémicas fatais, como endocardites e o síndrome do choque-tóxico (Canton et al. 2002; Hageman et al. 2006).

Quando no início da década de 40, a penicilina foi adoptada como terapêutica antibiótica, o *Staphylococcus aureus* era uniformemente susceptível a esta droga. No entanto em

1948, já 50% das estirpes hospitalares de *Staphylococcus aureus* eram resistentes à penicilina (Sousa 2005).

Na década de 70, a utilização de novas penicilinas semi-sintéticas (Meticilina, Oxacilina, Naficilina) em larga escala, promoveu o aumento da incidência de estirpes resistentes a estes antibióticos. Durante as últimas 4 décadas, estirpes de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) disseminaram-se por todo mundo, comprometendo seriamente, o uso empírico destas drogas no tratamento de infecções estafilocócicas (Norazah et al. 2001; Hageman et al. 2006).

Em Portugal, as primeiras infecções por MRSA foram descritas em 1985. Vários estudos realizados nos maiores hospitais do país detectaram uma prevalência de 47 a 49%, uma das mais altas descritas na Europa. Em oito hospitais Portugueses, foi detectada a disseminação do clone multirresistente de MRSA, designado por Clone Ibérico (Melo-Cristino et al. 2002).

O MRSA desenvolveu mecanismos de resistência, não só a todos os antimicrobianos β -Lactâmicos, como também a aminoglicosídeos, tetraciclina, mupirocina, eritromicina, sulfonamidas, lincomicina entre outros, limitando as opções terapêuticas apenas à Vancomicina e Teicoplanina. A situação tornou-se ainda mais preocupante com o relato de estirpes de MRSA com sensibilidade diminuída à Vancomicina no Japão em 1996 (Hiramatsu et al. 2001). Em 2002 o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) relatou a existência de estirpes MRSA resistentes à Vancomicina nos Estados Unidos.

O MRSA, outrora associado apenas, aos cuidados de saúde (HA-MRSA), é actualmente adquirido na comunidade, em pacientes sem factores de risco identificáveis, para aquisição de MRSA, isto é, directa ou indirectamente sem qualquer contacto com serviços de saúde, sendo designado por (CA-MRSA) (Chambers et al. 2001; Saunders et al. 2007; Flynn e Cohen 2008; Larsen et al. 2008; Strandén et al. 2008).

Estima-se que aproximadamente 25 a 30% da população esteja colonizada com *Staphylococcus aureus* e que 0.2 a 7% esteja colonizada com MRSA. A colonização nasal com MRSA é um importante reservatório de transmissão e é considerado um factor acrescido de risco de infecção (Marshall e Muhlemann 2006, Paule et al. 2007; Szakacs et al. 2007).

Estudos de vigilância recentes, realizados em várias partes do mundo indicam prevalência variável de MRSA, dependendo do país, principalmente do hospital ou sector do hospital estudado (Manzur et al. 2008; Park et al. 2009). Em alguns locais, foram relatadas taxas acima dos 60% (Farr 2004; Mímica e Mendes 2007; NHS 2007). Segundo o relatório, do último Inquérito de Prevalência de Infecção Nosocomial, realizado em Portugal em 2003, foram isolados 18,45% de *Staphylococcus aureus* dos quais, 41,1% eram resistentes à meticilina (PNCI 2005).

Ainda que exista, em diversos países, legislação e normas específicas para o controlo da transmissão nosocomial de MRSA, através de rastreio na admissão hospitalar, não existe consenso no modo de execução (PNCI 2005; Harbarth et al. 2008).

Em Portugal, ainda não há legislação neste sentido, mas, à semelhança, de outros países Europeus, Americanos e Asiáticos, o MRSA é encarado como um grave problema de saúde pública, merecendo por isso especial atenção por parte das Comissões de Controlo de Infecção (CCI), existentes em todas as instituições hospitalares nacionais.

As CCI à semelhança do National Nosocomial Infections Surveillance System (NNIS), implementado nos EUA em 1970, visam a vigilância epidemiológica (VE) contínua das IN, tendo por objectivo, entre outros, a identificação de doentes mais susceptíveis assim como as áreas de maior risco nos hospitais, com o intuito de minimizar o risco de transmissão cruzada através de práticas de prevenção adequadas. Actualmente os estudos de incidência e prevalência, são métodos importantes de VE (PNCI 2005).

Estudos sobre as características do biofilme formado pelos *Staphylococcus aureus* revelaram que estes microrganismos são capazes de persistir por até 7 meses sobre superfícies inanimadas secas, principalmente se essas superfícies forem plásticas (Kramer et al. 2006).

Por outro lado, foi recentemente comprovado, através de um modelo matemático envolvendo algoritmos, que a proximidade física entre pacientes internados com pacientes infectados por MRSA parece, na realidade, ser o principal factor na expansão de surtos, resultando no aumento significativo do número de casos num determinado hospital (Bootsma et al. 2006).

Há também estudos que evidenciam, redução dos custos efectivos associados aos cuidados de saúde, devido à implementação de rastreios de MRSA no acto de admissão hospitalar e consequente redução da taxa de mortalidade e morbilidade (Wernitz et al. 2005; Goetghebeur et al. 2007; Harbarth et al. 2008; Williams et al. 2009).

Assim sendo, a implementação de metodologias que abreviem o tempo de resposta, são uma mais valia na luta contra a transmissão de MRSA associada à prestação de cuidados de saúde. Neste sentido, o recurso a meios cromogéneos selectivos como método de rastreio de MRSA, são uma mais valia (Lagacé- Wiens et al. 2008). Vários estudos apontam para o facto da detecção do gene que codifica a resistência à metilina (MecA) ou o seu produto de expressão, a proteína PBP2' serem mais sensíveis na identificação de MRSA, do que os métodos convencionais de detecção de MRSA, como a antibiograma pelo método de discos (Chambers 1997; Nakatomi et al. 1998).

Atendendo aos factos anteriormente descritos e a que no Hospital de S. Miguel, situado na região Centro-Norte de Portugal, ao longo dos últimos anos o número de MRSA isolados tem sido significativo, representando 63% das estirpes de *S. aureus* identificadas em 2008, a Comissão de Controlo de Infecção do hospital, em colaboração com o Serviço de Patologia Clínica, entendeu ser necessária a realização de um rastreio de MRSA na admissão hospitalar, no acto de internamento, com a finalidade de identificar doentes colonizados com MRSA.

Aos doentes identificados como portadores, procede-se à sua descolonização nasal com Mupirocina a 2% e banho com Cloro-hexidina a 4%, durante 5 dias consecutivos. A situação é reavaliada, 48 horas após ter terminado o ciclo de descolonização, seguindo o protocolo elaborado pela CCI.

Com este procedimento e adicionalmente a implementação de precauções de contacto, pretende-se evitar a sua transmissão a outros doentes e profissionais de saúde, sendo uma mais valia no controlo de IN.

2 - ESTAFILOCOCOS AUREUS METICILINA - RESISTENTES (MRSA)

2.1 - Epidemiologia do género *Staphylococcus*.

O termo *Staphylococcus* foi usado pela primeira vez por Ogston em 1883 para designar cocos dispostos em cacho, responsáveis por abscessos no homem e animais. Posteriormente Rosenbach criou o género *Staphylococcus*. Encontram-se descritas cerca de 30 espécies, embora clinicamente apenas duas, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus saprophyticus* sejam reconhecidas como agentes patogénicos para o homem. Todas as restantes podem ser oportunistas frequentes ou ocasionais, excepcionalmente patogénicos para o homem (Cristino 2000).

O habitat normal do género *Staphylococcus*, é a pele humana. Como microrganismo saprófita, encontra-se mais frequentemente na flora comensal das narinas anteriores, orofaringe, axilas e períneo. Cerca de 20 a 40 % da população normal é portadora nasal de *S. aureus*. Nos prestadores de cuidados de saúde, esta percentagem pode atingir os 60% (Cristino 2000, Nilsson e Ripa 2006, Paule et al. 2007).

Quando a relação de equilíbrio entre microrganismo e hospedeiro é afectada, ou quando este tem acesso a locais habitualmente estéreis devido a quebra de barreiras, pode causar infecção endógena. Para além da infecção endógena, pode ocorrer infecção cruzada a partir de outra pessoa por contacto directo, por contacto indirecto através de objectos e superfícies contaminadas, ou por via aérea (Cristino 2000; Sherertz RJ et al. 2001, Walker et al. 2007).

2.2 - Características morfológicos e culturais

S. aureus, pertence à família das *Micrococcaceae* e contém cocos Gram positivos, imóveis, capsulados e não esporulados. No exame directo após coloração pelo método de Gram agrupam-se caracteristicamente em cacho, embora também possam aparecer como cocos isolados, aos pares ou em tétradas. São aeróbios ou anaeróbios facultativos, facilmente cultiváveis *in vitro*, desenvolvendo-se bem em meios de cultura pouco nutritivos. Após 24 horas de incubação a 37°C, em g elose de sangue, formam colónias

redondas de 2 a 3 mm de diâmetro, de cor variável entre o branco e amarelo com bordo regular, brilhantes, lisas e opacas (Baron e Finegold 1990, Cristino 2000).

2.3 - Mecanismos de patogenicidade

A gravidade das infecções causadas por *S. aureus*, deve-se a mecanismos de patogenicidade estruturais e funcionais. Estruturais, associados à cápsula e parede celular. Funcionais, associados a produção extracelular de enzimas e toxinas (Baron e Finegold 1990, Cristino 2000, Murray et al. 2006).

A parede celular é limitada exteriormente pela cápsula e no interior pela membrana citoplasmática, sendo constituída por peptidoglicano, proteína A e ácidos teicóicos. O peptidoglicano é o principal componente estrutural da parede celular e garante a estabilidade osmótica da bactéria. A proteína A é a camada que envolve exteriormente o peptidoglicano e tem a capacidade de se ligar às IgG1, IgG2 e IgG4. Os ácidos teicóicos de natureza polissacarídica tanto se ligam ao peptidoglicano como à membrana citoplasmática, medeando a ligação à fibronectina das mucosas. A cápsula é de natureza polissacarídica e funciona como agente antifagocitário (Baron e Finegold 1990, Cristino 2000, Murray et al. 2006). A sua estrutura pode ser observada na figura 1.

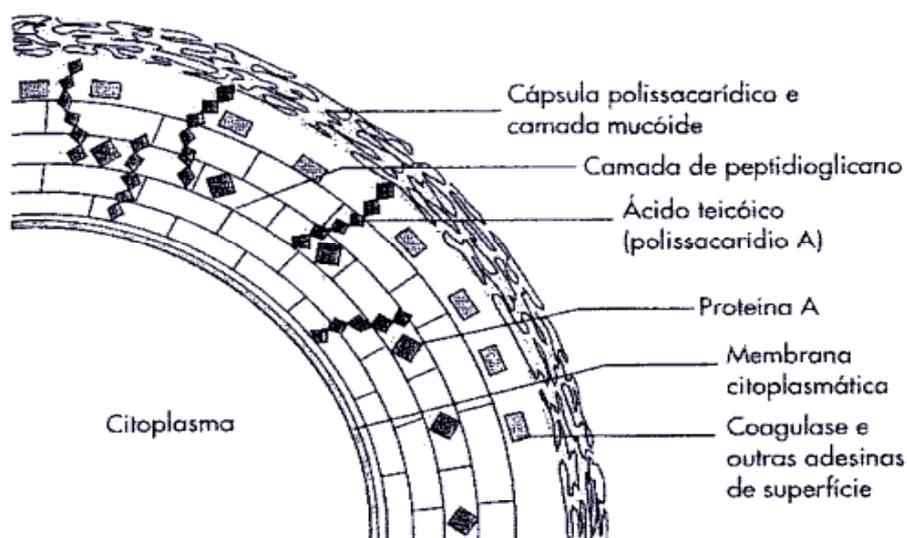


Figura 1 – Estrutura da parede celular dos Estafilococos (adaptado de Murray et al 2006).

As enzimas mais importantes são a coagulase, que actua a nível da coagulação do plasma, formando um depósito de fibrina que funciona como escudo protector contra a fagocitose; a catalase, que catalisa a conversão do peróxido de hidrogénio em oxigénio e água; a hialuronidase com acção sobre o ácido hialurónico; a fibrinolise com acção fibrinolítica; a desoxirribonuclease que destrói o DNA; as lipases que hidrolisam lípidos facilitando a invasão da pele e tecido celular e as penicilinas que hidrolisam penicilinas (Baron e Finegold 1990, Cristino 2000, Murray et al. 2006).

As principais toxinas são as hemolisinas alfa, beta e gama, com acção hemolítica, leucocida letal e dermonecrótica; a leucocidina Panton-Valentine, com acção lítica para leucócitos; as exfoliativas A e B, responsáveis pela síndrome da pele escaldada e a TSS-1 responsável pela síndrome do choque tóxico (Baron e Finegold 1990, Cristino 2000, Murray et al. 2006, Tristan et al. 2007).

2.4 - Significado clínico

As infecções causadas por *S. aureus*, podem ocorrer em indivíduos de todas as faixas etárias, devido à acção directa do microrganismo na pele e tecido celular subcutâneo, ou devido à acção das suas toxinas (Baron e Finegold 1990, Cristino 2000, Murray et al. 2006).

Da acção directa do microrganismo, na pele e tecido celular subcutâneo, são exemplo, o furúnculo, impetigo, celulite, infecções de queimaduras e de feridas traumáticas ou cirúrgicas. Por vezes a partir destas simples infecções ou colonizações podem ocorrer bacteriémias, que podem levar ao aparecimento de infecções mais graves como endocardites, artrites, osteomielites, pneumonias, empiemas, pielonefrites, meningites e septicemias. Pode ainda ser responsável por infecções associadas a catéteres ou próteses (Baron e Finegold 1990, Cristino 2000, Murray et al. 2006).

Da acção das suas toxinas podem surgir três quadros clínicos distintos: intoxicação alimentar, Síndrome da pele escaldada e Síndrome do Choque tóxico (Baron e Finegold 1990, Cristino 2000, Murray et al. 2006).

2.5 - Meticilina

A Meticilina é uma penicilina semi-sintética, quimicamente designada de 2,6-dimetoxifenilpenicilina, a sua estrutura química encontra-se representada na figura 2, possui um anel β -Lactâmico constituído por três átomos de carbono e um de nitrogénio que se encontra fundido com um anel tiazolidina.

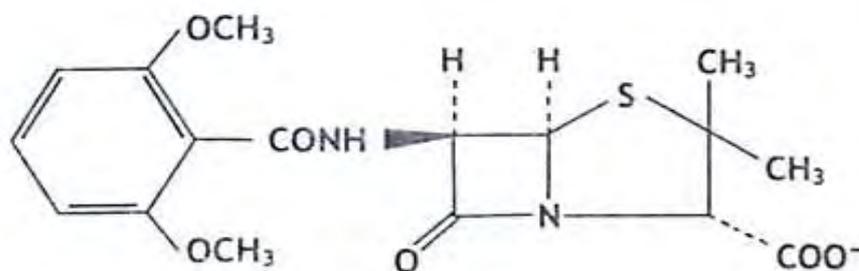


Figura 2 – Estrutura química da metilina (adaptado de Sousa 2005).

Pertence ao grupo dos antibióticos β -Lactâmicos, que é um dos compostos mais utilizados no tratamento de infeções bacterianas, devido à sua eficácia terapêutica e baixa toxicidade para organismos superiores. No entanto deve ser apenas utilizada para o tratamento de infeções estafilocócicas resistentes à penicilina G, uma vez que podem ocorrer alguns efeitos secundários (Sousa 2005, Murray et al. 2006).

2.5.1 - Mecanismo de acção dos antibióticos β -Lactâmicos

Os antibióticos β -Lactâmicos, são também designados por antibióticos antiparietais, devido a actuarem na fase terminal da biosíntese do peptidoglicano. A estrutura básica do peptidoglicano é formada por uma cadeia de dez a sessenta e cinco resíduos de dissacarídeos, em que vão alternando moléculas de N-acetilglicosamina e ácido N-acetilmurâmico. A ligação destas cadeias é catalisada pelas enzimas serínicas D-D-carboxipeptidases-transpeptidases, também chamadas de PBPs (Penicillin-Binding Proteins) porque os antibióticos β -Lactâmicos se fixam a elas, inibindo a sua acção e consequentemente a interligação das bactérias em crescimento. Nesta situação são

activadas autolisinas que degradam a parede celular, conduzindo à morte da célula bacteriana (Walsh 2000, Sousa 2005; Murray et al. 2006).

2.5.2 - Mecanismos de resistência

A capacidade de resistência aos antibióticos, pode dever-se a mutações espontâneas ou à aquisição de genes de resistência localizados em elementos genéticos móveis como, transposões, plasmídeos ou integrões (Köhler et al. 1999).

A resistência bacteriana aos antibióticos β -Lactâmicos deve-se a quatro mecanismos: hidrólise enzimática dos β -lactâmicos por β -lactamases, modificação dos alvos (PBPs), impermeabilização da membrana externa e bombas de efluxo (Sousa 2005).

A síntese bacteriana de β -lactamases e a produção de PBPs alteradas, são factores determinantes de resistência aos antibióticos β -Lactâmicos. Já foram descritas mais de 200 β -lactamases (penicilinas, cefalosporinas, e carbapenemas), entre outras, capazes de inactivar a maioria dos antibióticos β -lactâmicos. Os genes responsáveis pela produção destas enzimas são de origem plasmídica ou cromossómica (Sousa et al. 1998, Murray et al. 2006).

A síntese de β -lactamases em *S. aureus* é codificada pelo gene plasmídico *blaZ*, sendo este regulado por outros dois genes, um com actividade repressora (*blaI*) e outro com actividade anti-repressora (*blaRI*). Estes genes codificam respectivamente, proteínas repressoras e sinalizadoras da expressão de *blaZ* (Lowy 2003).

S. aureus possui 4 PBP's: PBP₁, PBP₂, PBP₃, PBP₄, com Peso Molecular, respectivamente, de 85, 81, 75 e 45 KDa. No caso das estirpes sensíveis à meticilina (MSSA), estas utilizam as 4 PBPs, para catalisar a transpeptidação do peptidoglicano, pensa-se que a PBP2a, nas estirpes MRSA desempenha as funções destas 4 PBPs, promovendo os os "cross-Linking" (Sousa 2005).

As estirpes MRSA possuem elementos genéticos móveis (cassetes cromossómicas) contendo o gene *mecA* (SCC*mec*) que codifica a síntese de PBP2'. Na figura 3 encontra-se esquematizada a localização do gene MecA em MRSA. A região *mec* tem o gene *mecA*, gene estrutural para PBP2a sendo os genes *mec1* e *mec R1*, elementos

reguladores que controlam a transcrição do gene *MecA*. Não se conhece a sua origem mas admite-se que houve transferência horizontal entre diferentes espécies de *Staphylococcus* e a do gene *mecA* entre diferentes géneros Gram positivo. O gene *mecA* confere aos *Staphylococcus* resistência intrínseca a todos antibióticos β -lactâmicos (Sousa 2005).

Alguns genes (*femA*, *femB*, *femC* e *femE*), que regulam a síntese e degradação do peptidoglicano podem ter participação indirecta na resistência à meticilina/oxacilina em função de diminuição de transcrição ou modificações estruturais dos seus produtos que são as proteínas denominadas por *Fem* (Sousa 2005).

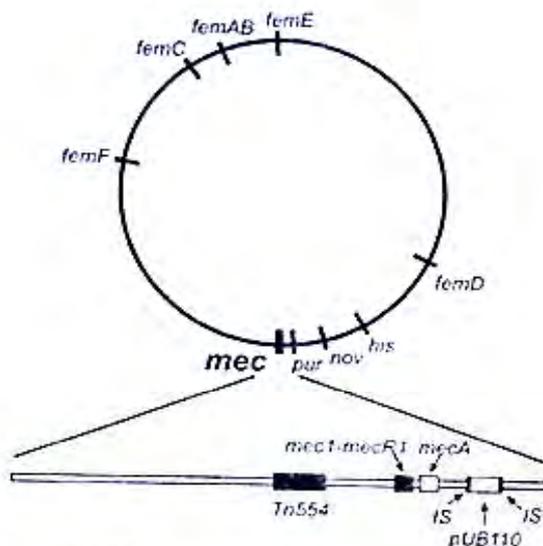


Figura 3 – Localização do gene *mecA* em MRSA (adaptado de Sousa 2005).

Se a resistência for independente de *PBP2a*, as infecções podem ser tratadas com Oxacilina, Meticilina ou com inibidores de β -lactamases associados aos β -lactâmicos, no entanto as dependentes devem ser tratadas com Vancomicina ou Teicoplanina, o que pode favorecer o aparecimento de estirpes resistentes a estes antibióticos. Por isso a definição laboratorial do mecanismo de resistência envolvido é uma mais valia na escolha antimicrobiano mais adequada (Murray et al. 2003).

3 - OBJECTIVOS

Pacientes colonizados ou infectados, são o grande reservatório de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) na transmissão directa ou cruzada em meio hospitalar ou durante a prestação de serviços associados aos cuidados de saúde (Williams et al. 2008).

O principal meio de controlar o problema, passa pela identificação de portadores de MRSA, potenciais fontes do microrganismo e pela implementação de precauções de isolamento e contacto adequadas.

É neste contexto que surge, o rastreio de MRSA nesta instituição Hospitalar. Os isolados de MRSA, daí resultantes, são a base do presente estudo que tem por objectivo a caracterização fenotípica destas estirpes e conservação das mesmas em glicerol a 40% a -80°C, para posterior caracterização genotípica.

Constituem objectivos específicos desta investigação:

- I. Estudar a prevalência de MRSA nos pacientes do internamento do Serviço de Medicina 1 e Medicina 2 do Hospital S. Miguel;
- II. Estudar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos das estirpes isoladas;
- III. Averiguar a existência de clone ou clones HA-MRSA endémicos na instituição bem como clones adquiridos na comunidade CA-MRSA.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - Amostra Populacional

A amostra populacional deste estudo foi de conveniência, teve como critério de inclusão, o rastreio de MRSA no acto de admissão hospitalar nos serviços de Medicina 1 e Medicina 2 do Hospital S. Miguel e foi realizado entre 1 de Junho de 2008 e 31 de Dezembro de 2008. Neste período foram efectuados 660 rastreios.

A cada indivíduo rastreado foram efectuadas duas colheitas, uma de exsudado nasal e outra de exsudado da orofaringe, através de zaragatoas esterilizadas em tubo. As amostras recolhidas foram de imediato enviadas ao laboratório e processadas.

4.2-Amostra Laboratorial

Dos 95 rastreios positivos, por questões logísticas apenas 36 foram estudados. Destes 36 rastreios positivos, obtiveram-se 70 isolados de MRSA que foram submetidos a caracterização fenotípica. Adicionalmente procedeu-se à conservação dos isolados para posterior caracterização genotípica.

4.3 - Processamento das amostras

As amostras foram inoculadas directamente no meio de cultura Gelose MRSA ID da casa comercial bioMérieux® e incubadas em aerobiose a 37°C. Após 18 – 24 h de incubação as culturas foram examinadas. As colónias suspeitas (colónias verdes), características de MRSA, foram de imediato reportadas aos Serviços de Internamento como positivas. O esquema de processamento das amostras encontra-se no fluxograma da figura 4.



Figura 4 – Fluxograma de processamento das amostras.

As culturas negativas foram incubadas durante mais 24 horas. Após 48h de incubação na ausência de colónias suspeitas o resultado foi emitido como sendo negativo. Todas as colónias suspeitas após 24 ou 48 h de incubação, foram isoladas para Gelose de Sangue (COS) da casa comercial bioMérieux®, e posteriormente foi realizada a sua caracterização fenotípica para confirmação dos resultados.

4.4 - Caracterização fenotípica

A caracterização fenotípica dos isolados de MRSA, foi efectuada com base em características morfológicas culturais; pesquisa de actividade enzimática extracelular e teste de sensibilidade aos antibióticos.

4.4.1 - Meios de cultura

Foram utilizados meios de cultura prontos a usar, da casa comercial bioMérieux®. Os meios foram incubados na estufa a 37°C em aerobiose por um período de 18 a 24 h. A sua composição encontra-se em anexo (anexo 1).

- **Gelose MRSA ID**

Meio cromogénico para pesquisa e identificação de MRSA. É constituído por uma base nutritiva com diferentes peptonas; um substrato cromogénico de α -glucosidase e cefoxitina. Foi utilizado para sementeira dos exsudados. A observação do meio de cultura foi efectuada 18 a 24h após incubação. A presença de uma ou mais colónias verdes corresponde a um resultado positivo (figura 5).



Figura 5 – Colónias características de MRSA em gelose MRSA-ID.

- **Gelose de Sangue (COS)**

Meio enriquecido com uma mistura de peptonas e 0.5% de sangue de carneiro que permite visualizar a expressão da hemólise, característica do *S. aureus*. É utilizado para o isolamento do MRSA, para posteriormente se proceder ao Teste de Sensibilidade Antibiótica e Testes Serológicos.

- **Caldo Tripcase Soja (TSB-T)**

Meio líquido enriquecido, com peptonas que permite o crescimento da maioria dos microrganismos não exigentes. Foi utilizado para a repicagem dos isolados de MRSA, a partir de Gelose de Sangue e incubado durante a noite na estufa a 37° em aerobiose. A partir deste meio, procedeu-se à conservação das estirpes a -80°C, (numa proporção de 400µl de células crescidas em TSB para 200µl de Glicerol a 40%) para posterior caracterização genotípica.

4.4.2 - Testes Serológicos

Como já foi dito anteriormente, a coagulase é uma das mais importantes enzimas produzidas pelo *S. aureus*. A produção desta enzima extracelular, faz com que esta espécie seja a mais virulenta das espécies do género, que não expressam esta enzima (Falcone et al 2007).

Por outro lado, a detecção do produto de expressão do gene *MecA*, a proteína PBP2', é uma mais valia na vigilância epidemiológica, tendo em conta a elevada sensibilidade e especificidade do teste rápido de aglutinação utilizado.

Os testes serológicos utilizados no estudo das características, acima referidas, dos isolados de MRSA, foram *SLIDEX® MRSA Detection* o *SLIDEX® Staph Plus* comercializados pela *bioMérieux® SA*.

O *SLIDEX® MRSA Detection*, consiste num teste rápido de aglutinação de partículas de látex que permite a detecção da resistência à meticilina das estirpes de *s. aureus* por detecção da PBP2' (anexo 2).

O *SLIDEX[®] Staph Plus*, consiste num teste rápido de aglutinação de partículas de látex para a identificação de estirpes de *S. aureus* a partir de meios de isolamento. Permite a detecção simultânea do factor de afinidade para o fibrinogénio (Clumping factor), da proteína A e de um antigénio de grupo ligado ás estruturas periféricas específicas de *S. aureus* (anexo 3).

4.4.3 -Avaliação da Susceptibilidade aos Antibióticos

A resistência à Meticilina, e o perfil de Sensibilidade aos agentes antimicrobianos, foram testados no *Sistema automático Vitek[®]* (bioMérieux, Marcy l'Etoile, França), que utiliza cartas (com diferentes antibióticos) adaptadas a uma técnica automatizada, cujo princípio se baseia na determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) por micro diluição. O resultado obtido permite classificar o microrganismo como Sensível (S), Intermédio (I) ou Resistente (R). Tem incluído um sistema de validação do antibiograma, o sistema Expert, que permite validar os resultados normais, detectar anomalias e corrigir resultados.

A carta de antibiograma utilizada, foi a carta Vitek[®] de Antibiograma Gram positivo GPS 539, destinada ao antibiograma dos *Staphylococcus* (anexo 4). Esta carta possui os antibióticos usados habitualmente neste Hospital e outros antibióticos ou moléculas que permitem a detecção de mecanismos de resistência.

Desta carta constam os seguintes antibióticos (de diferentes grupos) e moléculas a testar com as seguintes Concentrações Inibitórias Mínimas (CMI): Eritromicina; ($\leq 0.5 \dots \geq 8$ $\mu\text{g/ml}$); Fosfomicina ($\leq 16 \dots \geq 64 \mu\text{g/ml}$); Ácido fusídico ($\leq 1 \dots \geq 16$ $\mu\text{g/ml}$), Gentamicina ($\leq 2 \dots \geq 16 \mu\text{g/ml}$); Kanamicina ($\leq 8 \dots \geq 16$ $\mu\text{g/ml}$); Lincomicina ($\leq 2 \dots \geq 8$ $\mu\text{g/ml}$); Linezolid ($\leq 2 \dots \geq 16 \mu\text{g/ml}$); Nitrofurantuína ($\leq 32 \dots \geq 128 \mu\text{g/ml}$); Ofloxacina ($\leq 1 \dots \geq 8$ $\mu\text{g/ml}$); Oxacilina ($\leq 0.25 \dots \geq 8$ $\mu\text{g/ml}$); Pristamicina ($\leq 2 \dots \geq 4$ $\mu\text{g/ml}$); Teicoplanina ($\leq 2 \dots \geq 32 \mu\text{g/ml}$); Tetraciclina ($\leq 1 \dots \geq 16$ $\mu\text{g/ml}$); Tobramicina ($\leq 4 \dots \geq 8$ $\mu\text{g/ml}$); Trimetropim-Sulfonamida ($\leq 10 \dots \geq 320 \mu\text{g/ml}$); Vancomicina ($\leq 0.5 \dots \geq 32$ $\mu\text{g/ml}$) e β -Lactamases (anexo 4).

Como controle de qualidade foi usado a estirpe ATCC 29213, de acordo com as normas internacionais do *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI[®])*.

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

O objectivo deste projecto foi proceder ao estudo da prevalência de MRSA nos pacientes do internamento dos Serviços de Medicina do Hospital S. Miguel assim como à caracterização fenotípica dessas estirpes isoladas de forma a conseguir averiguar a existência de clone ou clones HA-MRSA endémicos na instituição bem como clones adquiridos na comunidade CA-MRSA. Especificamente, pretendia-se avaliar a existência de potenciais riscos para a saúde humana causados pela presença destes microrganismos.

Segundo Hartstein e colaboradores (2004) *“a disseminação internacional do MRSA, após a sua descoberta inicial, tem sido e continua a ser um dos mais difíceis desafios para o controlo e tratamento das infecções nosocomiais. (...) A frequência de casos de MRSA está agora a aumentar, em muitas áreas do globo, mas a variabilidade geográfica das taxas de MRSA continua a não ser bem compreendida. Diferenças na capacidade laboratorial para reconhecimento do MRSA e nas práticas de rastreio poderão contribuir para alguma, da aparente, variação.”*

Apesar da incidência de infecção por MRSA ser baixa nos países nórdicos (Dinamarca, Finlândia, Islândia, Noruega e Suécia), em comparação com outros países, foi observado em todos eles um aumento significativo nos últimos 3 a 5 anos. A justificação deste aumento deve-se à alteração na epidemiologia deste microrganismo. Actualmente já se encontra em circulação na comunidade, numa proporção significativa, onde têm sido registados casos em que não se identificam factores de risco associados à aquisição de MRSA. Este aumento de casos na comunidade em indivíduos saudáveis provocou, também, introdução de mais casos de MRSA nos hospitais, aumentando a transmissão intra hospitalar e a ocorrência de surtos (Skov 2005).

Durante o período estudado, foram rastreados 660 indivíduos de ambos os sexos (319 mulheres e 341 homens), com idades compreendidas entre 17 e 101 anos, integrantes da população utente do internamento do Serviço de Medicina 1 e Medicina 2, do Hospital S. Miguel (Figura.6).

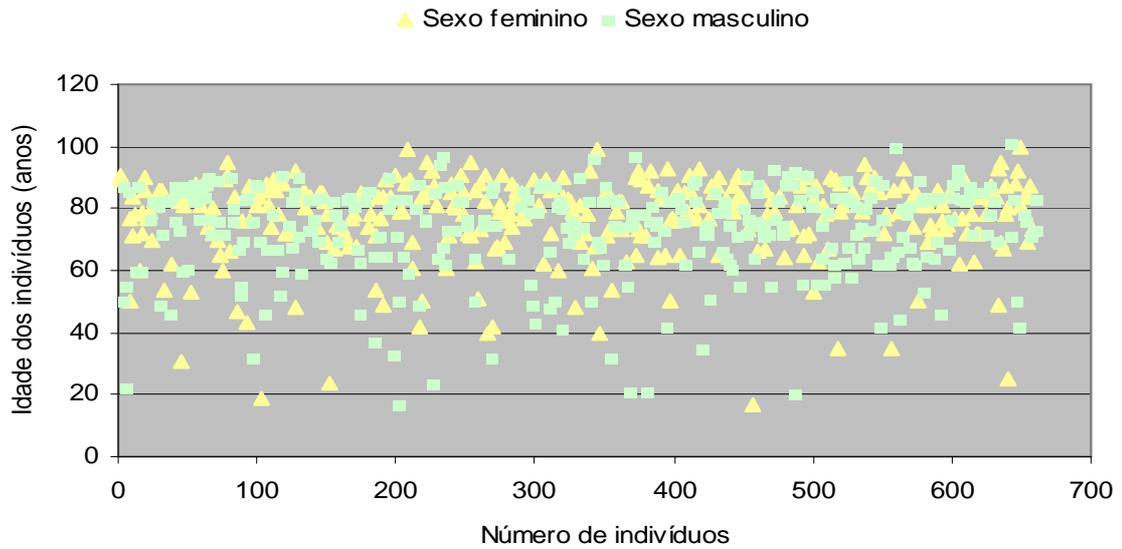


Figura 6 – Dispersão dos indivíduos rastreados por idade e sexo.

Na Figura 7, podemos observar que o número de indivíduos rastreados é variável ao longo do período estudado. Novembro e Dezembro são os meses que registam maior número de rastreios, possivelmente devido à morbilidade associada às condições climatéricas desta época do ano. Adicionalmente podemos ainda observar que Junho é o mês em que se verifica maior número de rastreios positivos,. Num estudo realizado por Monnet e colaboradores (2004), é referida a existência de uma variação sazonal da prevalência de MRSA associada à primavera.

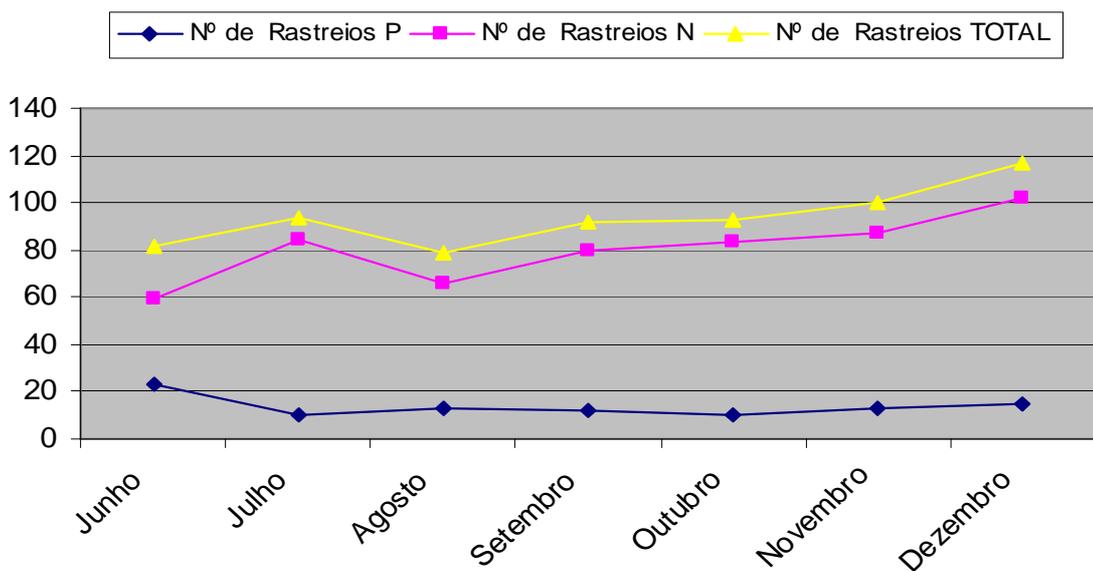


Figura 7 – Distribuição dos rastreios efectuados, positivos e negativos durante o período estudado.

No Hospital S. Miguel ao longo dos últimos anos o número de MRSA isolados tem sido significativo. Em 2008, representou 63% das estirpes de *S. aureus* identificadas, como podemos verificar na figura 8:

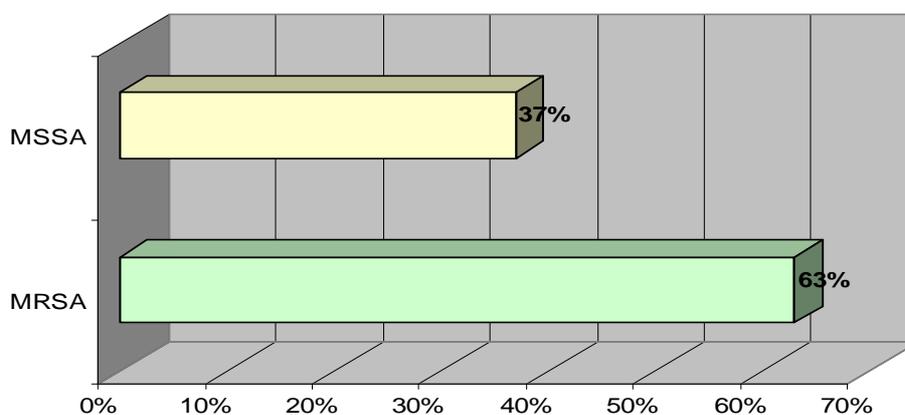


Figura 8 – Distribuição das estirpes *S. aureus* resistentes à Meticilina, isoladas no ano de 2008 no Hospital de S. Miguel.

Esta elevada taxa de incidência está de acordo com estudos realizados por Melo-Cristino e a sua equipa (2006), em que foram comparados dados de nove hospitais, com intervalo de uma década, em que foi observada uma elevada taxa de MRSA (47,5% em 2003), embora com diferenças significativas nas diversas instituições seleccionadas.

Por outro lado, no âmbito do Programa de Vigilância de Antimicrobianos SENTRY, que monitoriza as resistências em estirpes nosocomiais e da comunidade a nível global, alguns estudos fazem referência ao facto de somente alguns hospitais de cada país participarem neste estudo, o que pode justificar as grandes diferenças dentro do mesmo país (por exemplo, em Espanha, um hospital de Sevilha detectou 34% de MRSA enquanto que um de Barcelona detectou somente 9% (Fluit et al. 2001).

O Programa de Vigilância de Antimicrobianos SENTRY, acima referido, encontrou uma prevalência total de MRSA, a nível mundial entre 1997 e 1999, da seguinte ordem de grandeza: Região do Pacífico Oeste – 46%; EUA – 34,2%; América Latina – 34,9% e Europa 26,3%. As taxas encontradas no Canadá foram as mais baixas, com somente 5,7% de resistência à meticilina. Por outro lado, em Hong-Kong e Japão foi onde se detectaram as taxas mais altas, com 73,8% e 71,6%, respectivamente (Diekema et al. 2001).

Na figura 9, podemos observar que no presente estudo, obteve-se uma prevalência de 14.4% de MRSA no total de rastreios efectuados. Do total de rastreios de MRSA., 95 (14,4%) foram positivos e 565 (85,6%) foram negativos.

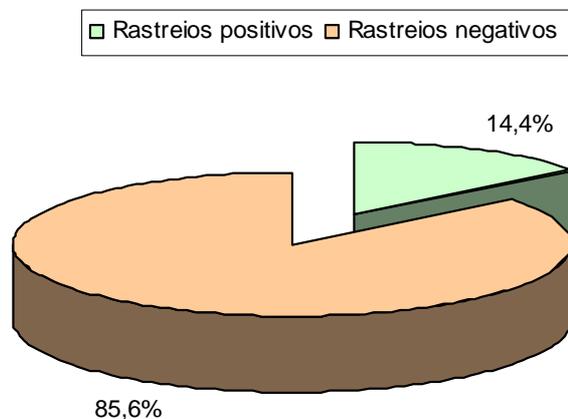


Figura 9 – Distribuição do número de rastreios positivos e negativos.

Dos 95 rastreios positivos efectuados durante o estudo, 40 (42.1%) provêm do serviço de Medicina 1 e 55 (57.9%) do serviço de Medicina 2 (Figura 10). Destes, 41 (43.1%) são do sexo feminino e 54 (56.9%) são do sexo masculino (Figura 11).

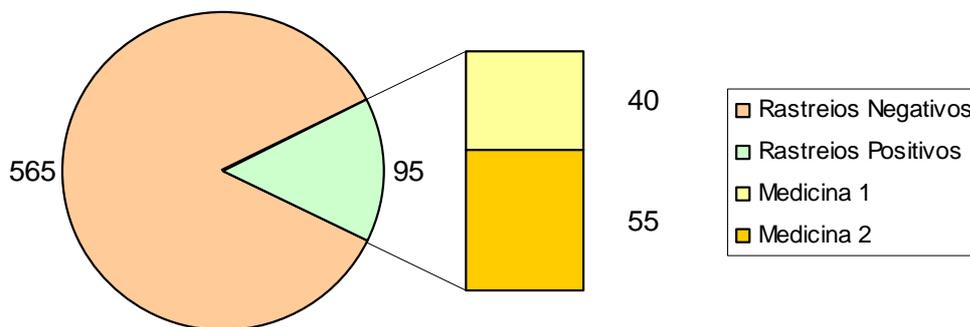


Figura 10 – Distribuição dos resultados positivos e negativos para MRSA nos serviços estudados.

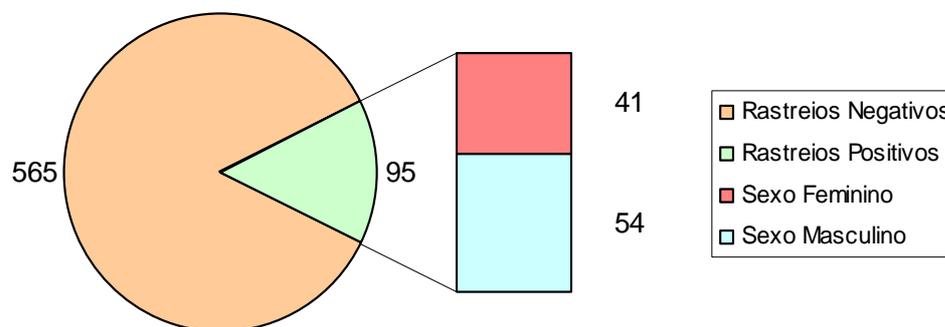


Figura 11 – Distribuição dos resultados positivos para MRSA por sexo.

Tal como os resultados encontrados neste rastreio relativamente ao género masculino, (56.9% com média de idade de 74 anos), também em alguns rastreios o número de indivíduos do sexo masculino foi superior aos do sexo feminino. Huang e Platt (2003) relatam valores semelhantes, com uma média de 68 anos e de 57% de homens, em indivíduos portadores de MRSA de um hospital de Boston. Já Montesinos e seus colaboradores (2003) encontram, numa população de 70 indivíduos portadores de MRSA nosocomial, uma média de 60 anos de idade e uma proporção de 70% de homens.

De acordo com o gráfico da Figura 12 a distribuição dos rastreios positivos em função da idade, é mais representativa nos indivíduos na faixa etária dos 70-79 anos e 80-89 anos. Estes resultados, podem ser explicados, pela elevada morbilidade associada à idade, que engloba aspectos de imunodepressão, imobilização ou mobilidade reduzida e de carácter social, que por vezes comprometem uma adequada higienização. A Institucionalização, é outro factor a considerar, uma vez que Lares de Idosos são considerados importantes reservatórios de MRSA. Estes aspectos referidos, anteriormente, dão oportunidade a novas colonizações, nomeadamente por MRSA. Assim sendo, a prevalência de MRSA no período estudado, tendo em conta as diferentes faixas etárias é de 44.2% para os indivíduos da faixa etária dos 80-89 anos; 24.2% dos 70-79 anos; 13.6% dos 90-99 anos; 10.5% dos 60-69 anos; 3.5% dos 40-49 anos e igualmente de 2% para as faixas etárias dos 20-29 e 50-59 anos.

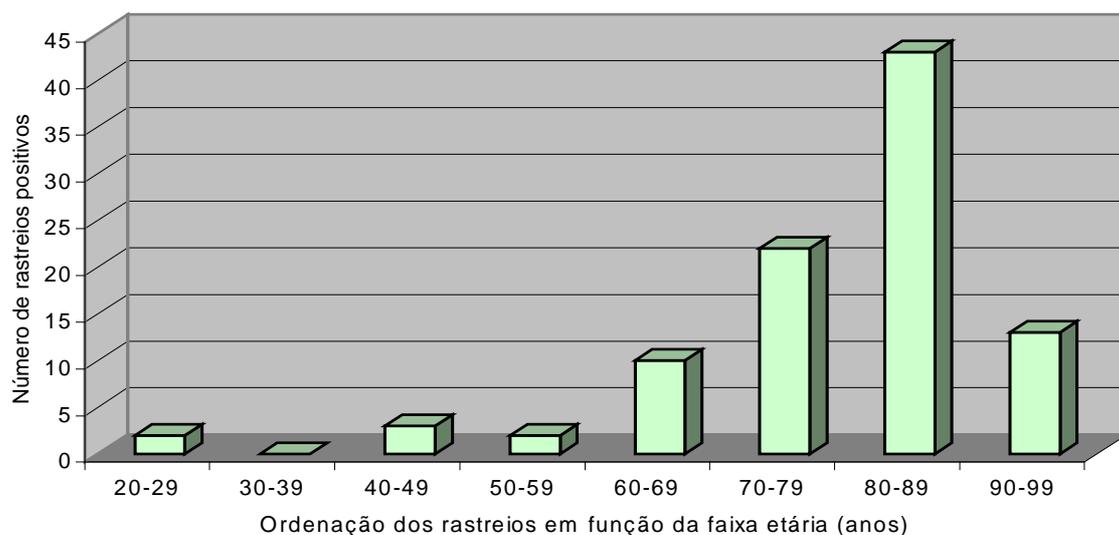


Figura 12 – Distribuição dos rastreios positivos para MRSA de acordo com a faixa etária dos indivíduos.

Quanto aos locais em que se deverá efectuar o rastreio, Hartstein e colaboradores, (2004) referem a avaliação na zona nasal e eventuais feridas existentes como os locais eleitos para identificar praticamente todos os portadores. Deverá considerar-se ainda a orofaringe, expectoração (no caso de doentes com tosse produtiva) e região umbilical nos recém-nascidos (Coia et al. 2006).

Outros rastreios efectuados em doentes admitidos numa unidade de reabilitação, referem que culturas nasais negativas têm um carácter altamente preditivo (98%) em relação às culturas perianais (Manian et al. 2002).

Num estudo recente realizado em França, compararam-se, durante um ano, a sensibilidade do rastreio nasal *versus* rastreio a vários locais do corpo. Concluiu-se então que, somente com rastreio nasal, 27% dos portadores de MRSA não seriam detectados, o que corresponde a 560 dias teóricos de isolamento. Por sua vez, se o rastreio rectal não fosse utilizado, 431 dias teóricos de isolamento seriam perdidos e, se o rastreio axilar não fosse utilizado, este valor decrescia para 99 dias (Eveillard et al. 2006).

No presente estudo, dos rastreios positivos, obtidos em função do produto estudado, 17 (18%), são de exsudado nasal e 26 (27%) de exsudado da orofaringe e 52 (55%) são oriundas de ambos os produtos Figura 13).

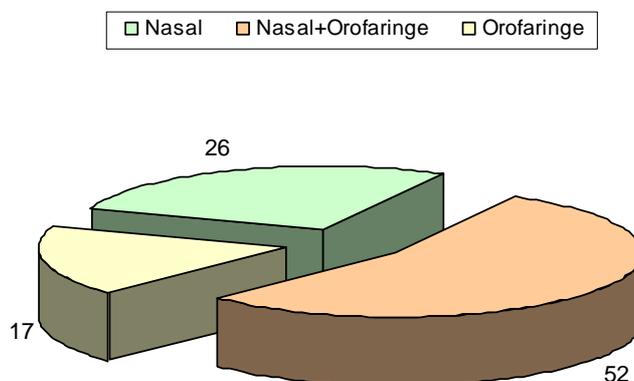


Figura 13 – Distribuição dos rastreios positivos por produto.

Nilsson e Ripa (2006), num estudo efectuado com o objectivo de determinar a frequência de portadores de *S. aureus* nas fossas nasais e na orofaringe, concluíram que a orofaringe deve ser incluída nos rastreios e demonstraram que a presença de *S.aureus* nas fossas nasais em muitos casos, é indicador da presença deste microrganismo na garganta. À semelhança do actual estudo, também estes autores concluíram que se as fossas nasais estivessem colonizadas, a bactéria, salvo raras excepções também estaria na garganta. É importante referir, que se não tivesse sido efectuada a colheita em ambos os locais não teriam sido identificados, 17 portadores de MRSA na orofaringe ou 26 portadores de MRSA nas fossas nasais.

Destes 95 rastreios positivos, por questões logísticas, apenas 36 foram submetidos a caracterização fenotípica. Assim sendo foram estudadas 70 amostras obtidas nestes 36 rastreios, sendo 34 provenientes de colheita nasal e 36 de colheita na orofaringe (Figura 14).

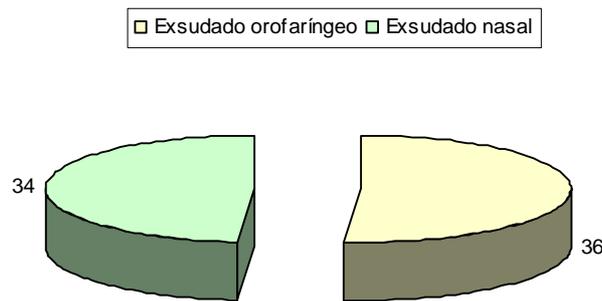


Figura 14 – Distribuição das amostras positivas por produto biológico.

Em todas as amostras estudadas, se obteve concordância fenotípica entre as diferentes metodologias utilizadas. Todas as colónias suspeitas de serem MRSA, isoladas a partir do meio de cultura (Gelose MRSA ID), foram positivas nos testes serológicos para detecção da PBP2', bem como, nos testes para detecção do factor de afinidade para o fibrinogénio e proteína A. Por outro lado, todos os isolados obtiveram uma CIM igual ou superior a 8 µg/ml para a oxacilina. Estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos noutros estudos (Lagacé-Wiens et al. 2008; Mímica e Mendes 2007).

Atendendo à proveniência da colheita, sexo e faixa etária, é de salientar, que nas faixas etárias dos 50-59 anos e 60-69 anos, só foram isoladas amostras positivas em indivíduos do sexo masculino. Nas restantes faixas etárias, o número de amostras positivas encontra-se distribuída por ambos os sexos. No entanto verifica-se, que o número de amostras positivas, nas faixas etárias compreendidas entre os 70-99 anos é maioritariamente masculino com excepção para as amostras da faixa etária dos 90-99 anos, de proveniência das vias aéreas superiores, em que se verifica maior número de isolados do sexo feminino de origem nasal (Figura15).

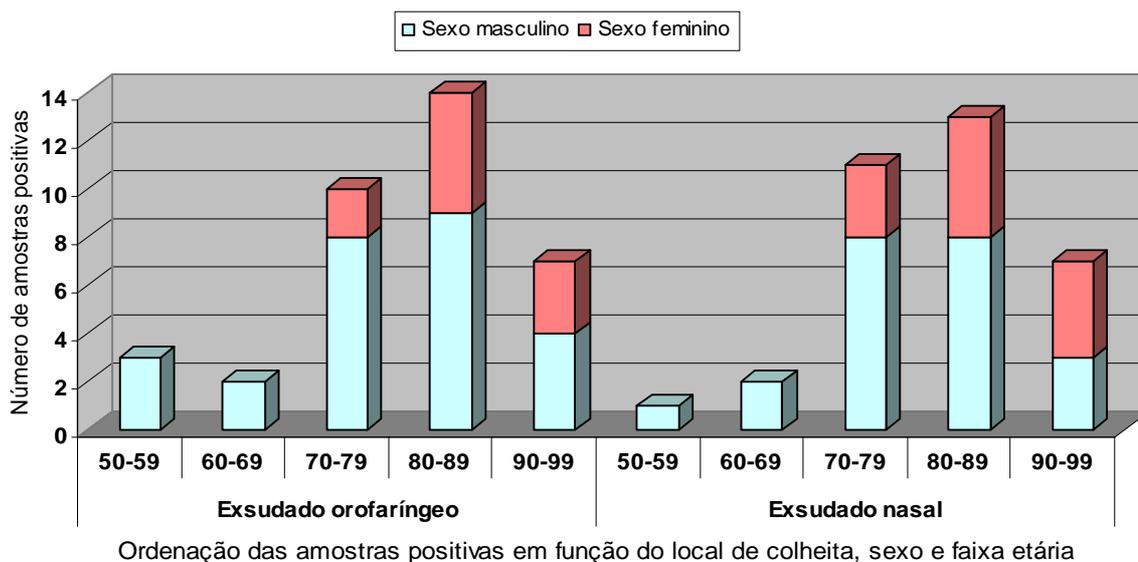
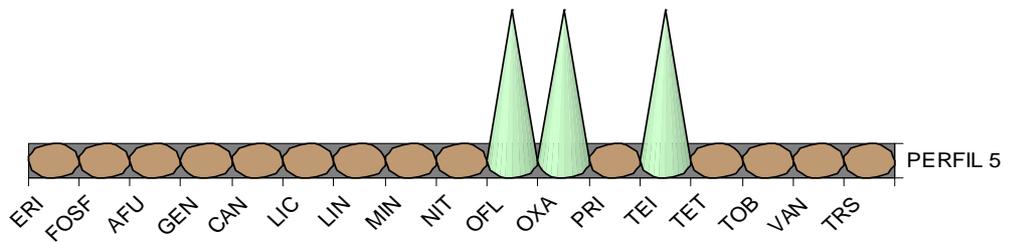
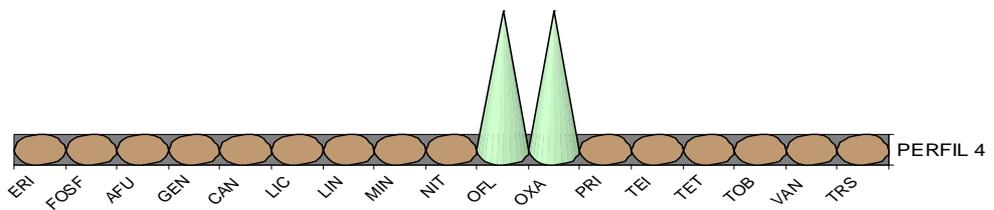
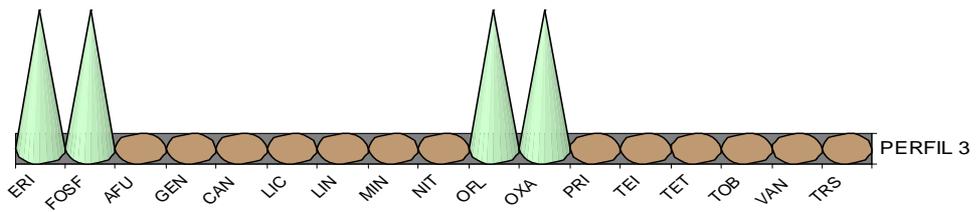
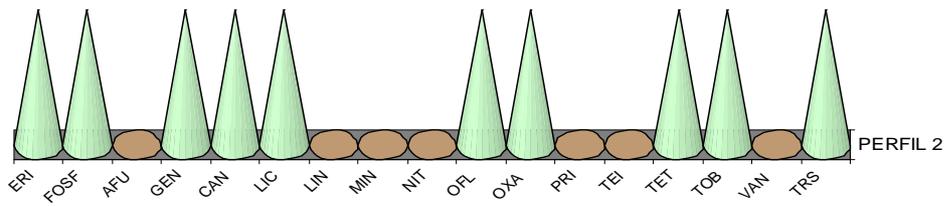
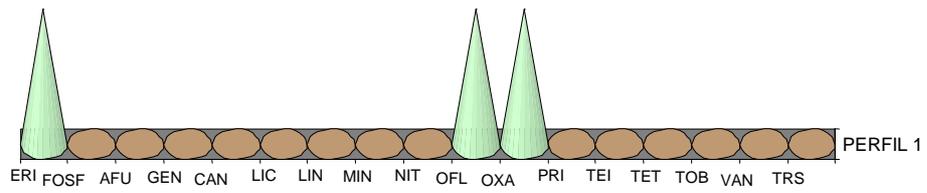


Figura 15 – Distribuição dos rastreios positivos de acordo com o produto biológico, idade e sexo dos indivíduos.

Estes resultados estão de acordo com vários estudos. Nomeadamente com um estudo realizado por Harbarth e colaboradores (2006) em que são descritos alguns factores de risco independentes para o rastreio, na altura da admissão associados ao sexo masculino (OR 1,9) e idade superior a 75 anos (OR 2,0), o que se verificou no presente estudo.

Outro estudo envolvendo rastreio nasal a 9.622 norte-americanos da comunidade, realizado entre 2001 e 2002, estimou uma prevalência nacional de *S. aureus* de 32,4% (IC95%: 30,7%-34,1%) e de MRSA de 0,8% (IC95%:0,4%-1,4%). Constatou, ainda, que a colonização por MRSA estava associada à idade superior ou igual a 60 anos e ao sexo masculino, mas não à exposição recente com cuidados de saúde (Kuehnert et al. 2006).

Na Figura 16 e 17 podemos observar os perfis de resistência (representados dos isolados positivos obtidos com a carta Vitek de Antibiograma Gram positivo GPS 539, utilizada na avaliação da Sensibilidade aos Antibióticos e pesquisa de β -Lactamases. Verificou-se a existência de 7 perfis de resistências, diferentes, neste estudo designados por Perfil 1,2,3,4,5,6 e perfil 7. Como esperado, em todos os perfis observou-se resistência à Oxacilina e Ofloxacina, característica dos *S. aureus* resistentes à meticilina, bem como positividade para a produção de β -Lactamases (anexo 5).



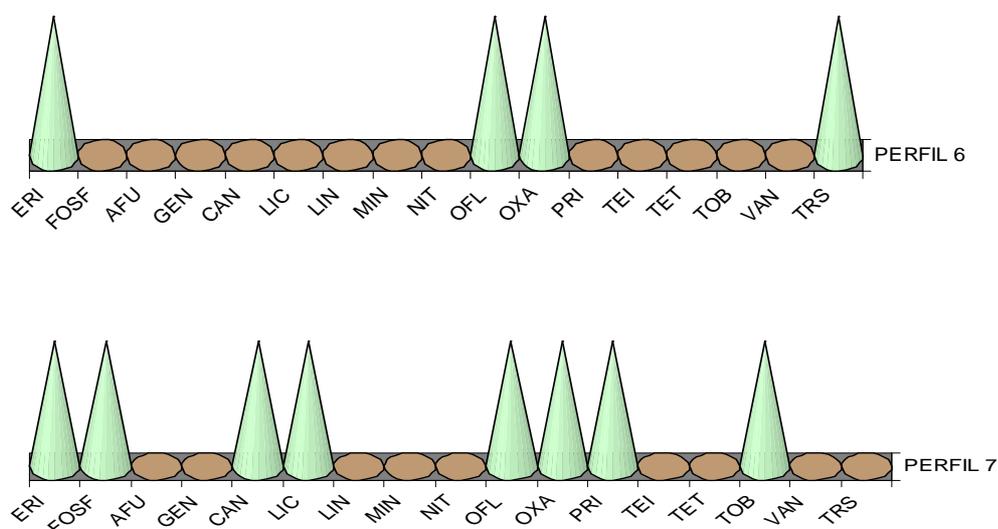


Figura 16 – Perfis de resistência aos antibióticos testados da carta Vitek de antibiograma Gram Positivo (GPS 539) encontrados nos isolados de estafilococos para MRSA estudados.

Nos isolados com Perfil 1, 54.2% (38 amostras), para além das resistências já mencionadas, observou-se resistência à Eritromicina; isolados com Perfil 2, 22.9% (16 amostras), observou-se resistência à Eritromicina, Fosfomicina, Gentamicina, Canamicina, Lincomicina, Tetraciclina, Tobramicina e Trimetropim-Sulfonamida; com Perfil 3, 4.3% (3 amostras), observou-se resistência à Eritromicina, e Fosfomicina; com Perfil 4, 14.3% (10 amostras), observou-se apenas, resistência à Oxacilina e Ofloxacina; com Perfil 5, 1.4% (1 amostra), observou-se resistência à Teicoplanina; com Perfil 6, 1.4% (1 amostra), observou-se resistência à Eritromicina e Trimetropim-Sulfonamida; com Perfil 7, 1.4% (1 amostra), observou-se resistência Eritromicina, Fosfomicina, Canamicina, Lincomicina, Pristamicina e Tobramicina.

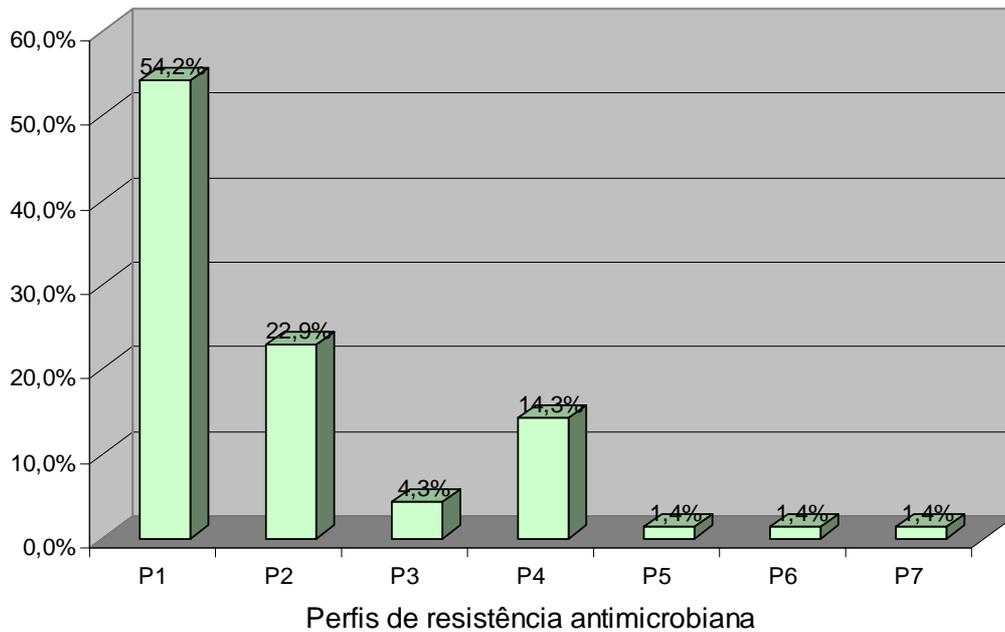


Figura 17 – Distribuição dos perfis encontrados nas amostras estudadas.

Segundo literatura disponível, os isolados incluídos no Perfil 2 (22.9%) e no Perfil 7 (1.4%), tendo em conta a resistência aos antibióticos, enquadra-se no grupo dos MRSA associados aos cuidados de saúde (HA-MRSA), os restantes perfis, no grupo associado à comunidade (CA-MRSA) (Flynn e Cohen. 2008).

Quanto aos rastreios positivos para MRSA, isolados de ambos os locais de colheita, é relevante o facto de quatro indivíduos (1 do sexo feminino e 3 do sexo masculino), serem portadores de MRSA com perfil diferente (anexo 5).

Hoje em dia o MRSA é considerado um problema de saúde pública em que a Vancomicina, Teicoplanina e os novos antibióticos (Quinupristina-dalfopristina e Linezolida) são os fármacos de eleição para estas estirpes multirresistentes (Sousa 2005).

Introduzida no mercado terapêutico em 1958, a Vancomicina, passou a ser a única alternativa terapêutica para o MRSA, uma vez que este é resistente a todos os β -lactâmicos, revelando também elevada resistência aos outros grupos de antibióticos. De facto, num estudo realizado em 2001, num universo de 3.051 isolados de *S. aureus* de 25 hospitais europeus, observou-se 87% de multirresistência para MRSA, com apenas 3% das estirpes de MRSA a serem resistentes somente aos β -lactâmicos (Fluit et al. 2001).

Na figura 18, encontram-se representados os antibióticos testados e o grupo a que pertencem. Como referido anteriormente, a resistência ao grupo dos antibióticos β -Lactâmicos e Quinolonas é de 100%. Segue-se o Grupo dos Macrólidos, com cerca de 83% de resistência à Eritromicina; Fosfomicina 30%; Lincozamidas e Aminoglicosídeos 22%, Tetraciclina 20%, Pristamicina 1.4% e por fim no grupo dos glicopeptídeos verifica-se a existência de 1.4% dos isolados resistentes à Teicoplanina. As percentagens obtidas para o grupo dos antibióticos β -Lactâmicos, Quinolonas e Macrólidos está de acordo com outros estudos efectuados em Hospitais Portugueses (Amorim et al.2007; Aires-de-Sousa et al.2008).

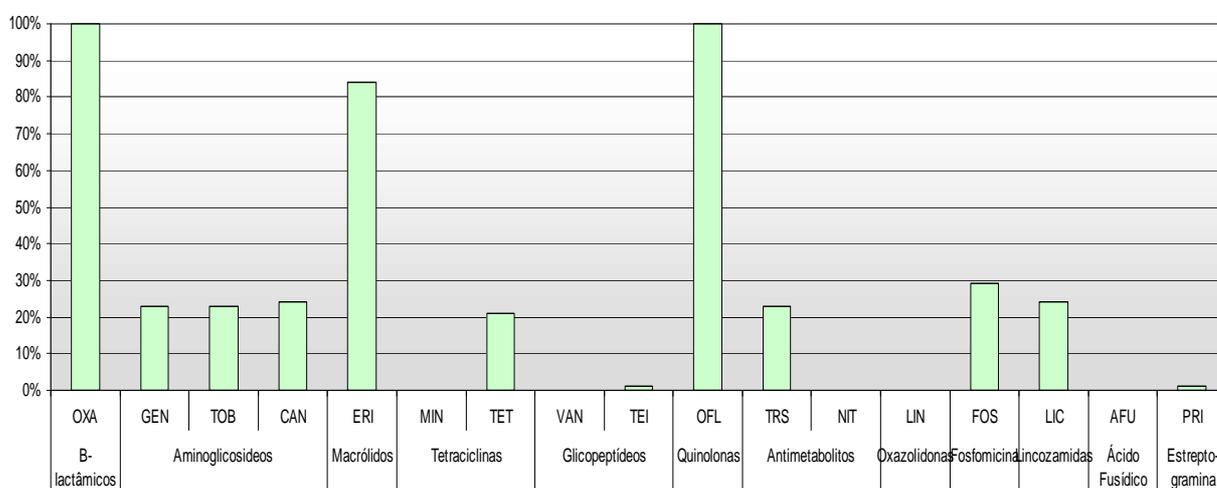


Figura 18 – Percentagem de resistências dos isolados estudados em função do antibiótico e ao grupo a que pertence.

No âmbito do sistema de vigilância norte-americano *National Nosocomial Infections Surveillance System* (NNIS) a taxa de MRSA, em doentes críticos no ano de 2003, foi de quase 60%, um aumento de cerca de 11% em comparação com a taxa média de resistência entre 1998 e 2002. Entre Janeiro de 1998 e Junho de 2004, a média da resistência à Meticilina foi de 52,9% para doentes críticos e 46% para doentes não críticos (NNIS 2004).

Por sua vez, Monnet e colaboradores (2004) relatam que vários estudos, descrevem a exposição às Cefalosporinas, Fluoroquinolonas e macrólidos como factor de risco para colonização ou infecção por MRSA. No seu estudo, a equipa de Monnet descreve, ainda,

um poderoso modelo estatístico que fornece uma forte evidência de relação temporal entre a utilização de antimicrobianos e a variação da prevalência de MRSA durante um surto num hospital na Escócia, nomeadamente a nível das três classes de antibióticos anteriormente referidas. Os resultados encontrados neste estudo relativamente aos Macrólidos e Quinolonas, estão de acordo com o relato destes autores.

Não se encontrou nenhum isolado resistente à Vancomicina. No entanto, é importante referir que a a Biomerieux[®], alerta para o facto de não se conhecer a capacidade da carta utilizada, para detectar a resistência do *S. aureus* à Vancomicina, devido à indisponibilidade de estirpes resistentes durante a realização dos testes comparativos.

Embora não exista nenhum caso de *Staphylococcus aureus* resistentes à vancomicina (VRSA) em Portugal, é importante referir que Gardete e colaboradores (2008), isolaram e estudaram o único caso de *Staphylococcus aureus* Intermédio à vancomicina (VISA) encontrado em Portugal, no Hospital e S. Marcos na cidade de Braga (Gardete et al 2008).

Noutros estudos, recentemente realizados em Portugal, constatou-se uma mudança significativa na Epidemiologia de MRSA em Portugal. De 1992 a 1994 o Clone Ibérico era dominante nos Hospitais Portugueses, representando cerca de 77% dos isolados de MRSA. Em 1995 observa-se a substituição deste Clone, pelo Clone epidémico Brasileiro de MRSA. O Clone epidémico Brasileiro, caracteriza-se por ser um Clone multiresistente, não só resistente a todos os antimicrobianos β -Lactâmicos, como, macrólidos, aminoglicosídeos, Tetraciclina, Antimetabolitos entre outros. Actualmente nos hospitais Portugueses, o Clone designado por EMRSA-15, assume a liderança desde 2001. Trata-se de um Clone menos resistente. É, por norma, resistente a todos os antimicrobianos β -Lactâmicos e excepcionalmente, a outros grupos e sensível à Gentamicina e Trimetropim-Sulfonamidas (Amorim et al. 2007; Aires-de-Sousa et al. 2008).

6 - CONCLUSÃO

A realização de rastreios hospitalares, é uma importante ferramenta na vigilância epidemiológica activa de MRSA, na medida em que permite a identificação dos doentes colonizados por este microrganismo, com o intuito de adoptar de imediato, precauções de contacto (isolamento e descolonização) evitando assim a disseminação e transmissão deste microrganismo, a outros doentes e profissionais de saúde.

Por isso, a realização destes estudos, ainda que acarretem alguns custos, são uma mais-valia, na redução das taxas de morbilidade e mortalidade associadas ao MRSA, dando um importante contributo na melhoria contínua da qualidade dos cuidados de saúde prestados.

Verificou-se, que a metodologia e as técnicas utilizadas neste estudo, foram adequadas na medida em que os objectivos foram alcançados.

Como se pode observar pelos resultados obtidos, este estudo vem reforçar a necessidade de efectuar colheitas em pelo menos dois locais anatómicos distintos. Com este procedimento, eleva-se a probabilidade de isolamento de MRSA nos indivíduos rastreados.

Adicionalmente constatou-se um elevado número de *S. aureus* multirresistentes, designados neste estudo por Perfil 2, tendo em conta o perfil de resistência aos antibióticos testados. No total de MRSA estudados, 22.9% pertencem a este perfil de *S.aureus* resistentes aos β -Lactâmicos, Macrólidos, Quinolonas, Aminoglicosídeos, Tetraciclina entre outros, características de MRSA associados aos cuidados de saúde (HA-MRSA) As resistências exibidas pelos outros perfis, parecem ser sugestivas de MRSA adquiridos na comunidade (CA-MRSA). No entanto só o poderemos afirmar após confirmação, por métodos de epidemiologia molecular, que nos permitirão verificar se os diferentes perfis de multirresistência encontrados neste estudo, correspondem a linhagens bacterianas distintas ou não. Só assim saberemos se estamos perante diferentes clones de MRSA e qual a sua origem. Os isolados encontram-se, conservados para futuramente se proceder à sua caracterização molecular, de onde poderão sair as respostas para as hipóteses acima referidas.

Encontrar essas respostas, será uma mais-valia no esclarecimento da epidemiologia de MRSA em Portugal.

7 - BIBLIOGRAFIA

- Aires-de Sousa M,Correia B, de Lencastre H, Multilaboratory Project Collaborators. 2008. Changing patterns in frequency of recovery of five methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Portuguese hospitals: surveillance over a 16-year period. 2008. *J. Clin. Microbiol.* 46(9):2912–7.
- Amorim M.L., Faria NA, Oliveira DC, Vasconcelos C, Cabeda JC, Mendes AC, Calado E, Castro AP, Ramos MH, Amorim JM, de Lencastre H. 2007. Changes in the clonal nature and antibiotic resistance profiles in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with the spread of EMRSA-15 clone in a tertiary-care Portuguese hospital. *J. Clin. Microbiol.* 45:2881–2888.
- Azevedo PA, Souza AG, Santos AF, Sales T, Neto TC, Pignatari AC. 2007. Susceptibilidade à novobiocina na identificação de amostras de *Staphylococcus aureus* coagulase negativos isolados de hemoculturas. *RBAC*.39 (4): 303-304.
- Barber M.1961. Methicillin-resistant *Staphylococci*. *J. Clin Pathol* : (14) 385-393.
- Baron EJ e Finegold SM.1990. *Diagnostic Microbiology*. Bailey & Scotts 8th Edition. pp 323-330.
- Bootsma MCJ, Hota B, Diekman O, Weinstain RA, Bonten A. 2006. A mathematical model to determine the growth rate of ca-mrsa and options for control. 2006. abstract no: K-1680. 46th ICAAC.
- Canton F, Losa H, Morosini MI, Baquero F. 2002. Antimicrobial resistance amongs isolates of *Streptococcus Pyogenes* and *Staphylococcus aureus* in the PROTEKT antimicrobial surveillance programme during 1999-2000. *Journal of Antimicrobial Chemoterapy* 50: Suppl.SI, 9-24.

- Chambers HF.1997. Methicillin Resistance in Staphylococci: Molecular and Biochemical Basis and Clinical implications. *Clinical Microbiology Reviews*, 10 (4): 781-791.
- Chambers HF. 2001. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? *Emerg Infect. Dis.*7:178-82.
- Crisóstomo MI, Westh H, Tomasz A, Chung M, Oliveira DC, de Lencastre H. 2001. The evolution of methicillin-resistant in *Staphylococcus aureus*: Similarity of genetic backgrounds in historically early methicillin- susceptible and – resistant isolates and contemporary epidemic clones.2001. *PNAS* 98: 17:9865-9870.
- Cristino JM. 2000. *Staphylococcus* In: Ferreira WFC, Sousa JFC. *Microbiologia*. Lidel. Vol2. Cap.2:239-49.
- Cristino JM, Fernandes ML, Garcia T, Serrano N, Salgado MJ. 1999. The diversity of *Staphylococcus aureus* strains isolated in a Lisbon hospital over a 4-year period. *Act Med Port*. Apr-Jun; 12(4-6):169-76.
- De Lencastre H, Oliveira D, Tomasz A. 2007. Antibiotic resistant *Staphylococcus aureus*: a paradigm of adaptive power. *Curr Opin Microbiol*.10 (5):428-35.
- Diekema DJ; Pfaller MA; Schmitz FJ; Smayevsky,JB; Jones,RN; Beach M and the SENTRY Group. 2001. Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States,Canada, Latin America, Europe and the Western Pacific Region for the SENTRY antimicrobial surveillance program, 1997-1999. *Clin Infect Dis*. 32 (Suppl 2): S114-32.
- Eveillard M; de Lassence,A; Lancien E; Barnaud G; Ricard,JD; Joly-Guillou ML. 2006. Evaluation of a strategy of screening multiple anatomical sites for methicillin resistant *Staphylococcus aureus* at admission to a teaching hospital.*Infect. Control Hosp Epidemiol*. 27(2):181-4.

- Falcone M, Campanile F, Gianella M, Borbone S, Stefani S, Venditi M. 2007. Staphylococcus haemolyticus endocarditis: clinical and microbiologic analysis of 4 cases. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 57 (3): 325-31.
- Faria NA, Carriço JA, Oliveira DC, Ramirez M, de Lencastre H. 2008. Analysis of Typing Methods for Epidemiological Surveillance of both Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible Staphylococcus aureus Strains.2008. *Journal of Clinical Microbiology.*46 (1):136-144.
- Farr BM. 2004. Prevention and control methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections. *Curr OP Infect Dis.* 17: p.317-22.
- Fluit,AC; WieldersCL; Verhoef,J; Schmitz FJ. 2001. Epidemiology and susceptibility of 3,051 Staphylococcus aureus isolates from 25 university hospitals participating in the European SENTRY study. *J Clin Microbiol.* 39(10):3727-32.
- Flynn N, Cohen SH. 2008. The Continuing Saga of MRSA. *The Journal of Infectious Diseases.* 197:1217-9.
- Gardete S, Aires-De-Sousa M, Faustino A., Ludovice A.M, de Lencastre H. 2008. Identification of the First Vancomycin Intermediate-Resistant Staphylococcus aureus (VISA) Isolate from a Hospital in Portugal *Microbial Drug Resistance V(14), Number 1.*
- Goetghebeur M, Landry PA, Han D, Vicent C. 2007. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus: A public health issue with economic consequences. *Can. J.Infect Dis Med Microbiol.*18 (1):27-34.
- Hageman JC, Patel JB; Carey RC, Tenover FC, Mcdonald LC. 2006. Investigation and control af Vancomycin-intermediate and-resistant Staphylococcus aureus: A Guide for Health Departments and Infection Control Personnel. Available from: www.cdc.gov/ncidod/dhpg/ar_visavrsa_prevention.html

- Harbarth S; Sax H; Frankhauser-Rodriguez, C; Schrenzel, J; Agostinho, A; Pittet, D. 2006. Evaluating the probability of previously unknown carriage of MRSA at hospital admission. *Am J Med.* 119(3): 275.e15-23.
- Harbarth S, Sax H, Uckay I, Fankhouser C, Agostinho A, Christenson JT, Renzi J, Schrenzel J, Pittet D. 2008. A predictive model for identifying surgical patients at risk of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage on admission. *J Am Coll Surg.* 207 (5):683-9.
- Hartstein A I; Sebastian T J; Straubaugh L J. 2004. "Methicillin- Resistant *Staphylococcus aureus*" In: C. Glen MAYHALL, ed. *Hospital Epidemiology and Infection Control.* 3ª Edição. Filadélfia: Lippincott Willians & Wilkins.
- Health Protecction Agency. 2007. Investigation of Specimens for Screening for MRSA. National Standard Method BSOP 29Issue 5. p.2-24. Available from: http://www.hpa-standardmethods.org.uk/pdf_sops.asp.
- HELICS. 2006. Hospital In Europe Link for Infection Control through Surveillance [online] Universidade de Lyon - França.Acessível em: <http://helics.univ-lyon1.fr/helicshome.ht>
- Hiramatsu K. 2001. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of 1997, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Clinical Strain With reduced vancomycin susceptibility. *J Antimicrobiol Chemother.,* (40):135-136. www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi
- Huang, SS; Platt, R. 2003. Risk of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection after previous infection or colonization. *Clin Infect Dis.* 36(3):281-5.
- Köhler T, Pechére JC, Plésiat P. 1999. Bacterial antibiotic efflux systems of medical importance. *Cell. Moll.Life. Sci.* 56:771-778.

- Kramer A, Schebke I, Kampf G. 2006. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infect Dis.* 6: 130 Published online 2006 August 16. doi: 10.1186/1471-2334-6-130 <http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>

- Kuehnert MJ; Kruszon-Moran, D; Hill, HA; McQuillan, G; McAllister, SK; Fosheim, G; McDougal, LK; Chaitram, J; Jensen, B; Fridkin, SK; Killgore, G; Tenover, FC. 2006. Prevalence of *Staphylococcus aureus* nasal colonization in the United States, 2001-2002. *J Infect Dis.* 193(2):172-9.

- Lagacé-Wiens PRS, Alfa MJ, Manickam K, Harding GKM. 2008. Reductions in Workload and Reporting Time by use of MRSA Screening With MRSAselect Medium Compared to Mannitol- Salt Medium Supplemented with Oxacillin. *Journal of Clinical Microbiology.* April, P 1174-1177.

- Larsen AR, Stegger M, Bocher S, Sorum M, Monnet DL, Skov RL. 2008. Emergence and Characterization of community associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in Denmark, 1999-2006. *J Clin Microbiol.*

- Lowy, D.F. 2003. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Invest.*, v.4, 111, p. 1265-1273.

- Manian, FA; Senkel, D; Zack, J; Meyer, L. 2002. Routine screening for methicillin resistant *Staphylococcus aureus* among patients newly admitted to an acuterehabilitation unit. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 23(9):516-9.

- Manzur A, Gavalda L, Ruiz GE, Mariscal D, Dominguez MA, Perez JL, Segura F, Pujol M, Group of the Spanish Network for research in Infectious Diseases. 2008. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and factors associated with colonization among residents in community long-term-care-facilities in Spain. *Clin. Microbiol. Infect.* 14 (9):867-72.

- Marschall J, Mühlemann K. 2006. Duration of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage, according to risk factors for acquisition. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 27 (11): 1206-12.

- Mato R, Santos SI, Venditti M, Platt DJ, Brown A, Chung M, de Lencastre H. 1998. Spread of the multiresistant Iberian clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) to Italy and Scotland. *Microb Drug Resist.* 4(2): 107-12.

- Melo-Cristino,J; Alves AF; Amorim JM; Diogo j; Lito LM; Lopes,P; Marques J;Marques,T; Martins F; Monteiro L; Nascimento I; Pessanha MA; Piedade J; Ramos MH; Ribeiro G; Rodrigues,A; Salgado MJ; Sobral L; Spencer O. 2006. Estudo multicêntrico de resistência aos antimicrobianos em nove hospitais portugueses Comparação de resultados num intervalo de uma década. *Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas.* Set - Dez 2006 .

- Melo-Cristino J; Marques-Lito L; Pina, E. 2002. The control of hospital infection in Portugal. *J Hosp Infect.* 51(2): 85-8.

- Melter O, Sanches IS, Shindler J, Sousa MA, Mato R, Kovárova V, Zemlicková H, de Lencastre H. 1999. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clonal Types in the Czech Republic. *Journal of Clinical Microbiology.*37: P.2798-2803.

- Mimica MJ, Mendes CM. 2007. Diagnóstico laboratorial da resistência à oxacilina em *Staphylococcus aureus*. *J Brasil Patol Med Lab.*43 (6):p.399-406.

- Monnet, DL; MacKenzie, FM; Lopez-Lozano, JM; Beyaert, A; Camacho, M; Wilson, R;Stuart, D; Gould, IM. 2004. Antimicrobial drug use and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Aberdeen, 1996-2000. *Emerg Infect Dis.* 10(8):1432-41.

- Murray, P.R.; Baron, E.J.; Jorgensen, J.H.; Tenover, M.A. 2003 Tenover; R.H. *Staphylococcus; Micrococcus; and Other Catalase-Positive Cocci that Grow Aerobically.* In: *Manual of Clinical Microbiology*; 8th edition; ASM Press; 1: 384-404.

- Murray PR, Tenover KS, Tenover MA. 2006. *Microbiologia Médica.* Elsevier 22: P. 215-229.

- Nakatomi Y; Sugiyama J. 1998. A rapid latex agglutination assay for the detection of penicillin- binding-protein 2'. *Microbiol. Immunol.*42 (11): p739-743.

- Nilsson P e Ripa T. 2006. *Staphylococcus aureus* Throt Colonization is More Frequent Than Colonization in the Anterior Nares. *Journal of Clinical Microbiology*. 44(9): p. 3334-3339.

- NHS. Investigation of Specimens for Screening for MRSA. 2007. BSOP 29. Issued by Standards Unit, Evaluations and Standards Laboratory. Available from: www.evaluations-standards.org.uk

- NNIS. 2004. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. *Am J Infect Control*. 32(8):470-85.

- Norazha A, Liew SM, Kamel AGM, Koh YT, LIM VK. 2001. DNA Fingerprinting Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* by Pulsed-Field Gel Electrophoresis(PFGE): Comparision of Strains from 2 Malaysians Hospitals. *Singapore Med J*. 42 (1): 015-019.

- Oliveira DC, Crisóstomo I, Sanches IS, Major P, Alves CR, Sousa MA, Thege MK; de Lencastre H. 2000. Comparision of DNA Sequencing of the Protein A Gene Polymorphic Region with other Molecular Typing Techniques for Typing Two Epidemiologically Diverse Collections of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. 2000. *Journal of Clinical Microbiology*.39 (2): p.574-580.

- Oliveira DC, Tomaz A, De Lencastre H. 2002. Secrets of successe of a human pathogen:molecular evolution of pandemic clones of methicillin-resistance *staphylococcus aureus*. *Lancet. Infect. Dis*.2 (3): 180-9.

- Park SH, Park C, Yoo JH, Choi SM; Choi JH, Shin HH, LEE DG, Lee S, Kim J, Choi SE, Kwon YM, Shin WS. 2009. Emergence of community- associated methicillin-resistant *staphylococcus aureus* straims as a cause of healthcare-associated bloodstream infections in Korea. *Infect Control Hosp. Epidemiol*.30 (2).146-55.

- Paule SM, Hacek DM, Kufner B; Truchon K, Thomson RB, Robicsek A, Peterson LR. 2007. Performance of the BD GeneOhm Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Test before and during High-Volume Clinical Use. *Journal of Clinical Microbiology* 45 (9): 2993-2998.

- Piteira C. 2007. A Qualidade do Ar Interior em Instalações Hospitalares. Lidel.1º Ed., p. 63-65.

- PNCl. 2004. Ministério da Saúde. Instituto Nacional Dr. Ricardo Jorge. Programa Nacional de Controlo de Infecção. Recomendações para controlo do ambiente. Princípios básicos. Available from: <http://www.dgs.pt/upload/membro.id/ficheiros/i008551.pdf>

- PNCl. 2005. Ministério da Saúde. Instituto Nacional Dr. Ricardo Jorge. Programa Nacional de Controlo de Infecção. Relatório do Inquérito de Prevalência de Infecção 2003. Available from: [http:// www.dgs.pt / pnci@insa.min-saude.pt](http://www.dgs.pt/pnci@insa.min-saude.pt)

- PNCl. 2004c. Ministério da Saúde. Instituto Nacional Dr. Ricardo Jorge. Programa Nacional de Controlo de Infecção. Orientações para elaboração de um manual de boas práticas em microbiologia. Available from: <http://www.dgs.pt/upload/membro.id/ficheiros/i008546.pdf>

- Ratnaraja NV, Hawkey PM. 2008. Current challenges in treating MRSA: What are the options? Expert Rev Anti Infect Ther.6 (5):601-18.

- Saunders A, Panaro L, McgeerA, Rosenthal A, White D, Willey BM, Gravel D, Bontovics E, Yaffe B, Katz K. 2007. A nosocomial outbreak of community-associated methicillin-resistant staphylococcus aureus among healthy newborns and postpartum mothers. Can J Infect Dis 18(2):128-32.

- Sherertz RJ, Bassetti S, Wiss BB. 2001. “Cloud ” Health-Care Workers. 7(2): 241-244.

- Sousa JC. 2005. Manual de Antibióticos Antibacterianos. Ed. Universidade Fernando Pessoa.

- Sousa JC, Peixe LV, Ferreira H, Pinto ME, Nascimento MSJ, Sousa MI, Cabral M. 1998. Antimicrobianos In: Ferreira WFC, Sousa JFC. Microbiologia. Lidel. Vd 1 Cap.12:240-44.

- Strandén AM, Frei R, Adler H, Flückiger U, Widmer AF. 2008. Emergence of SCCmec Type IV as the most common Type Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in a University Hospital. *Infection* 2009; 37: 44–48.
- Skov, R; SSAC MRSA Working Party. 2005. MRSA infections increasing in the Nordic countries. *Euro Surveill.* 10(8): E050804.2.
- Szackcs TA, Toye B, Turnbull JM, Muckle W, Roth VR. 2007. Prevalence methicillin-resistant *staphylococcus aureus* in a Canadian inner-city Shelter. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 2007; 18(4): 249-252.
- Tenover FC. 1997. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.*, v.18, p.426-439.
- Trindade PA, McCulloch JA, Oliveira GA, Mamizuka EM. 2003. Molecular Techniques for MRSA Typing: Current Issues and Perspectives. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases.* 7(1): 32-43.
- Tristan A, Tristan F, Durand G, Dauwalder O, Bes M, Lina G, Vandenesch F, Etienne J. 2007. Virulence determinants in community and hospital methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Hospital Infection* 65(S2):105-109.
- Vandenberg MFQ, Yzerman EPF, Belkam AV, Boelens HAM, Sijmons M, Verbrugh HA. 1999. Follow-Up of *Staphylococcus aureus* Nasal Carriage after 8 Years: Redefining the Persistent Carrier State. *Journal of Clinical Microbiology.* 37: p.3133-3140.
- Walsh C. 2000. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature.* 406:775-781.
- Walker JT, Hoffman P, Bennet AM, Vos MC, Thomas M, Tomlinson N. 2007. Hospital and community acquired infection and the built environment- design and testing of infection control rooms. *Journal of Hospital Infection.* 65(52): 43-49.

- Wernitz MH, Keck S, Swidsinski S, Schulz S, Veit K. 2005. Cost analyses of a Hospital-wide selective screening programme for methicillin-resistant staphylococcus aureus (MRSA) carriers in the context of diagnosis related groups (DRG) payment. *Clin Microbiol Infect*; 11: 466-471.
- Williams RV, Callary S, Verncombe M, Simor AE. 2009. The role of colonization pressure in nosocomial transmission of methicillin-resistant staphylococcus aureus. *Am J Infet Control*; 37:106-10.

Anexos

REF 43 451 / 43 459

12806 B - PT - 2005/01

Gelose MRSA ID (MRSA)

IVD

Meio cromogénico para a pesquisa e a identificação dos *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina (SARM)**INTRODUÇÃO E OBJECTIVO DO TESTE**

A gelose MRSA ID é um meio cromogénico que se destina à pesquisa e à identificação dos *S. aureus* resistentes à metilina (SARM) em amostras de origem humana (1, 7).

Os SARM são bactérias multi-resistentes que podem ser responsáveis por infecções nosocomiais (3, 4, 9). A detecção dos portadores de SARM é particularmente importante para a prevenção e o seguimento epidemiológico destas infecções. Neste contexto, a utilização da gelose MRSA ID contribui para a vigilância activa dos SARM.

PRINCÍPIO

A gelose MRSA ID é constituída por uma base nutritiva rica que associa diferentes peptonas. Contém também um substrato cromogénico de α -glucosidase e um antibiótico (cefotina) que permite (2, 6):

- O crescimento dos estafilococos resistentes à metilina (SARM) incluindo as estirpes/cepas hetero-resistentes.
- A detecção directa das estirpes/cepas SARM através da revelação da actividade α -glucosidase (patente registada): colónias verdes.

A mistura selectiva permite inibir a maioria das bactérias que não pertencem ao género *Staphylococcus*, bem como as leveduras.

APRESENTAÇÃO

Meios prontos a usar:	
REF 43 451	Embalagem de 20 placas (90 mm)
REF 43 459	Embalagem de 10x10 placas (90 mm)
MRSA *	

* impresso em cada placa

COMPOSIÇÃO**Fórmula teórica:**

Este meio pode ser ajustado e/ou suplementado em função dos critérios de qualidade impostos:

Peptonas vegetais e animais (porcinas ou bovinas)	20,1 g
Tris	0,65 g
Mistura cromogénica	0,4 g
Mistura selectiva	4,1 g
Agar	13 g
Água destilada	1 000 ml

pH 7,3

MATERIAL NECESSÁRIO MAS NÃO FORNECIDO

- Estufa de bacteriologia.

PRECAUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

- Somente para uso em diagnóstico *in vitro*
- Unicamente para uso profissional
- Este dispositivo contém componentes de origem animal. O controlo da origem e/ou do estado sanitário dos animais não pode garantir de maneira absoluta que estes produtos não contenham nenhum agente patogénico transmissível, é recomendado manipulá-los com as precauções de utilização relativas aos produtos potencialmente infecciosos (não ingerir, não inalar).

- As amostras, culturas bacterianas e produtos semeados devem ser considerados potencialmente infecciosos e manipulados de maneira apropriada. As técnicas assépticas e as precauções habituais de manipulação para o grupo bacteriano estudado devem ser respeitadas durante toda a manipulação; consultar o "NCCLS M29-A, *Protection of Laboratory Workers from Instrument Biohazards and Infectious Disease Transmitted by Blood, Body Fluids, and Tissue; Approved Guideline* – Revisão em vigor". Para informações complementares sobre as precauções de manipulação, consultar o "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories - CDC/NIH – Última edição", ou a regulamentação em vigor no país de utilização.
- Os meios de cultura não devem ser utilizados como materiais ou componentes de fabrico.
- Não utilizar os reagentes após a data de validade.
- Não utilizar os reagentes se a embalagem estiver danificada.
- Não utilizar placas contaminadas ou desidratadas.
- A utilização do meio pode ser delicada para as pessoas com dificuldades na apreciação de cores.
- A interpretação dos resultados do teste deve ser efectuada tendo em conta os aspectos macro e microscópicos e, eventualmente, os resultados de outros testes.
- O comportamento funcional apresentado foi obtido com o procedimento indicado neste folheto informativo. Qualquer desvio de procedimento pode alterar os resultados.

CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO

- As placas conservam-se entre 2° C e 8° C dentro da embalagem até à data de validade.
- O prazo de conservação das placas fora da embalagem, em saqueta/sachet de celofane, é de 2 semanas a 2° - 8° C, ao abrigo da luz.

AMOSTRAS

As amostras têm origens diferentes (principalmente: nariz, garganta, períneo, virilha...). São semeadas directamente na gelose ou após enriquecimento em caldo.

É conveniente respeitar as boas práticas em termos de colheitas/coletas e de transporte, adaptadas a cada tipo de colheita/coleta.

PROCEDIMENTO

1. Deixar as placas atingir a temperatura ambiente.
2. Semear a gelose MRSA ID directamente com as amostras.
O meio pode também ser semeado com um caldo de enriquecimento.
3. Incubar na estufa, com a tampa para baixo, a 37°C em aerobiose. As culturas são examinadas, geralmente, após 18 a 24 horas de incubação.
Em caso de resultado negativo (ausência de crescimento ou de coloração), o meio deve ser incubado durante mais 24 horas suplementares.
A escolha da temperatura de incubação é da responsabilidade do utilizador em função da aplicação e das normas em vigor.

SLIDEX® MRSA Detection

SLIDEX® MRSA Detection é um teste rápido de aglutinação de partículas de latex que permite a detecção da resistência à metilicina das estirpes/cepas de *Staphylococcus aureus* por detecção da PBP2^a (penicillin-binding protein 2).

INTRODUÇÃO E OBJECTIVO DO TESTE

O aparecimento cada vez mais frequente de infecções graves (septicémias, endocardites...) por *Staphylococcus aureus* resistentes à metilicina (MRSA) observada em meio hospitalar, tornou-se um grave problema. O sucesso de um tratamento anti-microbiano apropriado, é crucial neste tipo de infecções. Mas os métodos convencionais de diagnóstico (PCR, E-test, MRSA) são muito caros e o preço dos discos não são suficientemente sensíveis. Estudos recentes demonstraram que para identificar os MRSA, é preferível detectar directamente o gene que codifica a resistência à metilicina (MeccA) ou ainda o seu produto de expressão, a proteína PBP2^a (1, 2, 3). O SLIDEX® MRSA Detection é um teste rápido de aglutinação de partículas de latex que permite a detecção da resistência à metilicina das estirpes/cepas de *Staphylococcus aureus* através da detecção da PBP2^a por um método imunológico, vigilância epidemiológica e investigação (4, 5, 6).

PRINCÍPIO

As partículas de latex sensibilizadas com um anticorpo monoclonal dirigido contra a PBP2^a vão reagir após extração especificamente com os MRSA e observase uma aglutinação, visível a olho nu.

As estirpes/cepas de *Staphylococcus aureus* sensíveis à metilicina (MSSA) não aglutinam as partículas de latex.

COMPOSIÇÃO DA EMBALAGEM PARA 50 TESTES

R1	Latex sensibilizado (pronto a usar)
R2	Frasco controlado por um anticorpo monoclonal anti-PBP2 ^a (rato)
R3	Azida sólica 0,1 g/l
R4	Latex controlado negativo (pronto a usar)
R5	Azida sólica 0,1 g/l
R6	Reagente de extração 1 (pronto a usar)
R7	Solução de NaOH 0,1 mol/l
R8	Reagente de extração 2 (pronto a usar)
R9	Solução de K ₂ H ₂ P ₂ O ₄ 0,5 mol/l
R10	30 cartões descartáveis
R11	1 folheto informativo

*Homogeneizar correctamente os reagentes antes de utilização.

MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

- Micropipeta e pontas (50 µl).
- Tubos para microcentrifugação.
- Ansa de microbiologia de 1,5 µl (1 mm de diâmetro interno) ou de 1 µl (0,91 mm de diâmetro interno).
- Banho-maria a ferver ou bloco de aquecimento (2-8°C).
- Célula de micro-centrifuga.
- Agitador rotativo (facultativo).
- Agitador de tipo Vortex.

PRECAUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

- Somente para uso em diagnóstico *in vitro*.
- Únicamente para uso profissional.
- Este dispositivo contém derivados de origem animal. O controlo da origem e do estado sanitário dos animais não pode garantir de forma absoluta que estes produtos não contenham nenhum agente patogénico transmissível, é aconselhado manipulá-los com as precauções de utilização relativas aos produtos potencialmente infecciosos (não ingerir, nem inalar).
- As amostras, culturas, microorganismos e produtos sensados devem ser considerados potencialmente infecciosos e tratados de acordo com as técnicas, assépticas e as precauções habituais de manipulação para o grupo bacteriano estudado devem ser respeitadas durante toda a manipulação, consultar o "CLINICAL M29-A, Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections, Approved Guideline - Revisão em vigor". Para informações complementares sobre as precauções de manipulação, consultar o "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 3ª edição, 2008, ou a regulamentação em vigor no país de utilização.
- Não utilizar os reagentes após a data de validade indicada na etiqueta da embalagem.
- Evitar o contacto com os olhos, a pele ou com a roupa.
- Não inverter ou misturar os reagentes de lotes diferentes.
- Não pipetar os reagentes com a boca.
- Não voltar a usar as cartões descartáveis.
- Os reagentes da embalagem contém um conservante (azida sólica), susceptível de reagir com as canalizações de chumbo ou de cobre dos lavatórios, formando azidas metálicas explosivas. É aconselhável passar por água qualquer produto de rejeição.
- Utilizar apenas estirpes/cepas previamente identificadas como *Staphylococcus aureus*.
- Utilizar apenas colónias isoladas em gelose de sangue.
- Coltear/coltear apenas as colónias a partir de uma cultura pura.
- Efectuar uma replicagem se a primeira placa não tiver resultado positivo para o teste.
- Não contaminar os reagentes tocando na amostra com a ponta do frasco de reagentes.
- Entressar correctamente as tampas dos frascos dos reagentes após utilização para prevenir qualquer contaminação e desidratação.
- Respeitar o tempo de aquecimento (3 minutos) e a temperatura (de 95°C a 100°C).

Método de aglutinação do latex :

1. Deixar os reagentes à temperatura ambiente (18-25°C) antes de utilização.
2. Colocar correctamente em suspensão os reagentes latex. Retirar as bolhas retidas nos conta-gotas.
3. Escolher e marcar dois círculos da carta por amostra, um para testar o Latex sensibilizado (R1) e outro para testar o Latex controlado negativo (R2).
4. Adicionar uma gota de Latex sensibilizado (R1) no círculo teste e depois colocar 50 µl de amostra. Realizar correctamente a utilização do círculo teste e distribuir a amostra uniformemente no círculo. Ter atenção ao segurar nos frascos conta-gotas verticalmente durante a distribuição das gotas.
5. Do mesmo modo, adicionar uma gota de Latex controlado negativo (R2) no círculo controle e depois colocar 50 µl de amostra. Misturar tudo bem usando um outro bastonete distribuído a mistura em toda a superfície do círculo.
6. Dar à carta um ligeiro movimento rotativo manualmente ou utilizando um agitador durante 3 minutos para observar o aparecimento eventual de uma aglutinação.

CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO

- Conservar os reagentes a 2°-8°C.
- Não congelar os reagentes.
- Se os reagentes tiverem sido congelados acidentalmente, não devem ser utilizados.
- Todos os componentes permanecem estáveis até a data da validade indicada na etiqueta da embalagem, se forem conservados nas condições exigidas.

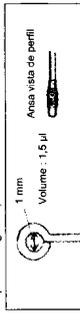
AMOSTRAS (preparação)

Utilizar colónias identificadas como *S. aureus* após um crescimento de 18-24 horas a 33°-37°C em placas de gelose de sangue.

PROCEDIMENTO

Método de extração da PBP2^a :

1. Colocar 4 gotas do Reagente de Extração 1 (R3) num tubo para micro-centrifuga.
2. Encher completamente o interior de 2 aneis de microcentrifuga com 1 ml (10,91 mm de diâmetro interno) com colónias isoladas e retirar o excedente esfregando a ansa na superfície da gelose (consultar esquema seguinte).



Colocar cada ansa cheia de bactérias no tubo para micro-centrifuga contendo o reagente R3 e homogeneizar vigorosamente até que as células se soltem da ansa.

Notas :

- O centro da ansa deve ser inteiramente coberto de bactérias. A quantidade total de colónias necessária para efectuar o teste varia de 5 a 30 colónias segundo o tamanho da ansa.
- A quantidade total de células deve corresponder a uma concentração de células bacterianas que vai de 1.5×10^8 a 4×10^9 no tubo para micro-centrifuga.
- Tapar o tubo e colocá-lo em banho-maria a ferver ou num bloco de aquecimento a uma temperatura compreendida entre 95°C e 100°C e aquecer durante 3 minutos (não ultrapassar 5 minutos).
- Retirar o tubo e deixar arrefecer à temperatura ambiente.
- Adicionar uma gota do Reagente de Extração 2 (R4) no tubo e homogeneizar correctamente a suspensão.
- Centrifugar a 1500 g durante 5 minutos, ou seja 3000 rpm num raio de rotação de 15 cm ou 4500 rpm num raio de rotação de 4,5 cm. Utilizar o sobrenadante (que deve ser claro) como amostra.

LEITURA E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados são expressos da seguinte maneira :

Aglutinação com o Latex sensibilizado (R1) e nenhuma aglutinação com o Latex controlado negativo (R2).	Presença de PBP2 ^a (teste positivo) (MRSA)
Sem aglutinação ou muito fina granulação com um e outro dos reagentes latex.	Ausência de PBP2 ^a (teste negativo) (MSSA)
Aglutinação com o Latex controlado negativo R2	Ininterpretável

Advertência para a interpretação :

Os resultados ininterpretáveis devem ser novamente testados. É aconselhável efectuar rigorosamente as etapas de aquecimento e de centrifugação tal como estão descritas no folheto informativo. Se o resultado permanecer ininterpretável após um novo teste, efectuar a pesquisa do gene MeccA.

CONTROLO DE QUALIDADE

Um controlo da qualidade dos reagentes deve ser efectuado na abertura de uma nova embalagem com as estirpes/cepas abaixo descritas :

MRSA	MSSA
ATCC® 33595 ou, ATCC® 11418 ou, ATCC® 33591	ATCC® 25923 ou, CIP 10314
Positivo	Negativo

Note:

É da responsabilidade do utilizador assegurar que o controlo de qualidade é efectuado em conformidade com a legislação local em vigor.

LIMITES DO TESTE

Algumas estirpes/cepas MRSA podem produzir uma pequena quantidade de PBP2^a e não serem detectadas por este método de latex, conduzindo deste modo a resultados falsos negativos.

REF 73 115 / 73 116

SLIDEX® Staph Plus

SLIDEX® Staph Plus é um teste rápido de aglutinação de partículas de látex para a identificação das estirpes/cepas de *Staphylococcus aureus* a partir dos meios de isolamento.

APRESENTAÇÃO

Ref. 73 115	Embalagem para 50 testes
Ref. 73 116	Embalagem para 250 testes

INTRODUÇÃO E OBJECTIVO DO TESTE

Os estafilococos fazem parte das bactérias que se coagulam. Este teste baseia-se na capacidade das estirpes/cepas de *Staphylococcus aureus* de produzir esta enzima extra-celular que coagula o plasma de coelho. Este teste permite também diferenciar *Staphylococcus aureus* das outras espécies de estafilococos, maioritariamente coagulase negativa. No entanto, este método necessita de 4 a 24 horas de incubação.

Outros métodos mais recentes (testes de aglutinação em soro) baseiam-se na detecção do factor de aglutinação de fibrina (ClfA) de *S. aureus* (1, 2, 3, 4). No entanto, estes testes demonstraram sensibilidade em relação a algumas estirpes/cepas resistentes à metilina (MRSA). Efectivamente, para algumas estirpes/cepas MRSA a proteína A e o clumping factor podem ser expressas em fraça quantidade ou ficarem encobertas (5). O SLIDEX Staph Plus permite detectar com uma grande sensibilidade estas estirpes/cepas graças à utilização de anticorpos monoclonais dirigidos a estruturas proteicas específicas de *S. aureus*.

PRINCIPIO

O reagente SLIDEX Staph Plus engloba partículas de látex azul sensibilizadas com fibrinógeno humano e anticorpos monoclonais. Permite, portanto, a detecção simultânea:

- do factor de afinidade para o fibrinógeno (clumping factor);
- da proteína A pelo fragmento Fc das IgG de rato;
- de anticorpos monoclonais dirigidos às estruturas específicas de *S. aureus*.

Na presença de colónias de *S. aureus*, pode observar-se uma aglutinação visível a olho nu.

SlideX® Staph Plus

09760E - PT - 2006/09

PRECAUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

- Somente para uso em diagnóstico *in vitro*.
- Unicamente para uso profissional.
- Este dispositivo contém componentes de análise humana. Nenhum dos métodos de análise actualmente conhecidos pode garantir de forma absoluta que estes produtos não contenham nenhum agente patogénico transmissível. É aconselhado manipulá-los com as precauções de utilização relativas aos produtos potencialmente patogénicos.
- Este dispositivo contém componentes de origem animal. O controlo da origem e/ou o estado sanitário dos animais não pode garantir de forma absoluta que estes produtos não contenham nenhum agente patogénico transmissível, é aconselhado manipulá-los com as precauções de utilização relativas aos produtos potencialmente patogénicos.
- Adicionalmente, os produtos e os produtos semeados devem ser considerados potencialmente infecciosos e devem ser manipulados de forma apropriada. As técnicas asépticas e as precauções habituais de manipulação para o grupo bacteriano estudado devem ser respeitadas durante toda a manipulação; consultar o "CLSINCCLS M29-A, Protection of Laboratory Workers from Instrument Biohazards and Infectious Diseases Transmitted by Blood, Body Fluids, and Tissues" (1996) da American Society for Microbiology.

Biológica em Laboratório, OMS - Genebra - última edição).

CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO

- Conservar os reagentes a 2° - 8° C.
- Não congelar os reagentes.
- Se os reagentes tiverem sido congelados acidentalmente, não devem ser utilizados.
- Todos os componentes permanecerem estáveis até à data de validade indicada na etiqueta da embalagem se forem conservados nas condições exigidas.

AMOSTRAS (colheitas/coleções e preparação)

O SLIDEX® Staph Plus não deve ser utilizado directamente na amostra. Os microrganismos a identificar devem primeiro ser isolados em meios de cultura apropriados em conformidade com as técnicas habituais. Após incubação durante 18 - 24 horas a 33° - 37° C, verificar as colónias suspeitas. Assegurar-se primeiro que se trata de *Staphylococcus aureus* através de reacções clássicas (morfologia, Gram, catalase). Se as colónias forem pequenas, é possível efectuar a reacção após 48 horas (33° - 37° C) de crescimento (c que acontece sobretudo com os meios selectivos).

PROCEDIMENTO

1. Deixar os reagentes à temperatura ambiente (18° - 25° C) antes da utilização.
2. Efectuar correctamente a suspensão dos reagentes em látex. Eliminar as bolhas de ar reidas no conteúdo.
3. Num a carta descartável, escolher dois círculos adjacentes e identificá-los.
4. Num dos círculos, colocar 1 gota de R1 (látex anti-*Staphylococcus aureus*) no segundo; no círculo de R2 (látex de controlo negativo). Ter o cuidado de segurar os frascos conta-gotas verticalmente quando efectuar a distribuição das unidades diferentes: bastonetes de utilização única (ou ansas) adicionar as colónias suspeitas em cada um dos dois círculos quer 1 a 2 colónias de tamanho médio provenientes de um meio não selectivo (ex: gelose Columbia de sangue), quer 3 a 6 colónias pequenas provenientes de um meio selectivo (ex: meio de Chapman).
5. Misturar cuidadosamente durante 10 segundos utilizando bastonetes de utilização única ou ansas; evitar o contacto com os olhos, a pele ou com a roupa.
6. Dar a carta um ligeiro movimento relativo durante 20 segundos e ler a reacção sob luz normal sem utilizar lupa.

LEITURA E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

- Um resultado positivo é indicado pelo aparecimento com o reagente R1 de uma aglutinação nos 30 segundos (tempo da mistura + tempo de rotação da carta) e pela ausência de aglutinação com o reagente R2.
- Um resultado negativo é indicado pela ausência de aglutinação com os reagentes R1 e R2.
- A reacção é ininterrompível se o reagente R2 apresentar uma aglutinação.

Nota:

- Se a aglutinação for muito fraca com o reagente R1 ou se a reacção for ininterrompível, a identificação da estirpe/cepa deve então ser efectuada pela detecção de coagulase ou pelo estudo dos caracteres bioquímicos.
- Uma reacção sob a forma de filamentos observados apenas com o R1 não deve ser considerada positiva.

09760 E - PT - 2006/09

IVD

partículas de látex para a identificação das estirpes/cepas de *Staphylococcus aureus* a partir dos meios de isolamento.

COMPOSIÇÃO DA EMBALAGEM PARA 50 TESTES (REF. 73 115) :

R1	Látex anti- <i>Staphylococcus aureus</i> (pronto a usar) Frasco conta-gotas*** humano** e pelos anticorpos monoclonais anti- <i>Staphylococcus aureus</i> (rato) Azida sólida ~ 0,1%
R2	Látex controlo negativo (pronto a usar) Frasco conta-gotas*** Azida sólida ~ 0,1%
15 cartas descartáveis com 8 locais de reacção**	
2 x 50 bastonetes descartáveis	
1 Folheto informativo	

COMPOSIÇÃO DA EMBALAGEM PARA 250 TESTES (REF. 73 116) :

R1	Látex anti- <i>Staphylococcus aureus</i> (pronto a usar) Frasco conta-gotas*** humano** e pelos anticorpos monoclonais anti- <i>Staphylococcus aureus</i> (rato) Azida sólida ~ 0,1%
R2	Látex controlo negativo (pronto a usar) Frasco conta-gotas*** Azida sólida ~ 0,1%
15 x 15 cartas descartáveis com 8 locais de reacção**	
1 Folheto informativo	

** Foi verificada a ausência de antígenos HBs, de anticorpos anti-VIH1, anti-VIH2 e de anticorpos anti-VHC. No entanto, não podendo nenhum teste dar uma garantia absoluta, deve este produto ser manipulado com as precauções de utilização relativas aos produtos potencialmente infecciosos.

*** 1 gota = 0,017 ml

Homogeneizar correctamente os reagentes antes de os utilizar.

MATERIAS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

- Cronómetro
- Ansa de plástico ou bastonetes de utilização única (para o dispositivo com a ref. 73 116).

bioMérieux® SA Portugal - 1

bioMérieux® SA Portugal - 2



GPS-539

REF V 4679

Gram Positive Susceptibility Card
 Carte d'antibiogramme Gram-positif
 Grampositive Resistenzbestimmungskarte
 Tarjeta de susceptibilidad Gram-Positivos
 Card per antibiogramma Gram-positivi
 Carta/Cartão para antibiograma Gram-positivos
 Gram-positiv Resistenskort
 Grampositivt Resistenskort
 Κάρτα ευαισθησίας Gram-θετικό
 Karta Antybiogramowa dla bakterii Gram-dodatnich

The VITEK® Gram Positive Susceptibility Card is intended for use with the VITEK System in clinical laboratories as an *in vitro* test to determine the susceptibility of **staphylococci, enterococci and Group B and Group D streptococci** to antimicrobial agents when used as instructed in the "pinsert" and operator's manuals.

Applicable warranty is fully set forth in the instructions for use.

La carte d'antibiogramme Gram-positif VITEK s'utilise avec le système VITEK comme test de laboratoire *in vitro* pour déterminer la sensibilité de **staphylocoques, entérocoques et streptocoques des groupes B et D** aux agents antimicrobiens, conformément aux consignes figurant dans la notice « pinsert » et les manuels d'utilisation.

Die VITEK Grampositive Resistenzbestimmungskarte ist für den Gebrauch mit dem VITEK-System als *In-vitro*-Test für klinische Labors zur Bestimmung der Empfindlichkeit von **Staphylokokken, Enterokokken und Streptokokken der Gruppen B und D** gegen Antibiotika bestimmt (bei Anwendung gemäß „pinsert“ und Bedienungsanleitungen).

La Tarjeta de susceptibilidad Gram-Positivos VITEK está diseñada para ser utilizada con el sistema VITEK en laboratorios clínicos como test *in vitro* para determinar la sensibilidad de **estafilococos, enterococos y estreptococos del Grupo B y del Grupo D** a los agentes antimicrobianos al utilizarse según las instrucciones en el "pinsert" y los manuales de instrucciones.

Card Contents / Composition des cartes / Karteninhalt / Composición de la Tarjeta / Composição da Carta/Cartão / Kortindhold / Kortinnehåll / Περιεχόμενα

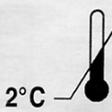
Well Puits Küvette Pocillo Pozetto Poço Brønd Brunn Κυψελίδα Studzienka	Antimicrobial Antimicrobien Antibiotikum Antimicrobiano Antimicrobico Antibióticos Antimikrobieel Antibiotika Αντιμικροβιακό Chemioterapeutyk	Code Code Code Código Codice Código Kode Kod Κωδικός Kod	Concentration § Concentration § Konzentration § Concentraciones § Concentrazione § Concentração § Konzentration § Concentration § Συγκέντρωση § Stężenie §	Calling Range Gamme de C.M.I. ‡ MHK-Bereich Rango de CMI Intervallo di valori Intervalo de CMI Måleområde Konzentrationsintervall Εύρος κλήσης Zakres MIC	Organism Micro-organisme Mikroorganismus Organismo Organismo Organismo Organism Organism Οργανισμός Mikroorganizm
2	Erythromycin	E	0.5, 4	-	-
				≤ 0.5	≥ 8
				≤ 0.5	≥ 8
				≤ 0.25	≥ 8
				≤ 16	≥ 64
4	Fosfomycin	FOS	8, 16	≤ 1	≥ 16
6	Fusidic Acid	FA	1, 2, 4	≤ 2	≥ 16
9	Gentamicin	GM	0.5, 2, 8	≤ 8	≥ 16
12	Kanamycin	K	16	≤ 2	≥ 8
13	Lincomycin	L	2, 4	≤ 2	≥ 16
15	Linezolid	LNZ	1, 2, 4	≤ 4	≥ 16
18	Minocycline	MNO	0.5, 1, 2	≤ 32	≥ 128
21	Nitrofurantoin*	FD	64	≤ 1	≥ 8
22	Ofloxacin	OFX	1, 2, 8	≤ 0.25	≥ 8
25	Oxacillin	OX	0.5, 2, 5	≤ 2	≥ 4
28	Pristinamycin	PRI	1	≤ 2	≥ 32
29	Teicoplanin	TEC	2, 3, 4	≤ 1	≥ 16
32	Tetracycline	TET	1, 8	≤ 4	≥ 8
34	Tobramycin	TM	2	≤ 10	≥ 320
35	Trimeth.Sulfa	SXT	0.5/9.5(10), 4/76(80), 16/304(320)	≤ 0.5	≥ 32
38	Vancomycin	VA	0.5, 4, 6, 16	-	-
42	β-lactamase (Pen G/Ox)	PEN G/OX	1.15/0.03	-	-
43	β-lactamase 2 (Pen G)	PEN G	0.03	-	-

Numerical values are expressed in µg/ml. § Equivalent Standard Method Concentration By Efficacy.
 * Recommended for lower urinary tract isolates.
 **GRPD = non-Enterococcal Group D Streptococci
 **GRPB = Group B Streptococci
 **N/A = No specific FDA Indications for Use available
 POS = Positive

Les valeurs numériques sont exprimées en µg/ml. § Méthode standard de concentrations d'efficacité équivalentes.
 ‡ Le VITEK par intégration de données sur la croissance bactérienne en présence de différentes concentrations d'antibiotiques pour chaque couple bactérie-antibiotique est capable de calculer une CMI comprise dans un intervalle de valeurs indépendant des concentrations testées.
 En l'absence de recommandations du CA-SFM, bioMérieux utilisera provisoirement les normes du CLSI ou d'autres recommandations.
 * Recommandé pour les isolats provenant des voies urinaires inférieures.
 **GRPD = Streptocoques du groupe D non-entérocoques
 **GRPB = Streptocoques du groupe B
 **N/A = Aucune indication d'emploi de la FDA n'est disponible
 POS = positif

Numerische Werte werden in µg/ml ausgedrückt. § Äquivalente Standardmethodenkonzentrationen nach Wirksamkeit.
 * Für Isolate der unteren Hamwege empfohlen.
 **GRPD = Streptokokken der Gruppe D (nicht Enterokokken)
 **GRPB = Streptokokken der Gruppe B
 **N/A = Keine spezifischen FDA-Indikationen für die Verwendung vorhanden
 POS = positiv

Los valores numéricos se expresan en µg/ml. § Concentraciones equivalentes en eficacia al método estándar.
 * Se recomienda para microorganismos aislados del tracto urinario inferior.
 **GRPD = Streptococcus no enterocóccos del Grupo D
 **GRPB = Streptococcus del Grupo B
 **N/A = No se dispone de Indicaciones de uso específicas de la FDA
 POS = Positivo

		 8°C 2°C	 For In Vitro Diagnostic Use
---	---	--	--

Identifica a la tarjeta / Codice della card / Código de barras da carta/cartão / Kortkode / Kortkod / Кодовый картас / Kod karty 2456789.10.11

VITEK Grampositivt Resistenskort är avsett för användning tillsammans med VITEK-systemet i kliniska laboratorier som ett *in vitro*-test för bestämning av resistensen hos **staphylococci, enterococci samt grupp B och grupp D streptococci** mot antimikrobiella medel som används enligt anvisningarna i "pinsert" och användarmanualerna.

Η κάρτα ευαισθησίας Gram-θετικό VITEK προορίζεται για χρήση με το σύστημα VITEK σε κλινικά εργαστήρια ως *in vitro* εξέταση για τον προσδιορισμό της ευαισθησίας του **σταφυλόκοκκοι, εντερόκοκκοι και στρεπτόκοκκοι ομάδας Β και ομάδας D** σε αντιμικροβιακούς παράγοντες όταν χρησιμοποιείται σύμφωνα με τις οδηγίες που αναφέρονται στο "pinsert" και τα εγχειρίδια χρήσης.

Karta antybiogramowa VITEK dla bakterii Gram-dodatnich słuzy wraz z systemem VITEK w laboratoriach klinicznych, jako test *in vitro* do określenia wrażliwości **gronkowców, enterokoków oraz paciorkowców grup B i D** na chemioterapeutyki, jeśli używa się jej zgodnie z procedurą zawartą w funkcji „pinsert” i instrukcji do kart.

CLSI® Quality Control Organisms VITEK Results
Résultats VITEK des Souches de Contrôle de Qualité CLSI
VITEK-Ergebnisse für CLSI QK-Keime
Resultados de VITEK sobre Organismos de Control de Calidad según CLSI
Microrganismi CLSI, Controllo Qualità Risultati VITEK
Resultados VITEK dos Organismos de Controlo de Qualidade CLSI
VITEK-Resultater for CLSI Kvalitetskontrol af Organismer
VITEK-Resultat for CLSI Kvalitetskontrollorganismer
Αποτελέσματα VITEK Οργανισμών Ποιοτικού Ελέγχου CLSI
Wyriki Kontroli Jakości Organizmów CLSI dla Systemu VITEK

E. faecalis ATCC® #29212	S. aureus ATCC #29213	E. faecalis ATCC #51299		
1 - 4	≤ 0.5 - 1	-		
≤ 16 - ≥ 64	≤ 16	-		
-	≤ 1	-		
-	≤ 2	-		
-	≤ 8	-		
-	≤ 2	-		
≤ 2 - 4	≤ 2 - 4	-		
-	≤ 4	-		
≤ 32	≤ 32	-		
≤ 1 - 4	≤ 1	-		
-	≤ 0.25 - 0.5	-		
-	≤ 2	-		
≤ 2	≤ 2	-		
8 - ≥ 16	≤ 1	-		
-	≤ 4	-		
≤ 10	≤ 10	-		
1 - 4	≤ 0.5 - 2	8 - ≥ 32		
-	POS	-		

Numeri § Equi Efficacia * Race **GRP ***GRP-koer *NA avallänner till POS § Numeriska värden är uttryckta i µg/ml. § Ekvivalent standardmetodkoncentration per effektivitet. * Rekommenderad för isolat från je nedre utrivägarna. **GRPD = icke-enterococci grup D Streptococci ***GRPB = Grupp B Streptococci *NA = Inga specifika FDA-ndikationer finns tillgängliga POS = positiv

Οι αριθμητικές τιμές εκφράζονται σε µg/ml. § Ισοδύναμη συγκέντρωση πρότυπης μεθόδου με βάση την αποτελεσματικότητα. * Συνιστάται για απομονώματα στελέχη της κάτω αεροφόρου οδού. **GRPD = μη εντεροκοκκοί στρεπτόκοκκοι ομάδας D ***GRPB = Στρεπτοκοκκοί ομάδας Β *NA = Δεν υπάρχουν διαθέσιμες ειδικές ενδείξεις χρήσης από τον FDA POS = θετικό

Wartości liczbowe są wyrażone w µg/ml. § Odpowiednik Skutecznego Stężenia w Metodzie Standardowej. * Zalecany dla izolatów z dolnych dróg moczowych. **GRPD = nie-enterokokowe paciorkowce grupy D ***GRPB = paciorkowce grupy B *NA = brak specjalnych zaleceń FDA POS = Dodatni

IDENT	IDADE	SEXO	SERVIÇO	RAST/CTL	PRODUT	PADRÃO	ERY	FOSF	FUC	GEN	KAN	LINE	LINEZOLI	MINOCIC	FUR	OFLO	OXA	PRISTIMIC	TEC	TETRACI	TOB	TRIM-SUL	VANCOM	B-LACTA	COAG	AS	MRSA
56468	77	F	MED1	RAST	EO	P1	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	POS	POS	POS	POS
56469	77	F	MED1	RAST	EN	P4	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	POS	POS	POS	POS
51646	87	M	MED2	CTL	EO	P2	R	R	S	R	R	R	S	S	S	R	R	S	S	R	R	R	S	POS	POS	POS	POS
63438	87	M	MED2	CTL	EO	P2	R	R	S	R	R	R	S	S	S	R	R	S	S	R	R	R	S	POS	POS	POS	POS
63443	74	M	MED2	CTL	EN	P2	R	R	S	R	R	R	S	S	S	R	R	S	S	R	R	R	S	POS	POS	POS	POS
63444	74	M	MED2	CTL	EO	P2	R	R	S	R	R	R	S	S	S	R	R	S	S	R	R	R	S	POS	POS	POS	POS
63488	74	M	MED2	CTL	EO	P2	R	R	S	R	R	R	S	S	S	R	R	S	S	R	R	R	S	POS	POS	POS	POS
63487	74	M	MED2	CTL	EN	P2	R	R	S	R	R	R	S	S	S	R	R	S	S	R	R	R	S	POS	POS	POS	POS
63534	74	M	MED2	CTL	EO	P2	R	R	S	R	R	R	S	S	S	R	R	S	S	R	R	R	S	POS	POS	POS	POS
66445	86	F	MED2	CTL	EN	P2	R	R	S	R	R	R	S	S	S	R	R	S	S	R	R	R	S	POS	POS	POS	POS
66446	86	F	MED2	CTL	EN	P2	R	R	S	R	R	R	S	S	S	R	R	S	S	R	R	R	S	POS	POS	POS	POS
66421	93	F	MED2	CTL	EN	P1	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	POS	POS	POS	POS
66422	93	F	MED2	CTL	EO	P1	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	POS	POS	POS	POS
60874	77	M	MED2	CTL	EN	P1	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	POS	POS	POS	POS
60875	77	M	MED2	CTL	EO	P1	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	POS	POS	POS	POS
60981	77	M	MED2	CTL	EO	P1	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	POS	POS	POS	POS
54914	52	M	MED2	CTL	EO	P1	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	POS	POS	POS	POS
55042	52	M	MED2	CTL	EO	P4	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	POS	POS	POS	POS
65946	91	M	MED1	RAST	EN	P1	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	POS	POS	POS	POS
65947	91	M	MED1	RAST	EO	P1	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	POS	POS	POS	POS
67617	91	M	MED1	RAST	EO	P1	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	POS	POS	POS	POS
55000	85	F	MED1	CTL	EN	P3	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	POS	POS	POS	POS
55001	85	F	MED1	CTL	EO	P3	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	POS	POS	POS	POS
66476	75	M	MED1	RAST	EN	P4	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	POS	POS	POS	POS
51267	73	M	MED2	RAST	EN	P7	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	R	S	S	S	S	POS	POS	POS	POS
67116	91	M	MED1	RAST	EN	P4	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	POS	POS	POS	POS
67117	91	M	MED1	RAST	EO	P4	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	POS	POS	POS	POS
67001	72	M	MED2	RAST	EN	P1	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	POS	POS	POS	POS
67244	88	M	MED1	RAST	EN	P2	R	R	S	R	R	R	S	S	S	R	R	S	S	R	R	R	S	POS	POS	POS	POS
67245	88	M	MED1	RAST	EO	P2	R	R	S	R	R	R	S	S	S	R	R	S	S	R	R	R	S	POS	POS	POS	POS
68101	58	M	MED2	RAST	EN	P1	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	POS	POS	POS	POS
68102	58	M	MED2	RAST	EO	P1	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	POS	POS	POS	POS
58745	86	F	MED2	CTL	EO	P1	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	POS	POS	POS	POS
58875	86	F	MED2	CTL	EN	P1	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	POS	POS	POS	POS
58847	86	F	MED2	CTL	EN	P7	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	POS	POS	POS	POS
58848	86	F	MED2	CTL	EO	P1	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	POS	POS	POS	POS
67817	87	F	MED1	RAST	EN	P1	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	POS	POS	POS	POS
67818	87	F	MED1	RAST	EO	P1	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	POS	POS	POS	POS
68926	83	M	MED2	RAST	EN	P2	R	R	S	R	R	R	S	S	S	R	R	S	S	R	R	R	S	POS	POS	POS	POS
68927	83	M	MED2	RAST	EO	P1	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	POS	POS	POS	POS
67997	83	M	MED2	RAST	EN	P1	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	POS	POS	POS	POS
67998	83	M	MED2	RAST	EO	P2	R	R	S	R	R	R	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	POS	POS	POS	POS
68631	64	M	MED1	RAST	EO	P4	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	POS	POS	POS	POS
68632	64	M	MED1	RAST	EN	P4	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	POS	POS	POS	POS
66934	86	M	MED	RAST	EN	P1	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	POS	POS	POS	POS
66935	86	M	MED	RAST	EO	P7	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	POS	POS	POS	POS
70816	93	M	MED2	RAST	EN	P1	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	POS	POS	POS	POS
70817	93	F	MED2	RAST	EO	P1	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	POS	POS	POS	POS
70814	89	M	MED2	RAST	EN	P1	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	POS	POS	POS	POS
70815	89	M	MED2	RAST	EO	P1	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	POS	POS	POS	POS
68853	94	F	MED2	RAST	EN	P4	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	POS	POS	POS	POS
68854	94	F	MED2	RAST	EO	P4	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	POS	POS	POS	POS
70285	64	M	MED1	RAST	EO	P4	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	POS	POS	POS	POS
70716	85	F	MED2	RAST	EO	P1	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	POS	POS	POS	POS
68779	68	M	MED1	RAST	EN	P1	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	POS	POS	POS	POS
68889	90	F	MED2	RAST	EN	P7	R	R	S	S	R	R	S	S	S	R	R	S	S	S	R	S	S	POS	POS	POS	POS
69121	88	M	MED1	RAST	EN	P1	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	POS	POS	POS	POS
70788	88	M	MED2	RAST	EN	P1	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	POS	POS	POS	POS
70962	91	F	MED2	RAST	EN	P1	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	POS	POS	POS	POS
70963	91	F	MED2	RAST	EO	P1	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	POS	POS	POS	POS
70958	77	F	MED2	RAST	EN	P1	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	POS	POS	POS	POS
70959	77	F	MED2	RAST	EO	P1	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	POS	POS	POS	POS
70956	83	M	MED1	RAST	EN	P1	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	POS	POS	POS	POS
70957	83	M	MED1	RAST	EO	P1	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	POS	POS	POS	POS
71430	72	M	MED2	RAST	EN	P1	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	POS	POS	POS	POS
71431	72	M	MED2	RAST	EO	P1	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	POS	POS	POS	POS
72226	71	M	MED2	RAST	EO	P2	R	R	S	R	R	R	S	S	S	R	R	S	S	R	R	R	S	POS	POS	POS	POS
72227	71	M	MED2	RAST	EF	P2	R	R	S	R	R	R	S	S	S	R	R	S	S	R	R	R	S	POS	POS	POS	POS
72310	73	F	MED2	RAST	EN	P2	R	R	S	R	R	R	S	S	S	R	R	S	S	R	R	R	S	POS	POS	POS	POS
72313	73	M	MED2	RAST	EO	P1	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	POS	POS	POS	POS