

MARIA JOSÉ DA SILVA ANTUNES MACHADO VAZ

**CARACTERIZAÇÃO DAS
RESISTÊNCIAS BACTERIANAS
OBSERVADAS EM
*STAPHYLOCOCCUS AUREUS***

**PORTO
1995**

Execução Gráfica

HELVÉTICA - Artes Gráficas, Lda.
Trav. do Seixo, 376 - Tel. / Fax 480 6157
Fânzeres - GONDOMAR

DEPÓSITO LEGAL
90909 / 95

MARIA JOSÉ DA SILVA ANTUNES MACHADO VAZ

**CARACTERIZAÇÃO DAS
RESISTÊNCIAS BACTERIANAS
OBSERVADAS EM *STAPHYLOCOCCUS
AUREUS***

Porto

1995

A Autora agradece

À *SmithKline Beecham* a publicação desta edição

Art. 48º. § 3º — A Faculdade não responde pelas doutrinas expendidas na Dissertação.

(Regulamento da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto — Decreto n° 19337, de 29 de janeiro de 1931)

**Dissertação de candidatura ao Grau de Doutor
apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade do Porto.**

Orientador: Professor Doutor João Carlos Figueiredo de Sousa
Artigo 4º, L.L. 388/70

Ao abrigo do parágrafo dois do Artigo 8º do Decreto-Lei nº 388/70, os resultados apresentados nesta Dissertação fazem parte dos artigos abaixo indicados:

1- " Comportamento de estirpes patogénicas de *S. aureus* face aos antibióticos MLS "- M^a José M. Vaz, J.C.F.Sousa, Luísa M. Peixe e H. M^a Neto- Rev. Port. D. Infecç.,**1**: 53-56, 1993a.

2- " Actividade, *in vitro*, de antibióticos beta-lactâmicos e não beta-lactâmicos contra estirpes patogénicas de *S. aureus* ". M^a José Vaz, J.C.F.Sousa, H. M^a Neto e L.M^a Peixe. Rev. Port. D. Infecç., **1**: 57-61, 1993b.

3- " Caracterização das beta-lactâmases elaboradas por estirpes patogénicas de *S. aureus* "- M^a José Vaz, J.C.F. Sousa, H. M^a Neto e L M^a Peixe -Arq. Med., **7**: 273-276, 1993.

4- " Estudo de portadores de *Staphylococcus* "- M^a José M. Vaz, J.C.F.Sousa e A. Torres Pereira- Arq. Med., **9**:85-86, 1995.

5- Aminoglycosid Resistance Study Groups (including Neto M H, Sousa J C F and Vaz M J).The most frequently occurring aminoglycoside-resistance mechanisms. Combined results, surveys in eight Regions of the World. Chemotherapy Journal , 1995 (**in press**)

AGRADECIMENTOS

- Devo expressar o meu maior agradecimento ao Senhor Professor Doutor Júlio Machado Vaz e ao Senhor Professor Doutor Teixeira da Silva que me orientaram desde logo na longa caminhada deste trabalho. Sabendo eles todo o interesse que sempre mostrei pelas resistências bacterianas aos antibióticos, sugeriram-me a pessoa mais indicada para cumprir o meu projecto.

- Aceite pelo Senhor Professor Doutor João Carlos de Sousa como orientanda, ficou decidido que estudaria a caracterização das resistências de *S. aureus* aos antibióticos, estudo este comparativo entre duas comunidades: hospitalar (H.S. João) e ambulatório (área urbana do Porto). Ao Senhor Professor João Carlos de Sousa coube a missão de me orientar em todos os estudos feitos e publicados. Acolhida na Faculdade de Farmácia, fui tratada de igual modo que as restantes orientandas desse serviço, que fazem parte do corpo docente dessa Faculdade. Poderei dizer que essa preciosa orientação foi fundamental na elaboração deste estudo, que de forma alguma está esgotado em si, mas constitui um incentivo para trabalhos posteriores nesta área. Deixo-lhe expresso o meu maior agradecimento pelos ensinamentos que me transmitiu como Homem de Ciência e Investigador que é .

- Para o Senhor Professor Doutor Manuel Sobrinho Simões, não é fácil encontrar palavras. Entregue à Ciência e Investigação, com o tempo completamente preenchido, teve sempre uma breve pausa suficiente para me ouvir e incentivar . Aqui lhe expresso a minha profunda e inesquecível gratidão .

- Ao Senhor Professor Doutor Joaquim Maia não consigo expressar o quanto o admiro, o quanto lhe devo na orientação de todo o trabalho de análise estatística, e ainda o alento que sempre me deu. Enfim , um grande amigo !

- Ao Senhor Professor Doutor Daniel Serrão, para além do meu agradecimento por todo o interesse e confiança que sempre depositou neste estudo, não posso deixar de expressar a admiração que me merece como impulsionador da Ciência no nosso País e pela generosidade com que aconselha os que querem progredir.

- Para o Senhor Professor Doutor Torres Pereira, que prontamente fez a lisotipia das nossas estirpes, vai a minha inesquecível gratidão.

- Ao Senhor Dr. Joaquim Gomes Carneiro agradeço toda a disponibilidade e empenho na caracterização das beta-lactâmases das nossas estirpes pelo método de cinética enzimática . Tal estudo não teria sido possível sem esta preciosa colaboração.

- Ao Senhor Professor Doutor Douglas Kernodle a minha gratidão pela gentileza e rapidez com que me enviou as estirpes padrão necessárias à caracterização das beta-lactâmases das estirpes de *S. aureus* estudadas.

- Ao Senhor Professor Doutor Victor Faria pela amizade com que sempre me aconselhou.

- Ao Senhor Professor Doutor Freitas da Fonseca devo a gentileza com que pôs à minha disposição a recolha de dados bibliográficos necessários à escrita desta dissertação.

- A todos os técnicos do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia, à Dr^a Maria Helena Neto e à Dr^a. Maria Luísa Peixe, quero agradecer o terem colaborado neste estudo.

- À Senhora Dr^a. Maria Luís Queirós bem haja pelas noites que dispensou a este estudo na Faculdade de Farmácia num trabalho que parecia não ter fim.

-Ao Dr. Fernando Fonseca o meu muito obrigada pelas longas horas passadas ao computador na elaboração gráfica deste trabalho.

- Seria injusto da minha parte não realçar toda a boa colaboração técnica prestada pela Senhora D. Fernanda Santos e Senhora D. Deolinda Rodrigues.

- Ao Pintor e amigo Emerenciano devo a elaboração da capa deste livro.

Ao
Bernardino e André

À
Memória de Meus Pais

Ao
Meu Tio (Professor Doutor Júlio Machado Vaz)
Meu Mestre

CORPO CATEDRÁTICO
DA FACULDADE DE MEDICINA DO PORTO

Professores Efectivos (por antiguidade)

Doutor José Fernando Barros Castro Correia
Doutor Daniel dos Santos Pinto Serrão
Doutor Amândio Gomes Sampaio Tavares
Doutor António Carvalho Almeida Coimbra
Doutor António Manuel Sampaio Araújo Teixeira
Doutor Mário José Cerqueira Gomes Braga
Doutor José Augusto Fleming Torrinha
Doutor Joaquim Germano Pinto Machado Correia Silva
Doutor Serafim Correia Pinto Guimarães
Doutor Manuel Miranda Magalhães
Doutor José Carvalho de Oliveira
Doutor António Alberto Falcão de Freitas
Doutor António Fernandes Oliveira Barbosa Ribeiro Braga
Doutor Valdemar Miguel Botelho dos Santos Cardoso
Doutor Victor Manuel Oliveira Nogueira Faria
Doutor António Augusto Lopes Vaz
Doutor António Luís Tomé da Rocha Ribeiro
Doutor Levi Eugénio Ribeiro Guerra
Doutor José Manuel Costa Mesquita Guimarães
Doutor Celso Renato Paiva Rodrigues da Cruz
Doutor Cândido Alves Hipólito Reis
Doutor Alexandre Alberto Guerra Sousa Pinto
Doutor Eduardo Jorge Cunha Rodrigues Pereira
Doutor António Germano Pina da Silva Leal
Doutor Manuel Augusto Cardoso de Oliveira
Doutor Norberto Teixeira Santos
Doutor Manuel Maria Paula Barbosa
Doutor Manuel Machado Rodrigues Gomes
Doutor Maria da Conceição Marques e Magalhães
Doutor Carlos Rodrigo Magalhães Ramalhão
Doutor Luís António Mota Prego Cunha Soares Moura Pereira Leite
Doutor José Vaz Saleiro e Silva
Doutor Manuel Alberto Coimbra Sobrinho Simões
Doutor Francisco José Zarco Carneiro Chaves
Doutor Jorge Manuel Mergulhão Castro Tavares

Doutor Maria Isabel Amorim de Azevedo
Doutor Henrique José Ferreira Gonçalves Lecour de Meneses
Doutor Maria Amélia Duarte Ferreira

Professores Jubilados

Doutor Albano dos Santos Pereira Ramos
Doutor António Fernandes da Fonseca
Doutor Carlos Ribeiro da Silva Lopes
Doutor Fernando Carvalho Cerqueira Magro Gomes Ferreira
Doutor Francisco Sousa Lé
Doutor João da Silva Carvalho
Doutor Joaquim José Monteiro Bastos
Doutor Joaquim de Oliveira da Costa Maia
Doutor José Pinto de Barros
Doutor Júlio Machado Sousa Vaz
Doutor Manuel Teixeira Amarante Júnior
Doutor Manuel Sobrinho Simões

Professores Aposentados

Doutor Abel José Sampaio da Costa Tavares
Doutor Artur Manuel Giesteira de Almeida
Doutor Casimiro Águeda de Azevedo
Doutor José Manuel Gonçalves Pina Cabral
Doutor José Ruiz de Almeida Garrett
Doutor Manuel José Bragança Tender
Doutor Walter Friedrich Alfred Osswald

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO E OBJECTIVOS.....	29
1.1. Evolução das resistências de <i>S.aureus</i> aos antibióticos	34
2. MATERIAL E MÉTODOS	39
2.1. Estirpes bacterianas usadas e sua proveniência	41
2.1.1. Estirpes oriundas de produtos biológicos de doentes internados no Hospital de S.João, Porto, e da área do Porto.....	41
2.1.3. Estirpes padrão	41
2.2. Meios de cultura e soluções utilizadas.....	42
2.2.1. Meio de transporte de Stuart.....	42
2.2.2. Meios utilizados para isolamento, conservação e crescimento de estirpes	42
2.2.2.1. Trypticase Soy Broth (Difco).....	42
2.2.2.2. Trypticase Soy Broth (Difco) com glicerol a 15%.....	43
2.2.2.3. Manitol salt agar (Difco)	43
2.2.2.4. Cled agar (bioMérieux).....	44
2.2.2.5. Gelose sangue	44
2.2.3. Meios e reagentes utilizados para a identificação das estirpes	45
2.2.3.1. Api Staphylo (bioMérieux)	45
2.2.3.2. Meio DNase (Difco).....	45
2.2.3.3. Plasma de coelho liofilizado (bioMérieux).....	45
2.2.4. Meios utilizados para testes de susceptibilidade aos antibióticos	46
2.2.4.1. Mueller Hinton II agar (bioMérieux).....	46
2.2.4.2. Mueller Hinton broth (bioMérieux).....	46
2.2.5. Trypticase Soy Broth suplementado com eritromicina	47
2.2.6. Meios utilizados na detecção e caracterização do tipo de beta-lactâmases produzidas por <i>S. aureus</i>	47
2.2.6.1. Trypticase Soy agar (Difco).....	47
2.2.6.2. Cy-Tris-Meticilina-agar.....	47
2.2.6.3. Cy-Broth.....	48

2.2.7. Soluções utilizadas	49
2.2.7.1. Tampão de fosfato de sódio 0,1M (pH 6,0)	49
2.2.7.2. Tampão de fosfato de sódio 0,1M (pH 7,0)	49
2.2.7.3. Solução salina a 1%	49
2.2.7.4. Solução aquosa de lysostaphina (Sigma)	49
2.2.7.5. Solução de hidróxido de sódio 0,5 e 1 M	49
2.2.7.6. Solução de ácido clorídrico 0,1 N e 1 M	49
2.2.7.7. Solução de nitrocefim 100 µM	49
2.2.7.8. Solução hemi-saturada de sulfato de amónio	50
2.3. Sondas de DNA	50
2.3.1. Membranas de hibridização	50
2.4. Preparação de beta-lactâmases purificadas	50
2.4.1. Preparação de fosfato de celulose	51
2.5. Antibióticos usados nos testes de susceptibilidade	51
2.5.1. Antibióticos utilizados na determinação da CIM pelo "E test"	51
2.5.2. Antibióticos utilizados na caracterização do tipo de beta-lactâmases	52
2.5.3. Inibidores de beta-lactâmases utilizados nos ensaios de hidrólise	52
2.6. Métodos	53
2.6.1. Isolamento e identificação de estirpe	53
2.6.2. Ensaio de susceptibilidade das estirpes	53
2.6.3. Determinação da CIM (µg/ml) pelo "E test"	59
2.6.4. Teste de detecção de beta-lactâmases	65
2.6.5. Determinação do tipo de beta-lactâmases	65
2.6.6. Ensaio de inibição das beta-lactâmases pelo ácido clavulânico e tazobactam	66
2.6.7. Ensaio de indução de resistência MLS	66
2.6.8. Caracterização molecular de resistência bacteriana aos antibióticos aminoglicosídeos-aminociclitois	67
2.6.9. Fagotipia	67
2.6.10. Método seguido no estudo de portadores de <i>Staphylococcus</i>	67

2.7. Estatística	68
3. RESULTADOS.....	69
3.1. Estirpes patogénicas de <i>S. aureus</i> e sua origem	71
3.2. Comportamento <i>in vitro</i> das estirpes patogénicas de <i>S. aureus</i> face aos antibióticos	74
3.2.1. Caracterização do tipo de beta-lactâmases em <i>S. aureus</i>	80
3.2.2. Actividade inibitória do ácido clavulânico e tazobactam sobre as beta- -lactâmases do tipo A, B, C e D de <i>S. aureus</i>	82
3.2.3. Antibióticos MLS (Macrólidos-Lincosaminas-Streptograminas)	83
3.2.3.1. Ensaio de indução de resistência MLS _B	95
3.2.4. Antibióticos aminoglicosídeos aminociclitois	96
3.3. Fagotipia das estirpes patogénicas de <i>S. aureus</i>	97
3.4. Incidência (%) de portadores de <i>Staphylococcus</i> em pessoal médico e para- médico	101
3.4.1. Comportamento das estirpes face aos antibióticos	101
3.4.2. Caracterização do tipo de beta-lactâmases elaboradas por 22 estirpes de <i>S. aureus</i> provenientes de portadores nasais	105
3.4.3. Fagotipia	105
4. DISCUSSÃO.....	107
4.1. Antibióticos beta-lactâmicos	110
4.1.1. Beta-lactâmases	114
4.2. Antibióticos aminoglicosídeos-aminociclitois	116
4.2.1. Enzimas inactivadoras	117
4.3. Antibióticos MLS.....	118
4.4. Vancomicina / Teicoplanina	119
4.5. Rifampicina	121
4.6. Quinolonas.....	122
4.7. Ácido Fusídico	124
4.8. Cloranfenicol	125
4.9. Trimetropim-sulfametoxazol.....	126
4.10. Fosfomicina	127

4.11. Tetraciclina	128
4.12. Clindamicina	129
4.13. Mupirocina	130
4.14. Estudo de portadores de <i>Staphylococcus</i> em pessoal médico e paramédico	132
5. RESUMO E CONCLUSÕES	135
6. BIBLIOGRAFIA	145

PREFÁCIO

A realização desta dissertação é fruto de um trabalho para o qual contribuíram várias personalidades. Muito ficou por fazer, mas pensamos que estudos destes não se podem esgotar em si mesmo, sendo apenas o início de posteriores publicações nesta área.

Se algum mérito tem esta dissertação, devemos-lo a quantos nos ajudaram e incentivaram.

1 - INTRODUÇÃO E OBJECTIVOS

O género *Staphylococcus* tem tido ao longo dos anos uma importância crescente na patologia infecciosa humana. A sua presença na população microbiana proporciona a muitas espécies de estafilococos a oportunidade de causar infecções em determinadas circunstâncias.

S. aureus tem sido reconhecido historicamente como um virulento e importante patogénico humano, cuja responsabilidade etiológica nas infecções não diminuiu de modo nenhum com a introdução dos antibióticos. Se por vezes se limita a colonizar ou causar infecções localizadas na pele (furúnculos, abscessos ou simplesmente feridas infectadas), no pulmão (pneumonias), poderá eventualmente, a partir destes locais, atingir por via sistémica outros órgãos e causar mesmo por vezes situações graves como o choque séptico e a endocardite (Topley e Wilson, 1983-1984; Bailey e Scott's, 1990).

O aumento da prevalência das infecções causadas por *Staphylococcus aureus* e por outras espécies do género *Staphylococcus*, bem como a acrescida incidência de resistências aos antibióticos, tem vindo a constituir um problema clínico de grande actualidade (Courvalin *et al*, 1972; Parisi et Hecht 1980; Thompson *et al*, 1982; Saravolatz *et al*, 1982; Haley *et al*, 1982; Lyon *et al*, 1983; Markowitz *et al*, 1983; Parisi *et al*, 1986; Skurray *et al*, 1988; Trees et Iandolo, 1988; Johnson *et al*, 1990, 1993; Livermore, 1991; Johnson *et al*, 1993; Kloos *et al*, 1994; Venditti *et al*, 1994; Kloos et Bannerman, 1994).

Os antibióticos beta-lactâmicos foram tradicionalmente os antibióticos de eleição para as infecções estafilocócicas. Inicialmente, *S. aureus* era sensível à penicilina sendo inibido por baixas concentrações de benzilpenicilina ($CIM \leq 0,03 \mu\text{g/ml}$). Dentro de poucos anos, após o início da penicilino-terapia, as estirpes de *S. aureus* começaram a tornar-se resistentes à benzilpenicilina através da produção de beta-lactâmases (penicilinasas). O aparecimento de novas moléculas, tais como as isoxazolilpenicilinas (oxacilina, cloxacilina, dicloxacilina, nafcilina, flucloxacilina e as meticilinas), dificultaram o acesso das beta-lactâmases das bactérias Gram positivo ao anel beta-lactâmico. Pouco tempo após a sua utilização terapêutica, começaram a surgir na década de 70 as primeiras estirpes de *S. aureus* resistentes à meticilina e antibióticos relacionados. O aumento crescente das estirpes produtoras de beta-lactâmases e o aparecimento de estirpes com mutações nos receptores dos antibióticos, constitui na actualidade uma grande preocupação dos investigadores e dos clínicos, dado que as opções terapêuticas são cada vez mais limitadas (Malouin *et Bryan*, 1986; Chambers, 1987; Tomasz *et al*, 1989; Johnson *et al*, 1990; Suzuki *et al*, 1992; Bryan, 1992; Georgopapadakou, 1993; Brink *et al*, 1993).

A descrição internacional dum número crescente de estirpes de *S. aureus* resistentes à meticilina (Jevons, 1961; Tonin et Tomasz, 1986; Townsend *et al*, 1987; Francioli *et al*, 1991; Lencastre *et al*, 1991; Venditti *et al*, 1994), o aparecimento de resistências à vancomicina e teicoplanina em *Streptococcus* e *Enterococcus* spp. (Leclercq *et al*, 1988; Mateos-Mora *et al*, 1988; Colley *et al*, 1989; Johnson *et al*, 1990; Arthur et Courvalin, 1993; Gold *et al*, 1993; Hayden *et al*, 1993; Green *et al*, 1993; Chow *et al*, 1993; Boyce *et al*, 1994; Swenson *et al*, 1994; Gutmann *et al*, 1994; Mobarakai *et al*, 1994; Torres *et al*, 1994), levantam a possibilidade de no futuro poderem aparecer estirpes de *S. aureus* resistentes à totalidade dos diferentes grupos de antibióticos, o que constitui um grave problema de Saúde Pública.

Neste contexto, procurámos estudar o comportamento de estirpes hospitalares e ambulatoriais de *S. aureus* face aos antibióticos beta-lactâmicos e não beta-lactâmicos esclarecer quais os fenótipos de resistência mais frequentes no nosso País. Verificamos se as estirpes eram produtoras de beta-lactâmases e caracterizámos igualmente o tipo de beta-lactâmases presentes num número significativo de estirpes *S. aureus*, averiguando de seguida qual o papel do ácido clavulânico e tazobactam, na inibição das beta-lactâmases do grupo A, B, C e D, com a finalidade de melhor compreender qual a sua importância na terapêutica das infecções estafilocócicas.

Foi verificado igualmente, *in vitro*, o comportamento das estirpes face aos antibióticos não beta-lactâmicos e dentro de alguns grupos procurámos avaliar os fenótipos dessas resistências.

Nesse contexto, foi feita a caracterização molecular da resistência aos antibióticos aminoglicosídeos-aminociclitois e avaliamos os fenótipos de resistência aos antibióticos MLS (Macrólidos/Lincosamidas/Streptograminas), bem como a outros grupos de antibacterianos, a qual assume valores elevados nas estirpes resistentes à meticilina.

Atentos ao papel que os portadores de *S. aureus* desempenham na cadeia epidemiológica destas infecções, estudamos o comportamento das estirpes de estafilococos oriundas de portadores nasais (pessoal médico e paramédico) quanto à fagotipia, tipo de beta-lactâmases e perfil de susceptibilidade aos antibióticos beta-lactâmicos e não beta-lactâmicos.

Foi também estudada a eficácia, *in vitro*, de mupirocina, um antibiótico tópico, contra as estirpes patogénicas de *S. aureus* e *S. epidermidis* de portadores nasais dentro do H.S. João, Porto.

Tivemos, pois, por objectivo verificar a incidência e a caracterização das resistências em *S. aureus* face aos diferentes grupos de antibióticos e definir as alternativas terapêuticas empíricas em ambiente hospitalar e ambulatório. Estudos destes deveriam ser alargados a outras regiões do nosso País, dado que é provável a ocorrência de variações regionais.

É nossa intenção, após o conhecimento do comportamento das estirpes de *S. aureus* no nosso Hospital, *in vitro*, face aos diversos grupos antibacterianos, avaliar a eficácia terapêutica de alguns antibióticos em monoterapia *versus* associações de antibióticos em ensaios de infecção animal experimental. É também nosso objectivo verificar a eficácia *in vivo* de mupirocina na erradicação de portadores de *Staphylococcus* e avaliar futuramente se isso contribui para uma diminuição da disseminação da infecção estafilocócica, sobretudo com estirpes resistentes à meticilina, que presentemente constituem um sério problema da infecção hospitalar.

1.1. - EVOLUÇÃO DAS RESISTÊNCIAS DE *S. AUREUS* AOS ANTI-BIÓTICOS

Desde há longas décadas que o género *Staphylococcus*, nomeadamente o *S. aureus*, despertou interesse na microbiologia médica pelo lugar primacial que sempre ocupou na patologia infecciosa.

A época pré-antibiótica foi marcada por surtos epidémicos da responsabilidade deste agente, incluindo infecções hospitalares que contribuíram para o desenvolvimento precoce de métodos laboratoriais de caracterização epidemiológica e consequentemente, conhecimento da epidemiologia das infecções por *S. aureus*.

Nas últimas décadas, outras espécies de estafilococos não produtores de coagulase têm vindo a adquirir importância relevante na patogenia das infecções hospitalares (Archer et Climo, 1994). Os estafilococos coagulase-negativa passam a ter um papel relevante na infecção nosocomial, particularmente nas bacteriemias (Schaberg *et al*, 1991). Estafilococos coagulase-negativa multirresistentes aos antibióticos colonizam a pele dos doentes hospitalizados e do pessoal médico e paramédico (Archer, 1991). A colonização da pele pode assim justificar a grande incidência de estafilococos coagulase-negativa nas bacteriemias em comunidades hospitalares. Adicionalmente, a acumulação dos genes de resistência aos antibióticos em estafilococos coagulase negativa pode facilitar a sua disseminação para *S. aureus*. Deve-se este facto à evolução da Medicina que passou a usar mais frequentemente técnicas invasivas de diagnóstico, à maior debilidade imunobiológica de muitos doentes e à pressão antibiótica a que estão sujeitos os doentes hospitalizados. Tais razões levaram à selecção de mutantes de estafilococos multirresistentes não produtores de coagulase, tornando-os responsáveis por vezes por situações de gravidade idêntica ou superior às causadas por *S. aureus* (Archer et Climo, 1994; Rupp et Archer, 1994). Uma alta incidência de estafilococos coagulase-negativa resistente à benzilpenicilina ocorre graças à elaboração de penicilinas. Contudo, o mecanismo de resistência mais grave deve-se à ocorrência de estirpes com PBP2a ou PBP2', de baixa afinidade para os antibióticos beta-lactâmicos, designada por resistência à meticilina ou oxacilina. O comportamento é idêntico ao que ocorre em *S. aureus*, mas com maior incidência (Archer et Climo, 1994).

Inicialmente, apenas 5% das estirpes de *S. epidermidis*, isolados de válvulas cardíacas, eram resistentes à gentamicina. Presentemente, a resistência de *S. epidermidis* à gentamicina exhibe valores de resistência da ordem dos 60%. Este fenótipo é bastante comum na pele de doentes hospitalizados (Archer et Climo, 1994).

Fenómenos idênticos têm sido observados para outros antimicrobianos, nomeadamente com: trimethoprim, rifampicina, fluorquinolonas, antibióticos MLS e tetraciclina.

Apreciada a evolução da susceptibilidade de *S. aureus* aos antibióticos, ao longo de todos estes anos poderemos ver o modo rápido e eficaz com que estas bactérias se defendem, lançando permanentes desafios à investigação científica.

O aparecimento da penicilina em 1940 veio possibilitar a cura de infecções graves, nomeadamente estafilocócicas.

Entre 1940 e 1950 surgem três classes de antibióticos: penicilinas, aminoglicosídeos e tetraciclina (Shanson, 1981). O número de estirpes resistentes à penicilina aumenta logo após a sua introdução (1941) e, em 1944, Kirby faz a primeira descrição deste mecanismo de resistência de *S. aureus* à penicilina (produção de beta-lactâmases) (Kirby, 1944). Mais tarde, Novick demonstra a origem plasmídica destas enzimas (Novick, 1963). Surgem, porém, estirpes de *S. aureus* em que os genes que codificavam a síntese de beta-lactâmases estavam aparentemente localizados no cromossoma, devendo-se umas vezes à integração de um plasmídeo no cromossoma, enquanto noutras a responsabilidade da síntese destas enzimas se devia a genes localizados em transposões (Weber et Goering, 1988). Por causa do desenvolvimento da resistência à penicilina e ampicilina, mediada por beta-lactâmases, penicilinas resistentes às beta-lactâmases e cefalosporinas foram introduzidas na terapêutica (Aldridge *et al*, 1985).

A introdução da meticilina, a primeira das penicilinas semi-sintéticas resistente às penicilinas, na década de 1960-1970, pareceu resolver o problema. Quase simultaneamente, britânicos identificaram a primeira estirpe de *S. aureus* resistente à meticilina, (Jevons, 1961) que exibia resistências cruzadas com os outros beta-lactâmicos. Estas estirpes serão designadas neste trabalho por estirpes Met^R. A primeira descrição de uma infecção por *S. aureus* resistentes à meticilina foi feita por Dowling em 1961. Investigadores de outros países identificam também estirpes Met^R (Courtieu *et al*, 1964; Kayer et Mak, 1972; Klimak, 1976; Grossley, 1979; Peacock *et al*, 1980; Van der Auwera P. *et al*, 1990) algumas vezes em populações que não tinham sido expostas à meticilina, mas tinham sido expostas a largas quantidades de penicilina e outros antibióticos existentes na altura. Durante os primeiros anos a meticilina-resistência parecia ser uma ocorrência natural de frequência rara e com pouco significado clínico. Por volta de 1968 surge um aumento significativo de estirpes Met^R na Grã-Bretanha (Haley *et al*, 1982). Nos Estados Unidos, os isolados clínicos começam a aparecer nos hospitais uma década após terem surgido na Grã-Bretanha e noutros países, atingindo proporções epidémicas no início da década de

1980 (Haley *et al*, 1982). Schaeffler *et al* reportam a emergência de resistências concomitantes à gentamicina e meticilina em estirpes isoladas em 19 hospitais de Nova Iorque (Haley *et al*, 1982). Confinada inicialmente à comunidade hospitalar, logo são descritos casos de Met^R em comunidades abertas. Na área de Detroit, por exemplo, são mencionados Met^R como responsáveis de surtos infecciosos em utilizadores de droga por via parentérica (Saravolatz *et al*, 1982). Alguns destes doentes, após hospitalização, condicionaram o significativo aumento de casos de infecções nosocomiais. Infecções por estirpes Met^R passam pois a ter início em ambiente hospitalar ou comunidade aberta (Sheagren, 1984), podendo disseminar-se num ou noutro sentido (Peacock *et al*, 1980; Haley *et al*, 1982; Duckworth *et al*, 1988; Eykyn, 1988; Brumfitt et Hamilton-Miller, 1989). Isto é devido em parte à capacidade de *S. aureus* colonizar sítios como as fossas nasais, pele e subsequentemente disseminar-se para causar doença (Sheagren, 1984). Após o uso terapêutico das tetraciclina, começam a surgir estirpes de *S. aureus* resistentes a estes antibióticos. A resistência às tetraciclina tem vindo a aumentar e também aqui a responsabilidade se deveu a um plasmídeo (Shanson, 1981).

O primeiro macrólido a ser usado foi a eritromicina em 1952 como alternativa terapêutica às estirpes resistentes à penicilina e tetraciclina. Logo de imediato aparecem resistências à eritromicina, muitas vezes associadas à resistência à penicilina e tetraciclina (Shanson, 1981). Sabe-se hoje que o tipo de resistências aos macrólidos, bem como às lincosamidas e estreptograminas, se deve à metilação do receptor ribossomal bacteriano. Estas enzimas podem ser sintetizadas sob uma forma constitutiva ou indutiva, dando origem a dois tipos de resistências ao grupo MLS (Garrod, 1957; Sousa et Prista, 1991; Vaz e cols, 1993a).

Também o cloranfenicol introduzido na terapêutica deixa a curto prazo de ser usado pelo aparecimento de resistências e também pela sua elevada toxicidade (Shanson, 1981).

O uso tópico de alguns aminoglicosídeos, como por exemplo a neomicina, leva ao aparecimento das primeiras estirpes de *S. aureus* resistentes a estes antibióticos (Lowbury *et al*, 1964). O mesmo tem sido referido para a canamicina (Gray et Fitch, 1983).

Tudo se complica a partir do momento em que estirpes Met^R apresentam resistências simultâneas aos aminoglicosídeos, o que se torna um fenómeno corrente. Já em 1979 Kent Grossley *et al*. reportam, em dois hospitais franceses, estirpes de *S. aureus* resistentes à meticilina e aminoglicosídeos numa percentagem superior a 40% em doentes hospitalizados. Pensam estes mesmos autores que a resistência destas estirpes

Met^R aos aminoglicosídeos se devia à transferência de determinantes genéticos de *S. epidermidis* e outras estirpes resistentes (Grossley *et al*, 1979).

Ao longo de todos estes anos vários têm sido os casos de estirpes *S. aureus* multi-resistentes responsáveis por infecções graves, nomeadamente a nível hospitalar, o que torna difícil a terapêutica destas infecções (Aldridge *et al*, 1985). Na realidade, as alternativas antibióticas seguras estão praticamente reduzidas à vancomicina e teicoplanina (Craven *et al*, 1983; Mader et Adams, 1989; Bannerman *et al*, 1991). Outros antibióticos, como o ácido fusídico, fosfomicina e rifampicina, embora activos *in vitro*, perdem a actividade *in vivo* quando usados isoladamente (Guenther et Wenzel, 1984; Alvarez *et al*, 1985; Arathoon *et al*, 1990).

As novas quinolonas apresentadas como antimicrobianos prometedores já apresentam hoje elevado número de resistências (Smith et Eng, 1985; Chambers, 1988; Shalit *et al*, 1989; Ubukata *et al*, 1989; Raviglione *et al*, 1990; Blumberg *et al*, 1991; Harnett *et al*, 1991; Hori *et al*, 1993; Satoshi *et al*, 1993; Vaz e cols, 1993b).

A situação actual é preocupante, dada a possibilidade de as estirpes de *S. aureus* Met^R virem a adquirir os plasmídeos responsáveis pela resistência à vancomicina a partir de *Enterococcus* (Leclercq *et al*, 1988; Boyce et Medeiros 1994).

Atentos a estes problemas, vários investigadores, utilizando técnicas de biologia molecular, tentam compreender melhor os mecanismos utilizados por estes grupos bacterianos nas resistências aos antibióticos (Lencastre *et al*, 1994).

É importante realçar que as estirpes de *S. aureus* e *S. epidermidis* Met^R podem ocasionar índices de mortalidade de 20-40% entre os infectados clinicamente (Mode *et al*, 1989).

MATERIAL E MÉTODOS

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1. - ESTIRPES BACTERIANAS E SUA PROVENIÊNCIA :

2.1.1. - ESTIRPES ORIUNDAS DE PRODUTOS BIOLÓGICOS DE DOENTES INTERNADOS NO H.S.JOÃO E DA ÁREA URBANA DO PORTO

Seiscentas e oitenta e seis estirpes (474 hospitalares e 212 ambulatoriais) patogênicas de *S. aureus* foram isoladas de produtos biológicos (expectoração, secreções brônquicas, líquidos pleurais, pús, exsudado nasal, sangue, urina e fezes). As estirpes hospitalares eram oriundas de doentes internados no H.S.João do Porto, e as ambulatoriais de doentes da área urbana do Porto. As colheitas efectuaram-se durante o ano de 1991-1992.

2.1.2. - ESTIRPES ORIUNDAS DE PORTADORES DE *STAPHYLOCOCCUS*

Sessenta e oito estirpes de *Staphylococcus* (22 estirpes de *S. aureus* e 46 estirpes de *S. epidermidis*), foram isoladas das fossas nasais de portadores assintomáticos de pessoal médico e paramédico dos seguintes Serviços do H.S.João: Laboratório de Microbiologia, U.D.N. (Unidade de Doentes Neutropênicos de Medicina 1), Cirurgia 2, Cirurgia 3, Cirurgia 4, Reanimação, U.C.I. (Unidade de Cuidados Intensivos da Urgência), Urologia, Ortopedia, Obstetrícia, Doenças Infecciosas e Anestesia. As colheitas efectuaram-se durante o ano de 1993.

2.1.3. - ESTIRPES PADRÃO

- *S. aureus* ATCC 25923 (beta-lactâmase negativa) e *S. aureus* ATCC 29213 (beta-lactâmase positiva).
- *S. aureus* P C1 e NCTC 9789 e VU94, produtoras de beta-lactâmases do tipo A.
- *S. aureus* S T 79/741 e 22260, produtoras de beta-lactâmases do tipo B.
- *S. aureus* R N 9 e V137, produtoras de beta-lactâmases do tipo C.
- *S. aureus* FAR 8 e FAR 10, produtoras de beta-lactâmases do tipo D.

As estirpes padrão produtoras de beta-lactâmases foram gentilmente cedidas pelo Doutor Kernodle (Kernodle *et al*, 1990).

As estirpes, após crescimento em gelose sangue a 35°C e durante 24 horas, foram suspensas em Trypticase Soy Broth (Difco), contendo glicerol (15%), e conservadas à temperatura de -70°C até à realização dos ensaios.

2.2. - MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES UTILIZADAS :

2.2.1. - MEIO DE TRANSPORTE DE STUART (Difco), composição:

Glicerofosfato de sódio	10,0 g
Tioglicolato de sódio	0,9 g
Cloreto de cálcio	0,1 g
Azul de metileno	0,002 g
Bacto agar	3,0 g
Água destilada	1000 ml

Suspender 14,1g em 1 litro de água destilada, aquecer até à fervura e deixar dissolver completamente. Distribuir por tubos de ensaio de modo a obter uma altura de meio de aproximadamente 5 mm. Autoclavar a 121°C/15 minutos.

Este meio foi utilizado para o transporte das zangonas nasais do pessoal médico e paramédico de diversos Serviços e Unidades do H.S.João, Porto, para os ensaios dos portadores nasais. Esporadicamente foi utilizado para o transporte de zangonas contendo pús de diversas origens obtidas de pacientes do ambulatório e de doentes internados.

2.2.2. - MEIOS UTILIZADOS PARA ISOLAMENTO, CONSERVAÇÃO E CRESCIMENTO DE ESTIRPES:

2.2.2.1. - TRYPTICASE SOY BROTH (Difco), composição:

Trypticase	17,0 g	
Peptona	3,0 g	
Cloreto de sódio	5,0 g	
Fosfato dissódico	2,5 g	
Bacto- Glucose	2,5 g	
Água destilada	1000 ml	p.H. final - 7

Suspender 30 g em 1 litro de água destilada e aquecer até dissolver completamente. Autoclavar a 121°C/15 minutos. Caldo nutritivo utilizado no crescimento bacteriano. Em algumas experiências foi suplementado com aditivos.

2.2.2.2. - TRYPTICASE SOY BROTH (Difco) COM GLICEROL A 15%.

Utilizamos este meio na conservação das estirpes a-70°C.

2.2.2.3. - MANITOL SALT AGAR (Difco) composição:

Extracto de carne	1,0 g
Proteose peptona nº	310,0 g
Cloreto de sódio	75,0 g
D-manitol	10,0 g
Bacto-agar	15,0 g
Vermelho de fenol	0,025g
Água destilada	1000 ml

p.H. final - 7,4±0,2 a 25°C

Suspender 111g em 1 litro de água destilada. Aquecer até à fervura e deixar dissolver completamente. Esterilizar por autoclavagem a 121°C/15 minutos. Deixar arrefecer e distribuir em placas de Petri em condições assépticas. Usado no isolamento de *S. aureus* a partir de produtos biológicos comprovadamente polimicrobianos. A fermentação do manitol também foi usado como critério de identificação.

2.2.2.4.- CLED AGAR (bioMérieux), composição:

Peptona triptica de gelatina	4,0 g	
Peptona triptica de caseína	4,0 g	
Extractos de carne bovina	3,0 g	
Lactose	10,0 g	
L- Cisteína	0,128g	
Agar	15,0 g	
Azul de bromotimol	0,02 g	
Água destilada	1000 ml	p H final - 7,0

Suspender 36g em 1 litro de água destilada. Aquecer até à fervura e deixar dissolver completamente. Esterilizar por autoclavagem a 121°C/15 minutos. Distribuir assepticamente em placas de Petri.

Usado no isolamento de *S. aureus* a partir de produtos biológicos (pús do ouvido, urina) que possam conter *Proteus* spp.

2.2.2.5. - GELOSE SANGUE, composição:

Peptonas	20,0 g
Extracto de carne	3,0 g
Amido	1,0 g
Cloreto sódio	5,0 g
Bacto-agar	15,0 g

Suspender 44g em 1 litro de água destilada. Aquecer até à fervura e deixar dissolver completamente. Autoclavar a 121°C/15 minutos e deixar arrefecer até 50°C. Adicionar assepticamente sangue de cavalo desfibrinado (5%). Distribuir assepticamente em placas de Petri.

Foi usado como meio rico para o isolamento de *S. aureus*, principalmente para os produtos biológicos contendo baixo teor microbiano.

2.2.3. - MEIOS E REAGENTES UTILIZADOS PARA A IDENTIFICAÇÃO DAS ESTIRPES:

2.2.3.1. - API STAPHYLO (bioMérieux). Conjunto de substratos distribuídos por galerias e que permitem identificar as estirpes de *Staphylococcus*.

2.2.3.2. - MEIO DNase (Difco), composição:

Bacto Tryptose	20,0 g
Ácido deoxiribonucleico	2,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Bacto agar	15,0g

Suspender 42g em 1 litro de água destilada. Aquecer até à fervura e deixar dissolver completamente. Autoclavar a 121°C/15 minutos. Distribuir assepticamente em placas de Petri.

Este meio de cultura permite detectar a produção de DNase (desoxiribonuclease) pelas estirpes de *S. aureus*, após a adição de HCl 1N.

2.2.3.3. - PLASMA DE COELHO LIOFILIZADO (bioMérieux).

Meio usado para detecção da produção da coagulase.

2.2.4. - MEIOS UTILIZADOS PARA TESTES DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS:

2.2.4.1. - MUELLER HINTON II AGAR (bioMérieux), composição :

Infusão de carne bovina	300,0 g	
Peptona clorídrica de caseína	17,5 g	
Amido	1,5 g	
Agar	1,7 g	
Água destilada	1000ml	p.H - 7,3

Cálcio e magnésio em proporções controladas e fraca concentração em timina e timidina.

Suspender em 1 litro de água destilada. Aquecer até à fervura e deixar dissolver completamente. Autoclavar a 121°C/15 minutos. Distribuir asépticamente em placas de Petri, ficando as placas com meio de cultura com uma profundidade de 4 mm.

Este meio de cultura foi utilizado para os ensaios de difusão em agar (método dos discos e " E test ").

2.2.4.2. - MUELLER HINTON BROTH (bioMérieux), composição:

Infusão de carne bovina	300,0 g
Peptona clorídrica de caseína	17,5 g
Amido	1,5 g
Água destilada	1000 ml

Suspender 38g em 1 litro de água destilada. Aquecer até à fervura e deixar dissolver completamente. Autoclavar a 121°C/15 minutos. Distribuir asépticamente por tubos de ensaio.

Este meio foi usado para detectar as CMI_S da meticilina contra estirpes Met^R assim consideradas pelo método dos discos.

2.2.5. - TRYPTICASE SOY BROTH suplementado com 1µg/ml de eritromicina (Sigma). Meio utilizado para a indução das metilases bacterianas, a fim de avaliar o fenótipo da resistência MLS.

2.2.6. - MEIOS UTILIZADOS NA DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO TIPO DE BETA- LACTÂMASES PRODUZIDAS POR *S. AUREUS*.

2.2.6.1. - TRYPTICASE SOY AGAR (DIFCO), composição :

Bacto-trypticase	15,0 g	
Bacto-peptona	5,0 g	
Cloreto de sódio	5,0 g	
Bacto-agar	15,0 g	
Água destilada	1000 ml	pH final 7,0

Suspender 40g em 1 litro de água destilada. Aquecer até à fervura e deixar dissolver completamente. Autoclavar a 121°C/15 minutos. Distribuir asépticamente em placas de Petri. Meio base usado na cultura bacteriana, com ou sem aditivos.

2.2.6.2. - CY- TRIS-METICILINA-AGAR (Kernodle *et al* 1989).Composição:

Sulfato de magnésio	24,7 mg	
Glucose	0,54 g	
Extracto de levedura	1,0 g	
Hidratos de caseína	1,0 g	
Metais (solução)	20,0 µg	
Tris(0,05M)	606,0 mg	
Agar	1,5 g	
Meticilina	0,5 µg/ml	
Água	q. b. p	100 ml
		p.H. final - 7,4

Dissolver todos os constituintes, excepto a metilina, por aquecimento e autoclavar a 121°C/15 minutos. Deixar arrefecer até aproximadamente 50°C e só depois adicionar assepticamente a metilina. Distribuir por placas de Petri. Este meio de cultura foi usado para preparação de suspensões bacterianas para ensaios de hidrólise selectiva de antibióticos, a fim de permitir tipar as beta-lactâmases estafilocócicas.

2.2.6.3. - CY-BROTH. Composição:

β-glicerofosfato	2,6 g
Sulfato de magnésio	24,7 mg
Glucose	0,54 g
Extracto de levedura	1,0 g
Hidrofilizado de caseína	1,0 g
Metais (Solução)	20,0 µl
Água destilada	100 ml

Composição da solução de metais :

Sulfato de cobre	0,5% (peso/volume)
Sulfato de zinco	0,5% "
Sulfato de ferro	0,5% "
Cloreto de magnésio	0,2% "
Ácido clorídrico	10,0% (volume/volume)

Autoclavar a 121°C/15 a 20 minutos. Adicionar assepticamente metilina (0,5 µg/ml) à temperatura de 50°C. Meio utilizado para a preparação de beta-lactâmases e para a detecção de beta-lactâmases.

2.2.7.- SOLUÇÕES UTILIZADAS :

2.2.7.1. - TAMPÃO DE FOSFATO DE SÓDIO 0,1M (pH 6,0). Composição:

12,1ml Solução A + 87,9ml Solução B

SOLUÇÃO A - composição:

Hidrogeno fosfato de sódio, 2 H ₂ O	11,866 g
Água destilada	1000 ml

SOLUÇÃO B - composição :

Hidrogeno fosfato de potássio	9,073 g
Água destilada	1000 ml

2.2.7.2. - TAMPÃO DE FOSFATO DE SÓDIO 0,1M (pH 7,0). composição:

72,6ml da solução A e 27,4 ml da solução B.

2.2.7.3. - SOLUÇÃO SALINA a 1%. Usada para preparar suspensões bacterianas.

2.2.7.4. - SOLUÇÃO AQUOSA DE LYSOSTAPHINA (Sigma) 7,5 mg/ml. Utilizada para lisar as culturas para os ensaios de hibridização.

2.2.7.5. - SOLUÇÃO DE HIDÓXIDO DE SÓDIO 0,5 M e 1 M. Usadas na preparação de fosfato de celulose e ensaios de hibridização, respectivamente.

2.2.7.6. - SOLUÇÃO DE ÁCIDO CLORÍDRICO 0,1N e 0,5M. Usado para a detecção de DNase e preparação de fosfato de celulose, respectivamente.

2.2.7.7. - SOLUÇÃO DE NITROCEFIM (100µM) em tampão de fosfato (pH-7,2).

Usada para a detecção de beta-lactâmases bacterianas pelo método de O' Callaghan et al.,(1972).

2.2.7.8. - SOLUÇÃO HEMI-SATURADA DE SULFATO DE AMÔNIO.

Dissolver 31,3g de sulfato de amônio (MercK) em 100ml de água destilada.

Esta solução destinou-se à preparação de beta-lactâmases purificadas.

2.3. - SONDAS DE DNA

Foram utilizadas nos ensaios de hibridização, sondas de DNA marcadas com P^{32} específicas para a caracterização dos genes de resistência aos aminoglicosídeos-aminociclitois, cedidas pela Schering Plough Research Institute N. Jersey, U.S.A.

2.3.1. - MEMBRANAS DE HIBRIDIZAÇÃO - cedidas, gentilmente pela Schering-Plough Research Institute, N.Jersey, U.S.A.

2.4. - PREPARAÇÃO DE BETA-LACTÂMASES PURIFICADAS (Kernodle et al, 1990):

A partir das culturas bacterianas em gelose inclinada (Trypticase Soy agar), fazer uma suspensão em 3-5 ml de Cy-broth ($\cong 10^8$ U.F.C/ml) e adicionar a 500 ml de Cy-broth com meticilina (0,5 μ g/ml). O caldo é incubado com agitação a 35°C durante 16 horas. A cultura é centrifugada a 7.000 g/15 minutos.

O sobrenadante é filtrado por membranas esterilizantes (0.45 μ). Adicionar o filtrado à suspensão de fosfato de celulose (15 g) e agitar à temperatura ambiente durante 45 minutos. Deixar depositar e rejeitar o sobrenadante.

Lavar o fosfato de celulose com tampão de fosfato 0,5M (pH 7.2), usando papel Whatman e sucção num funil de porcelana.

Fazer a eluição das beta-lactâmases do fosfato de celulose com 25-50 ml de solução saturada a 50% de sulfato de amônio (pH 7.8).

O eluente é concentrado até 2-4 ml usando uma membrana YM10 (Amycon, Denvers, Mass.)

Conservar no frigorífico a 4°C até à realização dos ensaios.

Determinar o teor proteico pelo método de Bradford (Bradford, 1966).

2.4.1. - PREPARAÇÃO DO FOSFATO DE CELULOSE (Kernodle *et al*, 1990).

Agitar 10 g de fosfato de celulose em 150 ml de NaOH 0,5M. Deixar em repouso durante 60 minutos. Filtrar ou decantar. Lavar a resina com água destilada até pH 8.0.

Agitar a resina em 150 ml de HCL 0,5M e deixar em repouso durante 30 minutos. Filtrar ou decantar. Lavar a resina com água destilada até o filtrado dar reacção neutra.

Adicionar azida sódica (0,1%). No momento de usar: filtrar ou decantar e lavar com tampão de fosfato 0,1M (pH 7.2).

2.5. - ANTIBIÓTICOS UTILIZADOS NOS TESTES DE SUSCEPTIBILIDADE:

Foram utilizados discos de papel impregnados com oxacilina (1 μ g), penicilina (10 μ g), amoxicilina (25 μ g), amoxicilina + ácido clavulânico (10 + 10 μ g), piperacilina (100 μ g), piperacilina + tazobactam (75+10 μ g), imipenemo (10 μ g), cefalotina (30 μ g), cefalexina (30 μ g), cefuroxima (30 μ g), cefamandol (30 μ g), cefoxitina (30 μ g), cefotaxima (30 μ g), ceftriaxona (30 μ g), ceftazidima (30 μ g), eritromicina (2 μ g), claritromicina (15 μ g), espiramicina (100 μ g), lincomicina (2 μ g), clindamicina (2 μ g), virginiamicina (15 μ g), tetraciclina (30 μ g), minociclina (30 μ g), rifampicina (30 μ g), fosfomicina (50 μ g), ácido fusídico(10 μ g), vancomicina (30 μ g), teicoplanina (30 μ g), cloranfenicol (30 μ g), trimetoprim-sulfametoxazol (1,25+23,75 μ g), gentamicina (10 μ g), netilmicina (30 μ g) amicacina (30 μ g), tobramicina (10 μ g), canamicina (30 μ g), neomicina (30 μ g), ciprofloxacina (5 μ g), mupirocina (5 μ g).

Os discos foram fornecidos pela Oxoid (Inglaterra) e bioMerieux (França).

Discos de papel impregnados com: isepamicina (30 μ g), 5-episisomicina(10 μ g), 2-N-etil-netilmicina (100 μ g), apramicina (100 μ g), foram gentilmente cedidos pela Shering Plough Research Institute, N.Jersey, U.S.A.

2.5.1- ANTIBIÓTICOS UTILIZADOS NA DETERMINAÇÃO DA C.I.M. " E test"

Foram usadas tiras de plástico impregnadas com: Penicilina G, ampicilina, oxacilina, cefuroxima, cefoxitina, cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima, cefalotina, piperacilina,

piperacilina + tazobactam, (4 μ g/ml), amoxicilina + ácido clavulânico (2:1), imipenemo, vancomicina, eritromicina, ácido fusídico e clindamicina.

As tiras foram fornecidas pela AB Biodisk (Solna, Suécia).

2.5.2. - ANTIBIÓTICOS UTILIZADOS NA CARACTERIZAÇÃO DO TIPO DE BETA-LACTÂMASES:

Nitrocefim (Oxoid, Inglaterra), Cefazolina (Sigma), Cefaloridina (Sigma) em tampão de fosfatos (pH 6,0).

2.5.3. - INIBIDORES DE BETA-LACTÂMASES UTILIZADOS NOS ENSAIOS DE HIDRÓLISE:

Foram utilizados, ácido clavulânico e tazobactam em pó, gentilmente cedidos pelos Laboratórios Beecham e Cyanamid Lederle, respectivamente.

2.6. - MÉTODOS:

2.6.1.- ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DAS ESTIRPES:

Foram estudadas 686 estirpes (474 hospitalares e 212 ambulatorias) de *S. aureus* considerados responsáveis por patologias infecciosas diversas, cuja proveniência já foi mencionada. As colheitas foram efectuadas durante o ano de 1991-1992. As estirpes de *S. aureus* foram isoladas primariamente em Gelose sangue, Manitol salt agar ou Cled agar consoante a origem do produto biológico. Após purificação, as estirpes foram classificadas pela morfologia, Gram, coagulase, DNase e pelo sistema API para estafilococos.

As zaragoas nasais do pessoal médico e paramédico do H.S.João foram transportadas em meio de Stuart até à realização dos ensaios de identificação.

2.6.2. - ENSAIOS DE SUSCEPTIBILIDADE:

A susceptibilidade aos antibióticos foi determinada pelo método de difusão em agar seguindo os critérios do National Comitee for Clinical Laboratory Standards (1988), e utilizando discos de papel impregnados com concentrações dos diferentes antibióticos, usando placas de Petri contendo 4mm de espessura de Mueller Hinton II agar (bioMérieux) e inoculadas com uma suspensão bacteriana equivalente a 0,5 unidade Mac Farland. A incubação foi efectuada a 37°C durante 18-24 horas.

Os diâmetros dos halos de inibição à volta dos discos foram rigorosamente medidos em mm e traduzidos em susceptível, pouco susceptível e resistente de acordo com as normas do NCCLS (1988).

Por cada placa foram ensaiados apenas 6 discos de antibióticos,(Fig.1). Simultaneamente com as estirpes clínicas foi diariamente utilizada a estirpe ATCC 25923, como controlo da técnica usada e para avaliar a potência dos discos em cada lote.

A detecção da resistência à meticilina foi efectuada com discos de oxacilina (1µg) colocados à superfície de placas com Mueller Hinton II agar, com incubação a 30°C durante 24-48horas, ou em Mueller Hinton II agar suplementado com NaCl (5%) e incubado a 37°C durante 24-48horas (Fig.1a). Estes ensaios foram efectuados recorrendo a uma suspensão bacteriana equivalente a 0,5-1 unidade Mac Farland. A detecção da resistência à meticilina foi confirmada pela avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) em caldo de Mueller Hinton suplementado com 4% de NaCl e inoculadas aproximadamente com 10^8 U.F.C/ml (Sabath, 1977).



Fig. 1 - Estirpe de *S. aureus* cultivada em M. Hinton agar impregnado com discos de papel contendo antibióticos. E₁₅ - Eritrmicina; SXT - Trimetoprim-sulfametoxazol; C₃₀ - Cloranfenicol; SA₁₅ - Espiramicina; CLR₁₅ - Claritromicina; CC₂ - Clindamicina.

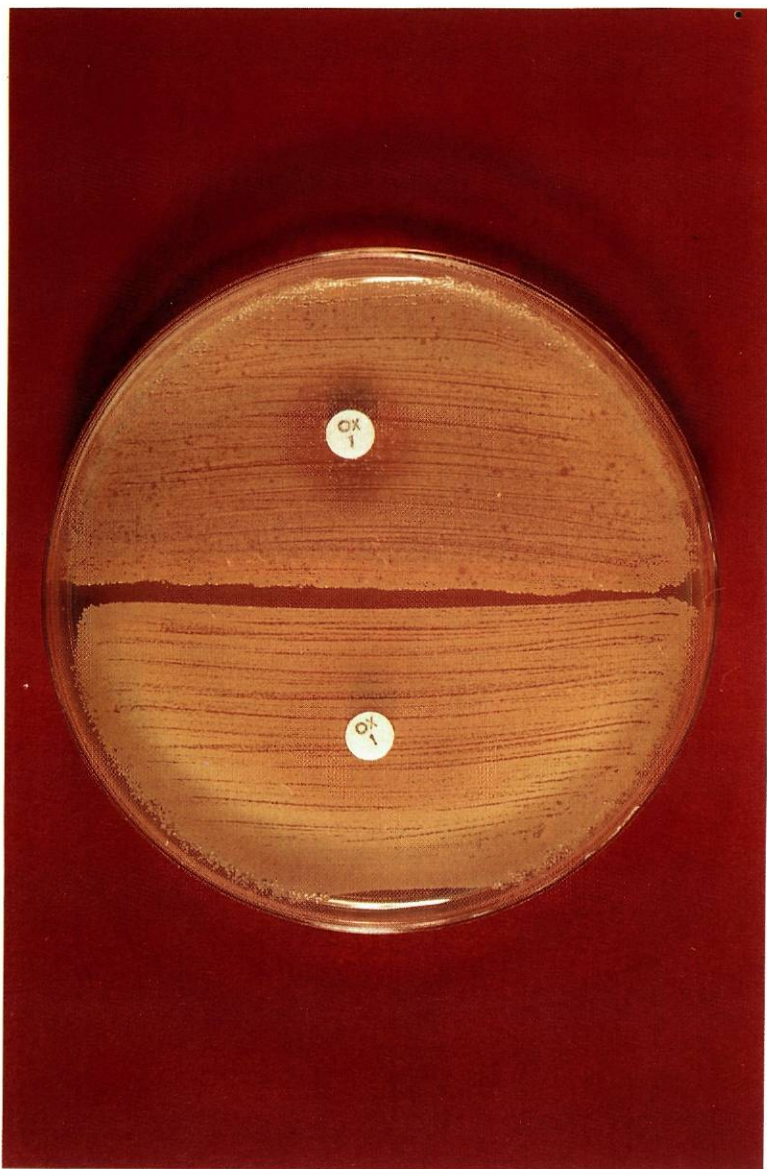


Fig. 1a - Duas estirpes de *S. aureus* MetR^R semeadas em M. Hinton agar suplementado com NaCl 5%, incubados a 37°C durante 48 horas. Notar o crescimento das estirpes à volta dos discos de oxacilina (1 µg).

2.6.3 - DETERMINAÇÃO DA CIM ($\mu\text{g/ml}$)

Utilizamos o " E test " (Backer *et al*, 1991). Tiras plastificadas fornecidas por AB Biodisc (Solna, Suécia) impregnadas de um lado com uma solução de antibiótico num gradiente de concentração contínuo e colocados no centro da placa de Petri contendo Mueller Hinton II agar com uma profundidade de 4mm. As placas foram previamente inoculadas com uma suspensão bacteriana equivalente a 0,5 unidade Mac Farland pelo método de zaragatoa (Figs. 2 e 3). Na maioria dos testes foram determinados dois valores da CIM por placa, inoculando, respectivamente, duas estirpes de *S. aureus* em cada meia placa de Mueller Hinton II agar (fig. 4). No E test foram utilizados os antibióticos já descritos. A avaliação da CIM da oxacilina foi efectuada com Mueller Hinton II agar suplementado com NaCl, nas condições descritas anteriormente.

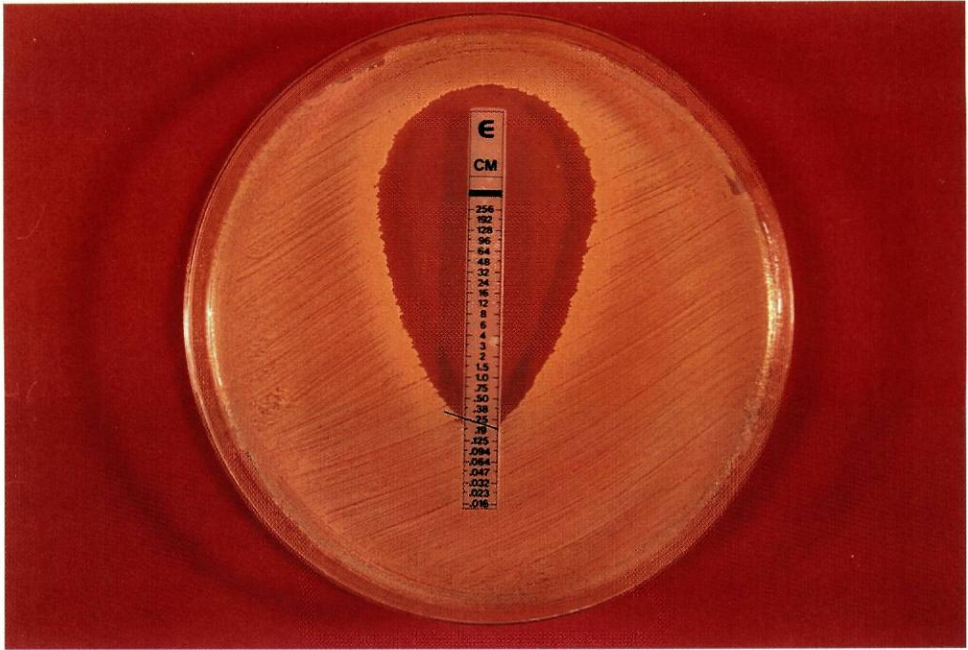


Fig 2 - Avaliação da C.I.M. da cefuroxima (CM) contra uma estirpe de *S. aureus*, em M Hinton agar, pelo "E test". Notar que o valor da C.I.M. é de 0,25 μml.

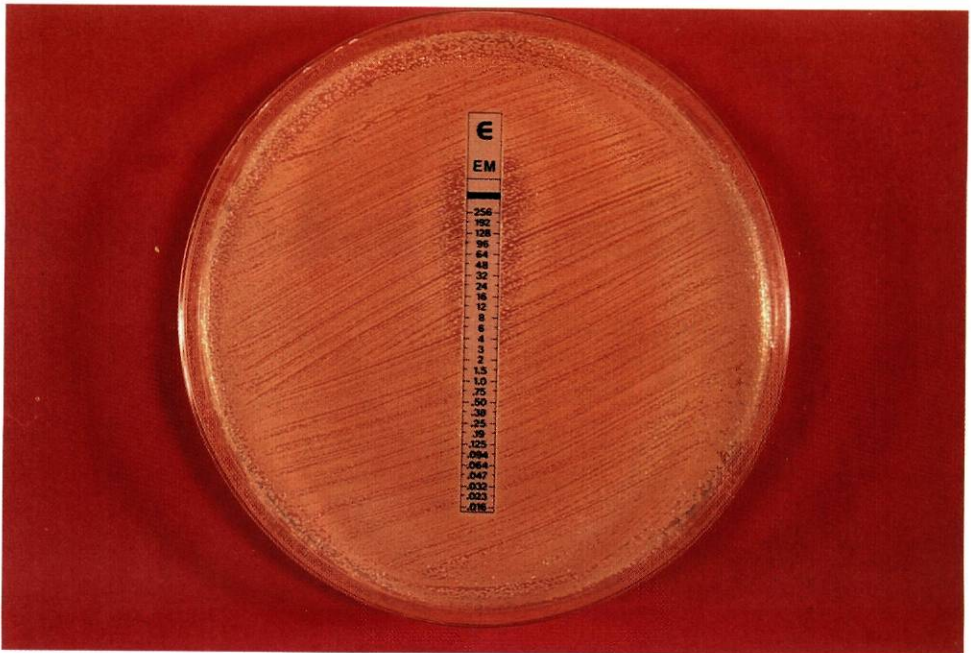


Fig 3 - C.I.M. da entromicina (> 256 μ/ml) contra uma estirpe de *S. aureus*, realizada nas mesmas condições da figura 2.



Fig. 4 - Determinação das C.I.M. da cefalotina (CT), pelo "E test", para duas estirpes semeadas em cada meia placa de M. Hinton agar. Notar que a cefalotina tem contra a estirpe (à esquerda) o valor de C.I.M. igual a 1,0 $\mu\text{g/ml}$ e contra a outra estirpe (à direita) o valor de C.I.M. igual a 0,50 $\mu\text{g/ml}$.

2.6.4. - TESTE DE DETECÇÃO DAS BETA-LACTÂMASES

As estirpes foram cultivadas em Cy-broth com metilina durante a noite a 37°C, com uma agitação de 120 r.p.m. Uma gota de cultura foi misturada, em placa de porcelana, com uma gota de solução de nitrocefim (100µM) em tampão fosfato a pH 7,2, conforme descrito por O' Callaghan *et al.* (1972). Os resultados foram lidos ao fim de 5-10 minutos, e as estirpes *S. aureus* ATCC 25923 e ATCC 29213 foram utilizadas como controlo negativo e positivo, respectivamente.

2.6.5. - DETERMINAÇÃO DO TIPO DE BETA-LACTÂMASES :

Fizemos a caracterização das beta-lactâmases elaboradas por 288 estirpes (188 hospitalares e 100 ambulatorias) de *S. aureus*. Cem das estirpes hospitalares eram resistentes à metilina (Met^R) e produtoras de beta-lactâmases. Usamos as estirpes padrão atrás mencionadas, gentilmente cedidas por Kernodle, e seguimos a metodologia recomendada por este autor (Kernodle *et al* 1989,1990).

As estirpes cultivadas em Trypticase Soy agar foram suspensas em solução salina (1%), ajustando-se a densidade a 0,5 unidade MacFarland em densitómetro adequado (bioMerieux). Cultivaram-se de seguida em Cy-Tris-Metilina-agar. Após 14h exactas de incubação a 35°C, 10-20 colónias foram suspensas em tampão de fosfatos 0,1M (pH 6,0) e ajustada a densidade do inóculo a 40% de transmitância em Spectronic 200 ($A_{415} = 0,40$).

Para os ensaios enzimáticos, 0,1 ml da suspensão bacteriana foi adicionada a 0,9 ml da solução de nitrocefim (concentração final 100 µM) em tampão de fosfatos (pH 6.0). Para a cefazolina e cefaloridina foram usados 0.67 ml da suspensão bacteriana e 0,33 ml da solução de antibiótico (concentração final 100 µM) em tampão de fosfatos (pH 6,0).

A cinética enzimática foi avaliada em cuvetes de 1 cm a 37° C em espectrofotómetro UV Shimadzu 2100, durante 5 minutos, conforme descrito por Kernodle et Zygmunt (Kernodle *et al.* 1989, Kernodle *et al.* 1990, Zygmunt *et al.* 1992), a 482 nm, 272 nm e 254nm, respectivamente , para nitrocefim, cefazolina e cefaloridina .

A actividade beta-lactamásica é expressa em µM/min/mg de proteína. A concentração proteica das amostras foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, MM, 1966).

Os ensaios enzimáticos para cada estirpe foram realizados em duplicado. Os *ratios* cefazolina/cefaloridina e nitrocefim/cefazolina foram usados para a classificação das beta-lactâmases (Kernodle *et al* 1989,1990; Rosdahl VT 1993, Gradelski *et al*, 1993).

Para algumas estirpes foi também utilizado o método das beta-lactâmases purificadas, a fim de comparar os resultados de hidrólise observadas com as suspensões bacterianas.

2.6.6. - ENSAIOS DE INIBIÇÃO DAS BETA-LACTÂMASES PELO ÁCIDO CLAVULÂNICO E TAZOBACTAM.

A hidrólise da amoxicilina e piperacilina foi feita com as beta-lactâmases purificadas. Os ensaios foram realizados a pH 7,0 em tampão de fosfato 0,1M. A cinética de hidrólise foi realizada com 50 µl de uma solução de beta-lactâmase adicionada a 1ml de uma solução 0,2 mM de amoxicilina ou piperacilina. As misturas foram colocadas em banho-maria a 37°C e o declínio da absorbância foi efectuado num espectrofotómetro Shimazu a 235 nm para a piperacilina ou a 240 nm para a amoxicilina. Os valores de Km foram determinados pelo método referido por Nichols et Hewinson, 1987.

Para os ensaios de inibição: 667 µl da enzima diluída foi pré-incubada por 10 minutos a 37°C com 333 µl de várias concentrações de ácido clavulânico ou tazobactam, em tampão fosfato 0,1M a pH 7,0. Como substrato adicionou-se 100 µl de nitrocefim 1µM e a absorbância foi medida a 482 nm.

Estes ensaios foram realizados em auto-analisador Cobas Mira (Roche Farm^a-Química, Lda)

2.6.7.- ENSAIOS DE INDUÇÃO DA RESISTÊNCIA MLS:

Efectuamos os testes de susceptibilidade aos antibióticos (eritromicina, claritromicina, espiramicina, lincomicina, clindamicina e virginiamicina), seguindo os critérios acima mencionados. Determinamos as C.I.M (µg/ml) da eritromicina e clindamicina pelo " E test " conforme mencionado. Procedemos a ensaios de indução da resistência MLS do seguinte modo:

Uma estirpe resistente à eritromicina/claritromicina (C.I.M.>8µg/ml) foi cultivada em Trypticase Soy Broth suplementado com 1µg/ml de eritromicina (Sigma), à temperatura de 35°C e com agitação (120 r.p.m.). A partir da cultura, antes e após 1,2 ou 4 horas de indução, foi avaliada a CIM da clindamicina em Mueller Hinton II agar, pelo " E test ", conforme descrito anteriormente.

2.6.8. - CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA RESISTÊNCIA BACTERIANA AOS ANTIBIÓTICOS AMINOGLICOSÍDEOS-AMINOCICLITOIS:

Usando as técnicas de difusão em agar convencionais foi estudado o perfil de susceptibilidade de 52 estirpes de *S. aureus*, co-resistentes à gentamicina e metilicina, usando discos de: canamicina (30µg), neomicina (30µg), tobramicina (10µg), netilmicina (30µg), ampicacina (30µg), isepamicina (30µg), 5-episisomicina (10µg), 2'-N-etil-netilmicina (100µg), 6'-N-etil-netilmicina (100µg), fortimicina (100µg) e apramicina (100µg).

Utilizamos uma cultura de 48h em caldo nutritivo (Trypticase Soy Broth). A 200 µl de uma suspensão das referidas células adicionamos 15µl de uma solução aquosa de lysostaphina. Depois de incubar a 37°C durante 30 minutos com agitação juntamos 200µl de NaOH 1N. Foram distribuídos 10 µl do lisado de suspensão de células nos respectivos locais das membranas de hibridização. Depois de secas as membranas à temperatura ambiente foram usadas sondas de DNA marcadas com P³² específicas para os genes de resistência aos aminoglicosídeos-aminociclitois, segundo as técnicas de Shaw (Shaw *et al* 1991, 1993)

2.6.9. - FAGOTIPIA:

Duzentas e cinquenta estirpes consideradas patogénicas (62 Met^R e 188 Met^S) de *S. aureus* responsáveis por diversas patologias foram tipadas usando os fagos do conjunto básico internacional (Smith PD *et al*, 1972), tendo sido este estudo realizado no Instituto Câmara Pestana em Lisboa, dirigido pelo Ex^{mo} Senhor Professor Torres Pereira.

Pelo mesmo método foram tipadas vinte e duas estirpes de *S. aureus* oriundas de portadores assintomáticos de pessoal médico e paramédico de vários Serviços e Unidades do H.S.João, Porto. Algumas estirpes foram tipadas com auxílio do Prof. Dr. A. Corcina, Escola de Medicina Dentária do Porto.

2.6.10.- MÉTODO SEGUIDO NO ESTUDO DE PORTADORES DE STAPHYLOCOCCUS:

Procedemos ao isolamento e identificação de *Staphylococcus* oriundos das fossas nasais de 71 médicos e paramédicos escolhidos aleatoriamente e pertencentes a diversos Serviços e Unidades do H.S.João, utilizando sistematicamente gelose sangue.

Após a identificação, as estirpes foram conservadas a -70°C até à realização dos ensaios, conforme descrito previamente.

Pelo método de difusão em agar segundo os critérios do NCCLS, procedemos à realização dos antibiogramas utilizando os seguintes antibióticos nas concentrações já referidas: penicilina, amoxicilina + ácido clavulânico, cefalexina, gentamicina, netilmicina, cloranfenicol, eritromicina, trimetoprim-sulfametoxazol, vancomicina, ácido fusídico, ciprofloxacina e mupirocina. Detectamos a resistência à metilina pelo método já mencionado.

Nas estirpes de *S. aureus* isoladas foi determinado o tipo de beta-lactâmases pela hidrólise enzimática de nitrocefim, cefazolina e cefaloridina. Foi igualmente efectuado o estudo do tipo fágico.

Estes ensaios foram realizados nas condições indicadas para as estirpes patogénicas de *S. aureus*.

2.7. ESTATÍSTICA- Os dados referidos em Material e Métodos foram submetidos a testes estatísticos, pelos métodos mencionados nos resultados.

3 - RESULTADOS

3.1. ESTIRPES PATOGÉNICAS DE *S. AUREUS* E SUA ORIGEM:

Neste estudo foram utilizadas 686 estirpes patogénicas de *S. aureus* (474 hospitalares e 212 ambulatorias) isoladas a partir de diversos produtos biológicos, sendo predominantemente isoladas a partir de pús (feridas diversas, catéteres) e de produtos do tracto respiratório inferior (líquido pleural, expectorações e secreções brônquicas), conforme está indicado no Quadro I.

QUADRO I: Origem Biológica das 686 estirpes de *S. aureus*

ORIGEM	Nº estirpes isoladas (%)	
Tracto respiratório inferior (liq. pleural, expectoração e sec.brônquicas)	270	(39,4%)
Pús (feridas diversas, catéteres)	265	(38,6%)
Sangue (hemocultura)	29	(4,2%)
Tracto genito-urinário (urina, ex. vaginal)	100	(14,6%)
Tracto respiratório superior (ex. faringeo, nasal, ex. auditivo)	15	(2,2%)
Fezes	7	(1,0%)

Cento e cinquenta (31,6%) das 474 estirpes hospitalares são resistentes à meticilina (Met^R) e as restantes 536 estirpes hospitalares e ambulatorias são susceptíveis à meticilina (Met^S) e são obtidas predominantemente a partir de pús e de produtos do tracto respiratório inferior, conforme está indicado nos Quadros II e III.

QUADRO II: Origem Biológica das 150 estirpes de *S. aureus* Met^R

ORIGEM	Nº estirpes isoladas (%)
Tracto respiratório inferior (liq. pleural, expectoração e sec.brônquicas)	71 (47,4%)
Pús (feridas diversas, catéteres)	56 (37,3%)
Sangue (hemocultura)	13 (8,7%)
Tracto genito-urinário (urina, ex. vaginal)	8 (5,3%)
Tracto respiratório superior (ex. faringeo, nasal, ex. auditivo)	0 (0,0%)
Fezes	2 (1,3%)

QUADRO III: Origem Biológica das 150 estirpes de *S. aureus* Met^S

ORIGEM	Nº estirpes isoladas (%)
Tracto respiratório inferior (liq. pleural, expectoração e sec.brônquicas)	199 (37,2%)
Pús (feridas diversas, catéteres)	209 (39,0%)
Sangue (hemocultura)	16 (3,0%)
Tracto genito-urinário (urina, ex. vaginal)	92 (17,1%)
Tracto respiratório superior (ex. faringeo, nasal, ex. auditivo)	15 (2,8%)
Fezes	5 (0,9%)

Em 171 dos doentes hospitalizados foi possível saber a idade e sexo (Fig. 5).

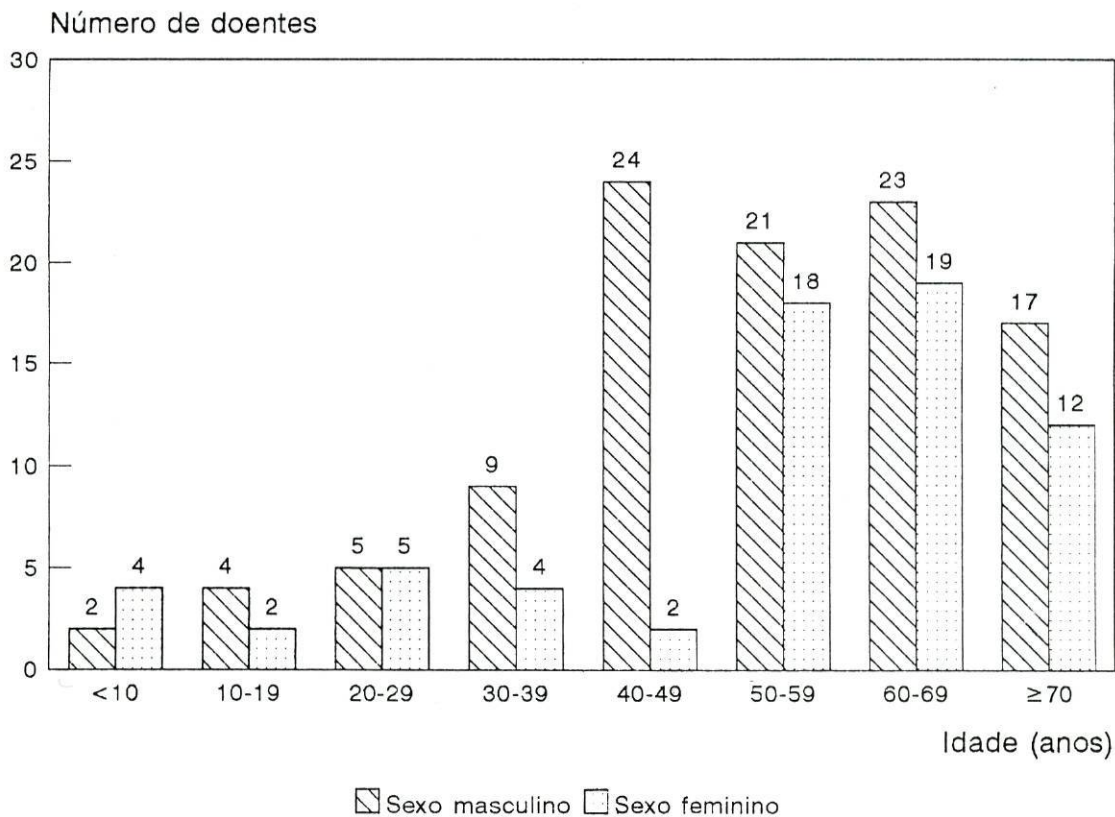


Fig. 5 - Distribuição dos doentes hospitalizados por sexo e grupos etários (n=171).

3.2. COMPORTAMENTO *IN VITRO* DAS ESTIRPES PATOGENICAS DE *S. AUREUS* FACE AOS ANTIBIÓTICOS:

Os testes de difusão em agar de *S. aureus* (474 estirpes hospitalares e 212 estirpes ambulatorias) revelaram uma elevada frequência (%) de resistência aos antibióticos: beta-lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas e carbapenemos), não beta-lactâmicos (aminoglicosídeos-aminociclitois, macrólidos, cloranfenicol, lincosamidas, tetraciclinas, fosfomicina); outros antimicrobianos (quinolonas e sulfonamidas). Observou-se ausência de resistência à vancomicina, teicoplanina e mupirocina (Quadros IV e V).

QUADRO IV: Frequência (%) da Resistência, *in vitro*, das Estirpes Patogénicas de *S. aureus* aos Antibióticos Antiparietais (beta-lactâmicos, fosfomicina e glicopeptídeos).

	Hospitalares (n=474)	L.C.	Ambulatorias (n=212)	L.C.	p
Penicilina G	454(95,8%)	93,6-97,3%	200(94,3%)	90,4-96,7%	26%**
Oxacilina/Meticilina	150(31,6%)	27,6-36,0%	0	< 1,8%	inf. ^{al}
Amoxicilina/Ampicilina	454(95,8%)	93,6-97,3%	200(94,3%)	90,4-96,7%	26%**
Amoxicilina+Ác. Clavulânico	150(31,6%)	27,6-36,0%	0	< 1,8%	inf. ^{al}
Piperacilina	454(95,8%)	93,6-97,3%	200(94,3%)	90,4-96,7%	26%**
Piperacilina+Tazobactam	150(31,6%)	27,6-36,0%	0	< 1,8%	inf. ^{al}
Imipenemo	82(17,2%)	14,2-21,0%	0	< 1,8%	inf. ^{al}
Cefalotina	116(24,4%)	20,8-28,5%	0	< 1,8%	inf. ^{al}
Cefamandol	116(24,4%)	20,8-28,5%	0	< 1,8%	inf. ^{al}
Cefuroxima	150(31,6%)	27,6-36,0%	0	< 1,8%	inf. ^{al}
Cefoxitina	150(31,6%)	27,6-36,0%	0	< 1,8%	inf. ^{al}
Cefotaxima	150(31,6%)	27,6-36,0%	0	< 1,8%	inf. ^a
Ceftazidima	150(31,6%)	27,6-36,0%	0	< 1,8%	inf. ^{al}
Ceftriaxona	150(31,6%)	27,6-36,0%	0	< 1,8%	inf. ^a
Fosfomicina	25 (5,3%)	3,6-7,7%	4(1,9%)	3,0%	3%*
Vancomicina	0	< 0,8%	0	< 1,8%	-
Teicoplanina	0	< 0,8%	0	< 1,8%	-

* significativo

** não significativo

p - teste da probabilidade exacta de Fisher

L.C. - limites de confiança para 95%

QUADRO V: Frequência (%) da Resistência, *in vitro*, das Estirpes Patogênicas de *S. aureus* aos Antibióticos Inibidores da Síntese Proteica (aminoglicosídeos-aminociclitolis, tetraciclina, antibióticos MLS, cloranfenicol, rifampicina) e outros antimicrobianos (trimetoprim-sulfametoxazol e ciprofloxacina).

	Hospitalares (n=474)	L.C.	Ambulatórias (n=212)	L.C.	p
Gentamicina	140(29,5%)	25,6-33,8%	20 (9,4%)	6,2-14,1%	inf.al
Netilmicina	16 (3,4%)	2,1-5,4%	2 (0,9%)	0,3-3,4%	4,89%*
Tobramicina	20 (4,2%)	2,8-6,4%	2 (0,9%)	0,3-3,4%	1,5%**
Amicacina	16 (3,4%)	2,1-5,4%	2 (0,9%)	0,3-3,4%	4,89%*
Isepamicina	16 (3,4%)	2,1-5,4%	2 (0,9%)	0,3-3,4%	4,89%*
Tetraciclina	140(29,5%)	25,6-33,8%	28(13,2%)	9,3-18,4%	inf.al
Minociclina	75(15,8%)	12,8-19,4%	17 (8,0%)	5,1-12,5%	3% ^{oo} ***
Eritromicina	148(31,2%)	27,2-35,5%	12 (5,6%)	3,3-9,6%	inf.al
Claritromicina	148(31,2%)	27,2-35,5%	6 (2,8%)	1,3-6,0%	inf.al
Espiramicina	90(19,0%)	15,7-22,8%	6 (2,8%)	1,3-6,0%	inf.al
Clindamicina	90(19,0%)	15,7-22,8%	6 (2,8%)	1,3-6,0%	inf.al
Lincomicina	108(22,8%)	19,2-26,8%	8̄ (3,8%)	1,9-7,3%	inf.al
Virginiamicina	3 (0,6%)	0,2-1,8%	0	< 1,8%	33,0%****
Cloranfenicol	6 (1,3%)	0,6-2,7%	0	< 1,8%	11,0%****
Rifampicina	18 (3,8%)	2,4-5,9%	2 (0,9%)	0,3-3,4%	2,8%**
Ácido Fusídico	6 (1,3%)	0,6-2,7%	6 (2,8%)	1,3-6,0%	-
Mupirocina	0	< 0,8%	0	< 1,8%	-
Trimetoprim-sulfametoxazol	94(19,8%)	16,5-23,7%	12 (5,6%)	3,3-9,6%	inf.al
Ciprofloxacina	46 (9,7%)	7,4-12,7%	2 (0,9%)	0,3-3,4%	inf.al

* sugestivo

** significativo

*** altamente significativo

**** não significativo

p - teste da probabilidade exacta de Fisher

L.C. - limites de confiança para 95%

A detecção das beta-lactâmases pelo teste do nitrocefim mostrou que apenas 28(5,8%) das estirpes hospitalares (22 Met^S e 6 Met^R) e 12 (5,6%) das estirpes ambulatorias não eram produtoras de beta-lactâmases mesmo quando cultivadas em caldo nutritivo suplementado com 1µg/ml de meticilina.

Observou-se tanto nas estirpes hospitalares (95,8%) como nas ambulatorias (94,3%) uma elevada resistência às penicilinas clássicas (penicilinas, amoxicilina e piperacilina).

Observou-se uma redução significativa da resistência à oxacilina, representando neste estudo as isoxazolilpenicilinas. É particularmente significativa a diferença na % de resistência entre as estirpes hospitalares e ambulatorias ($p = \text{inf}^{\text{al}}$).

A adição de ácido clavulânico à amoxicilina e de tazobactam à piperacilina ampliou a actividade destas penicilinas, diminuindo, respectivamente, a frequência da resistência para 31,6% nas estirpes hospitalares e para 0% nas estirpes ambulatorias. Estes resultados confirmam a importância das beta-lactâmases na inactivação dos antibióticos beta-lactâmicos (QuadroIV), particularmente em ambiente ambulatorio.

Em 150 (31,6%) estirpes hospitalares de *S. aureus* foi detectada a resistência à meticilina/oxacilina (Met^R) pelo crescimento em M.Hinton agar II suplementado com NaCl, à temperatura de 37°C durante 48 horas, conforme indicado em Material e Métodos (QuadroIV). Nas estirpes de *S. aureus* ambulatorias não foi detectado este fenómeno.

Em 150 estirpes foi ensaiada a detecção da resistência à meticilina por crescimento a 30°C. Exceptuando 5 estirpes Met^R com fenótipo homogéneo, as restantes estirpes revelaram um comportamento heterogéneo de resistências à meticilina/oxacilina.

Nestes ensaios, em algumas estirpes, detectamos a meticilina resistência com diferentes densidades de inóculo e com diferentes tempos de incubação. A detecção da meticilina resistência foi mais nítida com inóculos de 10^7 U.F.C./ml, com tempos de incubação de 48 horas.

A correlação dos valores de U.F.C./ml das estirpes, respectivamente, em meio de cultura com e sem meticilina, permitiram definir o fenótipo das resistências, homogéneo e heterogéneo.

A sub-divisão das 686 estirpes em 150 estirpes Met^R e 536 Met^S mostrou que as estirpes hospitalares de *S. aureus* Met^R apresentam uma elevada incidência de resistência cruzada com os antibióticos não beta-lactâmicos, sendo significativas, na

maioria dos antibióticos, as diferenças de resistência entre as estirpes Met^R e Met^S. (Quadro VI).

Foi observada sistematicamente uma maior incidência (%) de resistências nas estirpes Met^R do que nas Met^S, sendo de destacar nas estirpes Met^R que:

1º) a netilmicina (9,3%) é mais activa, *in vitro*, significativamente, do que a gentamicina (80,0%), amicacina (10,7%), tobramicina (10,7%) e isepamicina (10,7%);

2º) a quinolona ciprofloxacina (30,7%) exhibe, *in vitro*, uma fraca actividade;

3º) a tetraciclina (90,7%) e a minociclina (56,0%) exibem, *in vitro*, pouca actividade;

4º) os macrólidos de 14 átomos (eritromicina e claritromicina = 92%) exibem pouca actividade, sendo a actividade do macrólido de 16 átomos espiramicina (56,0%) e da clindamicina (53,4%) superior. A virginiamicina tem uma excelente actividade (2,0%);

5º) a fosfomicina (16,7%) e a rifampicina (10,8%) têm uma actividade média;

6º) o cloranfenicol (6,0%) e o ácido fusídico (4,0%) têm boa actividade;

7º) a vancomicina, teicoplanina e mupirocina têm uma actividade plena contra *S. aureus*.

As estirpes de *S. aureus* Met^S são em geral susceptíveis aos antibióticos não beta-lactâmicos, sendo de destacar a total susceptibilidade ao cloranfenicol, ácido fusídico, virginiamicina, mupirocina, teicoplanina e vancomicina. Apenas se observou resistência à lincomicina (30,4%), gentamicina (9,3%) e tetraciclina (6,0%).

QUADRO VI: Frequência (%) da Resistência aos Antibióticos não Beta-lactâmicos observada nas Estirpes Patogênicas de *S. aureus* sensíveis (Met^S) e resistentes (Met^R) à meticilina.

	Met ^R (n=150)	L.C.	Met ^S (n=536)	L.C.	p
Gentamicina	120(80,0%)	72,9-85,6%	50 (9,3%)	7,2-12,1%	inf.al
Netilmicina	14(9,3%)	5,6-15,1%	4 (0,7%)	0,3-1,9%	inf.al
Tobramicina	16(10,7%)	6,7-16,6%	4 (0,7%)	0,3-1,9%	inf.al
Amicacina	16(10,7%)	6,7-16,6%	2 (0,4%)	0,1-1,4%	inf.al
Isepamicina	16(10,7%)	6,7-16,6%	2 (0,4%)	0,1-1,4%	inf.al
Ciprofloxacina	46(30,7%)	23,9-38,5%	2 (0,4%)	0,1-1,4%	inf.al
Tetraciclina	136(90,7%)	84,9-94,4%	32 (6,0%)	4,3-8,3%	inf.al
Minociclina	84(56,0%)	48,0-63,7%	8 (1,5%)	0,8-2,9%	inf.al
Cloranfenicol	6 (4,0%)	1,9-8,5%	0	< 0,7%	0,1‰*
Trimetoprim-sulfametoxazol	94(62,7%)	54,7-70,0%	12 (2,2%)	1,3-3,9%	inf.al
Ácido Fusídico	6 (4,0%)	1,9-8,5%	0	< 0,7%	0,1‰*
Rifampicina	16(10,7%)	6,7-16,6%	4 (0,7%)	0,3-1,9%	inf.al
Eritromicina	138(92,0%)	86,5-95,4%	22 (4,1%)	2,8-6,1%	inf.al
Claritromicina	138(92,0%)	86,5-95,4%	22 (4,1%)	2,8-6,1%	inf.al
Espiramicina	84(56,0%)	48,0-63,7%	12 (2,2%)	1,3-3,9%	inf.al
Clindamicina	84(56,0%)	48,0-63,7%	12 (2,2%)	1,3-3,9%	inf.al
Lincomicina	98(65,3%)	57,4-72,5%	18 (3,4%)	2,1-5,3%	inf.al
Virginiamicina	3 (2,0%)	0,7-5,7%	0	< 0,7%	1,0‰**
Fosfomicina	25(16,7%)	11,6-23,5%	4 (0,7%)	0,3-1,9%	inf.al
Vancomicina	0	< 2,5%	0	< 0,7%	—
Teicoplanina	0	< 2,5%	0	< 0,7%	—
Mupirocina	0	< 2,5%	0	< 0,7%	—

* altamente significativo

** significativo

p - teste da probabilidade exacta de Fisher

L.C. - limites de confiança para 95%

Os valores de CIM($\mu\text{g/ml}$), avaliados pelo "E test", são mais elevados nas estirpes Met^R do que nas estirpes Met^S de *S. aureus* (Quadro VII).

QUADRO VII: CIM₉₀ µg/ml de Antibióticos contra Estirpes de *S. aureus* Met^S e Met^R, avaliados pelo " E test ".

	Met ^R (n=150)			Met ^S (n=150)		
	Limites	CIM 50	CIM 90	Limites	CIM 50	CIM 90
Penicilina	6 - >250	16	32	0,032-1,5	0,50	1,5
Ampicilina	2 - >250	16	64	0,094-1,5	0,50	1,5
Piperacilina	6 - >250	>250	>250	0,5-0,6	2,0	3,0
Amox.+Ác. Clav.	1,5-24	6	32	0,125-0,75	0,50	0,75
Pipera.+Taz.	6-64	64	64	0,5-1,5	1,0	1,5
Oxacilina	>250	>250	>250	0,125-0,38	0,19	0,25
Cefalotina	0,38->250	1,5	64	0,094-0,38	0,19	0,25
Cefuroxima	3 - >250	6,0	>250	0,38-1,5	0,75	1,0
Cefoxitina	4 - >250	32	>250	0,75-2,0	1,0	1,5
Cefotaxima	6 - >250	64	>250	0,75-1,5	1,0	1,5
Ceftazidima	16 - >250	>250	>250	4,0-8,0	6,0	8,0
Ceftriaxona	6 - >250	64	>250	0,75-2,0	1,5	2,0
Imipenemo	0,064->250	0,094	>250	0,016-0,064	0,023	0,032
Eritromicina	4 - >250	>250	>250	0,125->250	0,19	0,25
Clindamicina	0,047->250	>250	>250	0,032->250	0,064	0,125
Ác. Fusídico	0,047->250	0,125	0,125	0,064-4	0,064	0,125
Vancomicina	1,0-2,0	1,5	1,5	1,5-2,0	1,5	1,5

Como era de esperar, contra as estirpes de *S. aureus* Met^R os antibióticos beta-lactâmicos têm valores de CIM bastante elevados, o mesmo acontecendo para a clindamicina, ácido fusídico e eritromicina.

É de salientar o facto das cefalosporinas de 1^a geração terem maior actividade *in vitro* do que as cefalosporinas de 2^a e 3^a geração contra estirpes de *S. aureus* Met^S, com valores de CIM₉₀ inferiores 4-8 vezes. Ceftazidima é a cefalosporina de 3^a geração de menor actividade contra as estirpes de *S. aureus* Met^S. Os CIM₉₀ da eritromicina, clindamicina e ácido fusídico são equivalentes aos valores da CIM₉₀ da maioria dos antibióticos beta-lactâmicos, com valores compreendidos entre 0,125-0,250µg/ml

3.2.1. CARACTERIZAÇÃO DO TIPO DE BETA-LACTÂMASES ELABORADAS POR 288 ESTIRPES DE *S. AUREUS*.

Os *ratio* dos valores de hidrólise enzimática nitrocefim/cefazolina e cefazolina/cefaloridina estão indicados na (fig. 6), tornando possível caracterizar as variantes das beta-lactâmases detectadas em 274 estirpes patogênicas de *S. aureus*. Em 14 estirpes não foi nítida a distinção entre as variantes B e C, sendo consideradas como produtoras de beta-lactâmases B, dado pertencerem ao grupo fágico II. Estão incluídas neste estudo estirpes padrão, conforme referido em Material e Métodos, produtoras das 4 variantes de beta-lactâmases.

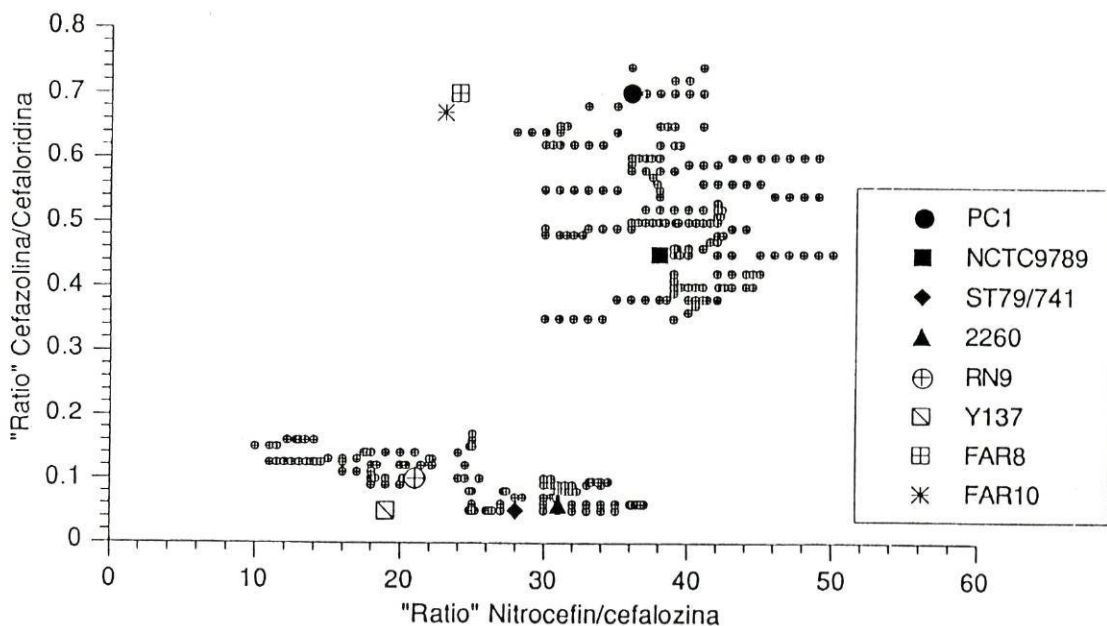


Figura 6 - " Ratio " das hidrólises de cefazolina/cefaloridina e nitrocefim/cefazolina exibidos por suspensões celulares de 288 estirpes de *S. aureus*.

Os pontos (⊗) representam o comportamento de estirpes padrão (legenda) ensaiadas nas mesmas condições.

O Quadro VIII mostra a incidência dos tipos de beta-lactamases produzidas por 288 estirpes de *S. aureus* (100 Met^R e 188 Met^S), segundo os critérios enzimáticos definidos em Material e Métodos.

QUADRO VIII: Incidência dos tipos de Beta-lactâmases produzidas por 288 Estirpes de *S. aureus* (100 Met^R e 188 Met^S).

Tipos de beta lactâmases	Nº de estirpes Met ^R (%) (n=100)	L.C.	Nº de estirpes Met ^S (%) (n=188)	L.C.	Nº total de estirpes (n=288)	p
A	65(65%)	55,3-73,6%	103(54,8%)	47,7-61,7%	168(58,3%)	6,0%*
B	16(16%)	0,1-24,4%	50(26,6%)	20,8-33,3%	66(22,9%) ⁽¹⁾	2,8%**
C	19(19,0%)	12,5-27,8%	35(18,6%)	13,7-24,8%	54(18,8%)	53%***
D	0	< 3,7%	0	< 2,0%	0	< 1,3%

* sugestivo

** significativo

*** não significativo

p - teste da probabilidade exacta de Fisher

L.C. - limites de confiança para 95%

(1) Quarenta e duas (63,6%) estirpes de *S. aureus* produtores de β -lactâmases do grupo B, eram lisadas por fagos do grupo fágico II.

Estes resultados mostram que as beta-lactâmases do tipo A são as predominantes, não se observando qualquer estirpe patogénica produtora da beta-lactâmase do tipo D. Estes resultados poderão vir a provocar um diferente comportamento das estirpes face aos antibióticos beta-lactâmicos, consoante o tipo de beta-lactâmase produzida. A diferença da incidência do tipo de beta-lactâmases entre estirpes de *S. aureus* Met^R e as Met^S não é significativa, excepto com as beta-lactâmases do tipo B que ocorre mais significativamente (p=2,8%) nas estirpes de *S. aureus* Met^S.

3.2.2. - ACTIVIDADE INIBITÓRIA DO ÁCIDO CLAVULÂNICO E TAZO-BACTAM SOBRE AS BETA-LACTÂMASES DO TIPO A, B, C e D DE *S. AUREUS*.

A hidrólise da piperacilina e da amoxicilina foi efectuada com beta-lactâmases A, B, C e D purificadas pela técnica descrita por (Kernodle *et al*, 1990) e os valores de Km (μM) estão expressos no Quadro IX.

As experiências de pré-incubação das beta-lactâmases com ácido-clavulânico ou tazobactam permitiram avaliar a I_{50} (μM), respectivamente, para cada inibidor (Quadro IX).

QUADRO IX: Determinação da dose inibitória (I_{50}) do Ácido-Clavulânico e Tazobactam sobre as Beta-lactâmases A, B, C e D.

	Piperacilina Km(μM)	Amoxicilina Km(μM)	Tazobactam I_{50} (μM)	Ác. Clavulânico I_{50} (μM)
β - Lactâmase A ⁽¹⁾	212	120	0,50	0,10
β - Lactâmase B ⁽¹⁾	100	95	0,52	0,28
β - Lactâmase C ⁽¹⁾	100	60	3,8	0,42
β - Lactâmase D ⁽²⁾	80	50	0,6	0,30

(1) β - Lactâmases produzidas por 3 isolados clínicos

(2) β - Lactâmase produzida pela estirpe padrão FAR10

Os resultados obtidos mostram que o tazobactam é menos eficaz que o ácido clavulânico contra os 4 tipos de beta-lactâmases estafilocóccias. O tazobactam mostrou também ser mais eficaz contra as beta-lactâmases do tipo A e B do que contra as beta-lactâmases C. Igualmente o ácido clavulânico mostrou maior eficácia contra a beta-lactâmase do tipo A do que contra os outros tipos de beta-lactâmases.

3.2.3. - ANTIBIÓTICOS MLS (MACRÓLIDOS - LINCOSAMIDAS - STREPTOGRAMINAS).

Os testes de difusão em agar realizados com as 686 estirpes de *S. aureus* face aos macrólidos de 14 elementos (eritromicina, claritromicina) e de 16 elementos (espiramicina) lincosamidas (lincomicina, clindamicina) e estreptograminas (virginiamicina) revelaram 5 fenótipos de susceptibilidade (Figs. 7,8,9,10,11) e cuja incidência está expressa no Quadro X.

QUADRO X: Comportamento, *in vitro*, de 686 estirpes de *S. aureus* face aos Antibióticos MLS.

Fenótipos	Nº estirpes (%)				p
	Hospitalares (n=474)	L.C.	Ambulatórias (n=212)	L.C.	
Er ^S Sp ^S C ^S L ^S Vir ^S	308 (65,0%)	60,6-69,1%	198 (93,4%)	89,2-96,0%	inf. al
Er ^S Sp ^S C ^S L ^R Vir ^S	18 (3,8%)	2,4-5,9%	2 (0,9%)	0,3-3,4%	2,7%*
Er ^R Sp ^R C ^R L ^R Vir ^S	87 (18,4%)	15,6-22,1%	6 (2,8%)	1,3-6,0%	inf. al
Er ^R Sp ^R C ^R L ^R Vir ^R	3 (0,6%)	0,2-1,8%	0	< 1,8%	33,0%**
Er ^R Sp ^S C ^S L ^S Vir ^S	58 (12,2%)	9,6-15,5%	6 (2,8%)	1,3-6,0%	inf. al

* significativo

** não significativo

Er - Eritromicina; Sp- Espiramicina; C - Clindamicina; L - Lincomicina; V - Virginiamicina. Em expoente, S e R indicam, respectivamente, susceptível e resistente. Os resultados obtidos com claritromicina são equivalentes aos da eritromicina. Os dados em () indicam a percentagem em relação ao nº total de estirpes (n=686).

Observando estes resultados verificamos que 160 (23,3%) estirpes de *S. aureus* são resistentes à eritromicina / claritromicina, sendo inferior a incidência de resistências à lincomicina (16,9%), clindamicina (14,0%) e espiramicina (14,0%). Somente 3 (0,4%) das estirpes são resistentes à virginiamicina.

A resistência MLS é mais significativa nas estirpes hospitalares e quase sempre associada às estirpes resistentes à meticilina. Só 12 (8%) das 150 estirpes de *S.aureus* resistentes à meticilina/oxacilina são susceptíveis, simultaneamente, aos antibióticos MLS.

As restantes 138 (92,0%) estirpes distribuíram-se pelos seguintes fenótipos: i-80 (53,4%) estirpes são do fenótipo $Er^R Sp^R CR LR Vir^S$; ii 3 (2,0%) do fenótipo $Er^R Sp^R CR LR Vir^R$; iii 55 (36,6%) do fenótipo $Er^R Sp^S CS LS Vir^S$.

Nas estirpes do fenótipo $Er^R Sp^S CS LS Vir^S$ observaram-se antagonismos, *in vitro*, entre a eritromicina ou claritromicina e os outros antibióticos com excepção da virginamicina, (fig 11). A maior incidência dos diversos fenótipos, excepto o fenótipo $Er^R Sp^R CR LR Vir^R$, é significativamente maior nas estirpes hospitalares do que nas estirpes ambulatorias (Quadro X)

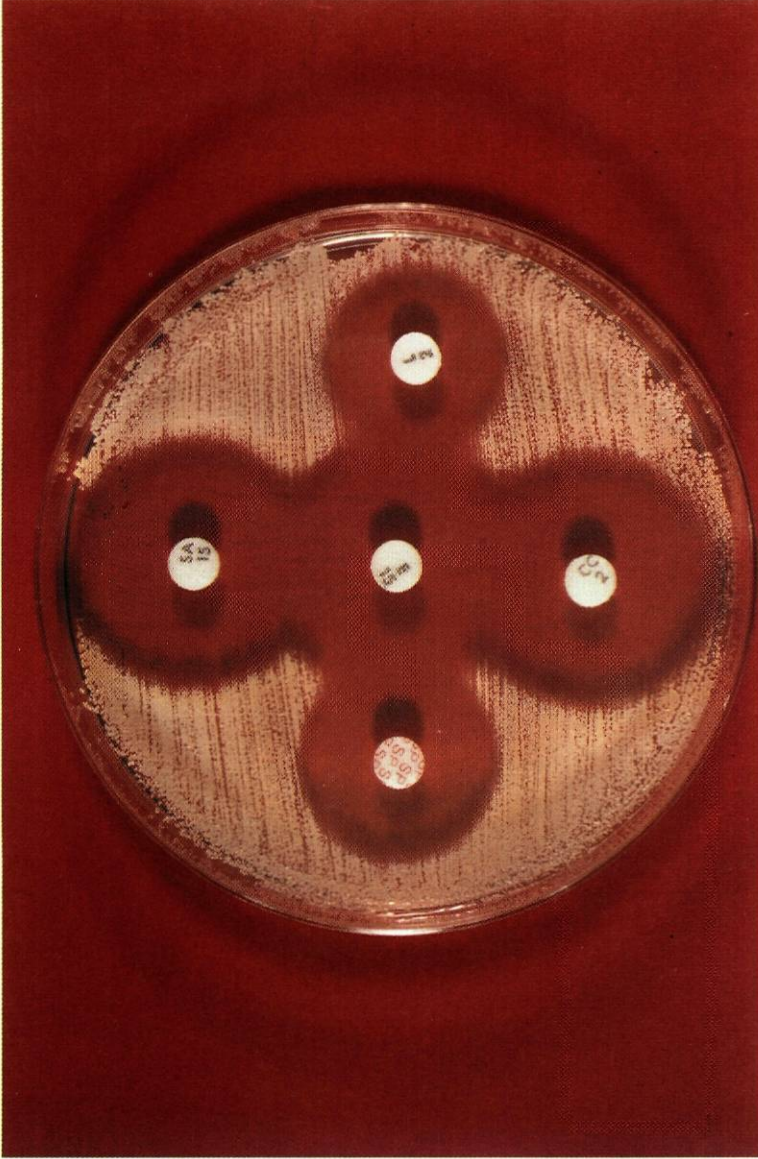


Fig. 7 - Estirpe de *S. aureus* susceptível *in vitro*, à eritromicina (E₁₅), espiromicina (Sp), clindamicina (CC₇), lincomicina (L₇) e virginamicina (SA₁₅).



Fig. 8 - Estirpe de *S. aureus* susceptível à eritromicina (E₁₅), espiramicina (Sp), clidamicina (CC₂), virginamicina (SA₁₅), mas resistente à lincomicina(L₂).

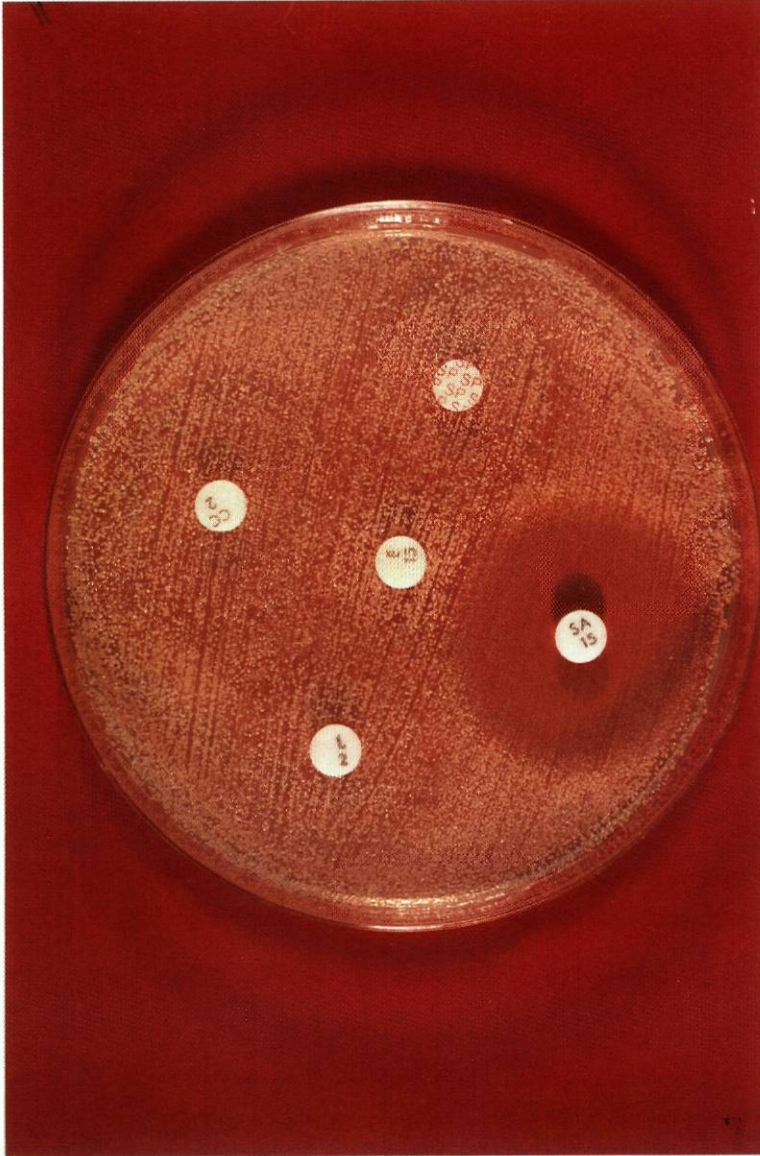


Fig. 9 - Estirpe de *S. aureus* resistente à eritromicina (E15), espiramicina (Sp), clidamicina (CC7), licomicina (L2), mas susceptível à virginamicina (SA15).

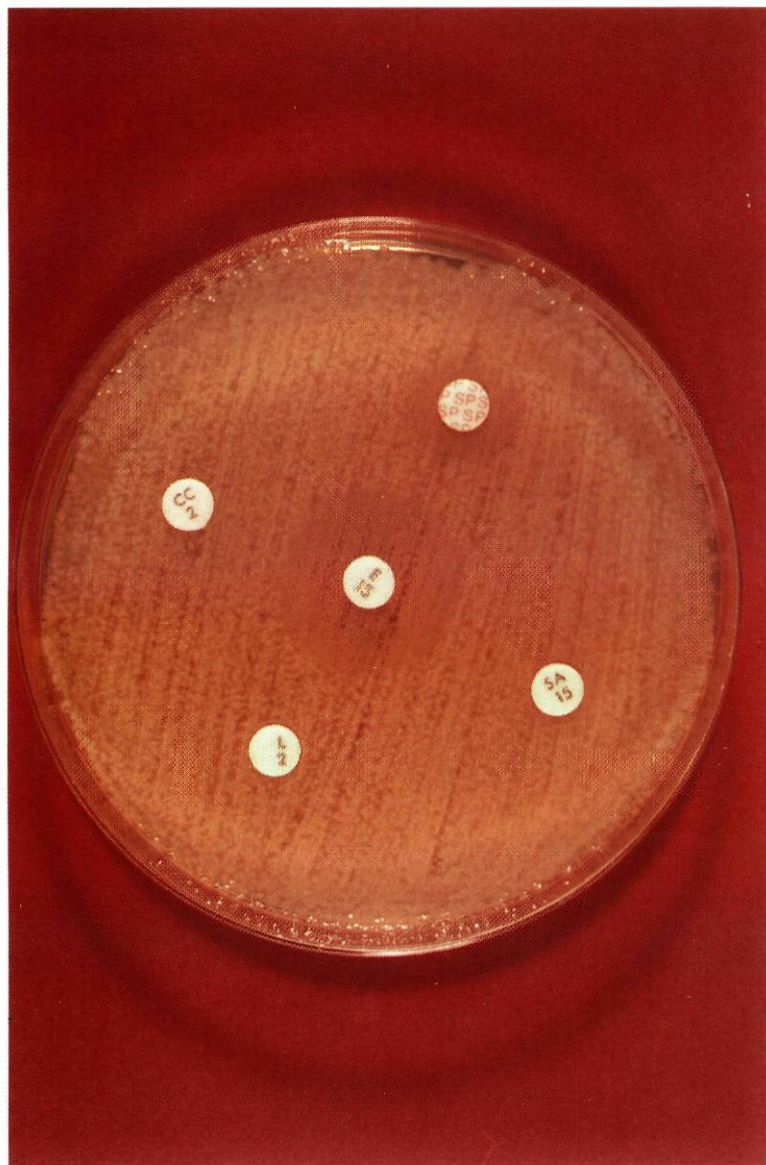


Fig. 10 - Estirpe de *S. aureus* resistente à eritromicina (E15), espiramicina (Sp), clidamicina (CC2), licomicina (L7) e virginamicina (SA15)

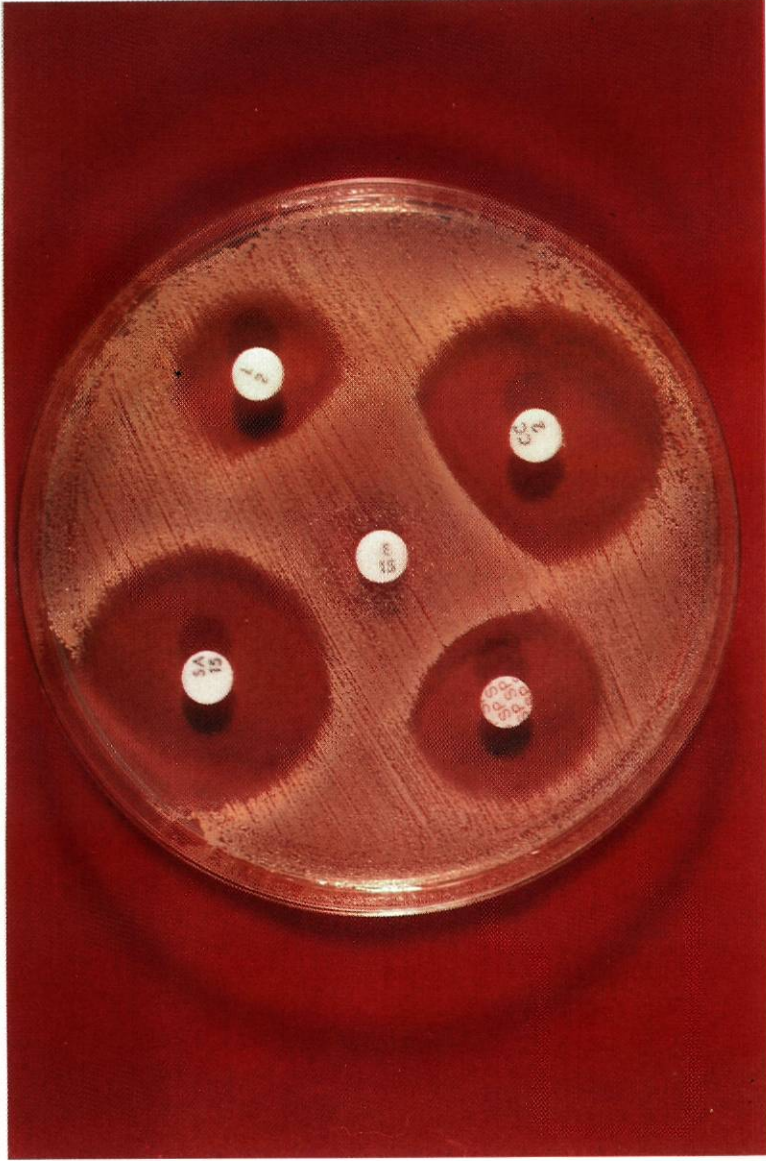


Fig. 11 - Estirpe de *S. aureus* susceptível à espiramicina (Sp), clidamicina (CC2), licomicina (L2) e virginiamicina (SA15), mas resistente à eritromicina (E15).
Notar o antagonismo entre a eritromicina e os outros antibióticos, excepto com a virginiamicina (SA15).

3.2.3.1 ENSAIOS DE INDUÇÃO DA RESISTÊNCIA MLS_B :

A CIM da clindamicina, realizado pelo E test, para a estirpe de *S. aureus* cultivada em caldo nutritivo, suplementado com eritromicina (1µg/ml), em função do tempo, está indicada na fig 12

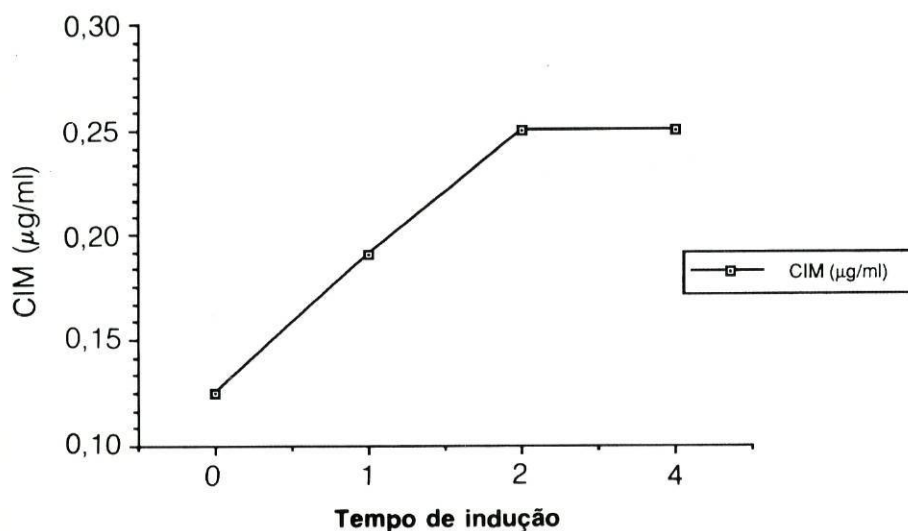


Figura 12 - CIM de clindamicina para um estirpe de *S. aureus*, em função do tempo de indução com eritromicina (1µg/ml).

Cada valor representa a média aritmética de 3 ensaios independentes.

Paralelamente, as culturas após indução com eritromicina forneciam halos de inibição à volta dos discos com espiramicina, clindamicina e lincomicina inferiores aos da cultura sem indução .

3.2.4. ANTIBIÓTICOS AMINOGLICOSÍDEOS-AMINOCICLITOIS :

Feita a análise dos ensaios de susceptibilidade aos aminoglicosídeos-aminociclitois de 52 estirpes de *S. aureus* resistentes à gentamicina (Lovering *et al*, 1988; Shaw *et al*, 1991,1993; Van de Klumbert *et al*, 1984) e feitos os ensaios de hibridização de DNA, detectamos sistematicamente em *S. aureus* a presença da enzima bi-funcional APH(2'')+AAC(6)-I, responsável pela resistência à gentamicina, tobramicina, dibecacina, netilmicina, 2-N-etil-netilmicina, 6-N-etil-netilmicina, amicacina, isepamicina, 5-episisomicina e fortimicina (Shaw *et al*, 1993).

Ocorreu entre os dois processos uma forte correlação, o que permite mostrar a grande importância dos métodos dos discos de difusão em agar na previsão do tipo de resistência, facilitando a escolha das sondas de DNA para os ensaios de hibridização.

Foram observados 3 mecanismos de resistência aos aminoglicosídeos. O primeiro mecanismo de resistência é atribuído à enzima bi-funcional APH (2'')+AAC(6'), observado em 10 (19,2%) estirpes; o segundo e o terceiro mecanismo atribui-se à enzima bi-funcional, respectivamente, associado a AAD (4')-I (23,1%) e a APH-(3')-III (48,1%). Em 5 (9,6%) estirpes não foi possível detectar qualquer actividade enzimática (AAD-adeniltransferases; AAC-acetiltransferases; APH-fosfotransferases).

3.3 - FAGOTIPIA DAS ESTIRPES PATOGÉNICAS DE *S. AUREUS*

Usando os fagos do conjunto básico Internacional foram tipadas 250 estirpes de *S. aureus* (62 Met^R e 188 Met^S), observando-se um predomínio dos grupos fágicos II e III (Quadro XI).

QUADRO XI: Grupo e Tipo Fágico de 250 Estirpes de *S. aureus* Produtoras de Beta-Lactâmases.

Grupo	Tipo Fágico	Estirpes Met ^R (n=62)	Estirpes Met ^S (n=188)
I (n=20)	29	0	6
	52	0	3
	79	0	2
	80	0	2
	29,52	0	5
	52,80	0	2
II (n=46)	3A	0	2
	55	0	20
	71	0	2
	3A,71	0	2
	3C,55	2	6
	3C,71	2	2
	3C,55,71	0	4
	55,71	2	2

III (n=69)	6	0	1
	53	0	1
	54	1	2
	77	4	1
	85	1	1
	83A	0	1
	99	1	1
	47	0	1
	42E/47	0	1
	47/53	1	0
	77/83A	1	2
	47/88	0	1
	42E/83A	1	0
	75/77	0	1
	47/85	0	1
	53/77	0	2
	77/84	14	1
	53/54	0	1
	77/88	0	1
	42E/54	0	1
	6/54/84	1	0
	6/47/54	1	0
	6/54/83A	1	0
	53/54/77	0	1
	53/54/83A	0	1
	42E/53/77	0	2
	42E/47/83A	0	1
	54/83A/85	2	1
	54/77/84	2	1
	6/47/54/84	1	0
	6/54/77/84	1	0
	47/53/83A/88	1	0
	6/54/83A/84/85	0	1
42E/47/83A/85	0	1	
6/54/75/77/84	1	0	
6/42E/53/77/80A	0	1	
6/47/54/75/77/84/88	1	0	
47/54/83A/85	1	0	
NT (n=62)	—	14	48
(n=51)			
I,III		5	10
II,III		0	2
II,95		0	2
III,95		0	9
94,96		0	13
95		0	3
I,III,95		0	6
I,94,96		0	2
I,II,94,96		0	1

NT - não tipáveis

A fagotipia revelou que as 62 estirpes Met^R pertenciam aos grupos fágicos II,III,I/III, enquanto que as 140 estirpes Met^S estavam mais dispersas, pertencendo aos grupos fágicos I, II, III, 95, II/95, 94/96, II/III, III/95, I/III, I/III/95, I/94/96 e I/II/94/96. Sessenta e duas estirpes (14 Met^R e 48 Met^S) não foram tipáveis (Quadro XI).

A correlação entre o grupo fágico e tipo de beta-lactâmases está indicado no Quadro XII, sendo de realçar uma correlação positiva entre as estirpes produtoras de beta-lactâmases B e grupo fágico II. O tipo fágico destas estirpes de *S. aureus* produtoras de beta-lactâmases B está indicado no Quadro XIII. Nas estirpes produtoras de beta-lactâmases A observa-se uma grande dispersão fágica.

QUADRO XII: Correlação Grupo Fágico e o Tipo de Beta-Lactâmases (250 estirpes de *S. aureus*, sendo 62 estirpes Met^R e 188 Met^S).

Grupo fágico	Nº de estirpes com beta-lactâmases A (n=146)	Nº de estirpes com beta-lactâmases B (n=66)	Nº de estirpes com beta-lactâmases C (n=38)
I	16	0	4
II	4	42(6 Met ^R)	0
III	42(20 Met ^R)	12(10 Met ^R)	15(7 Met ^R)
I,III	10(2 Met ^R)	0	5(3 Met ^R)
II,95	2	0	0
III,95	9	0	0
II,3	2	0	0
I,III,95	5	0	1
I,94,96	2	0	0
I,II,94,96	1	0	0
95	3	0	0
94,96	10	0	3
NT	40(8 Met ^R)	12(4 Met ^R)	10(2 Met ^R)

NT - não tipáveis

QUADRO XIII: Grupo e Tipo Fágico de 66 Estirpes de *S. aureus* Produtoras de Beta-Lactâmases do Grupo B.

Tipo fágico/Grupo	Nº de estirpes Met ^R	Nº de estirpes Met ^S	%
55(II)	0	16	63,6 %
71(II)	0	2	
3A(II)	0	2	
3C/55(II)	2	6	
3A/71(II)	0	2	
3C/71(II)	2	2	
55/71(II)	2	2	
3C/55/71(II)	0	4	
77/84(III)	6	2	36,4 %
54/83A/85(III)	4	0	
NT	4	8	

NT - Estirpes não lisáveis pelos fagos de colecção

3.4 INCIDÊNCIA (%) DE PORTADORES DE *STAPHYLOCOCCUS* EM PESSOAL MÉDICO E PARAMÉDICO.

Dos isolados das fossas nasais de 71 médicos e paramédicos 68 (95,8%) estirpes foram *Staphylococcus*, sendo 22 *S. aureus* e 46 *S. epidermidis*. A distribuição das estirpes por serviços do H.S.João está indicada na fig. XIII.

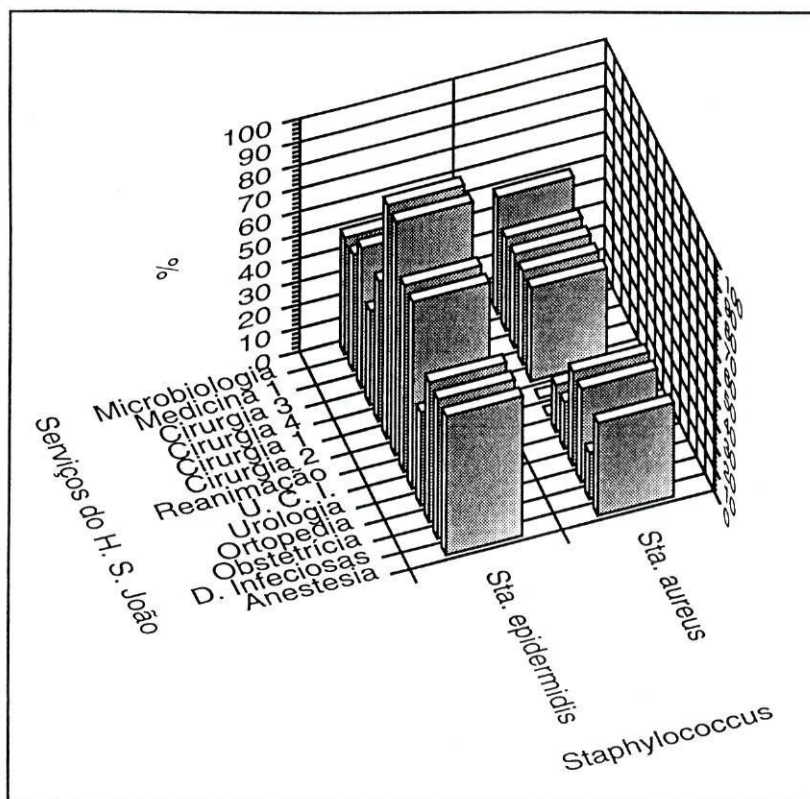


Fig XIII: Distribuição dos isolados de portadores nasais do H.S.João por Serviços e Unidades.

3.4.1 - COMPORTAMENTO DAS ESTIRPES FACE AOS ANTIBIÓTICOS

Todas as estirpes eram produtoras de beta-lactâmases pelo teste do nitrocefim e através da hidrólise de cefalosporinas pré-seleccionadas e de nitrocefim foram detectadas em *S. aureus* beta-lactâmases do tipo A(n=10), B(n=6) e C(n=6).

O comportamento, *in vitro*, das estirpes de *S. aureus* e *S. epidermidis* isoladas das fossas nasais face aos antibióticos está indicado nas figs XIV e XV, respectivamente. É notória a maior resistência observada em *S. epidermidis* do que em *S. aureus*. Nas estirpes de *S. aureus* observa-se uma baixa incidência de resistência à oxacilina, à associação amoxicilina + ácido clavulânico, à cefalexina, ao imipenemo e aos outros antibióticos, excepto à eritromicina e gentamicina.

Apenas em uma estirpe se observou resistência à metecilina. Nas estirpes de *S. epidermidis* verifica-se uma elevada resistência aos beta-lactâmicos, associada à resistência à oxacilina/metecilina (50,0%). Também foi observado, como nas estirpes patogénicas de *S. aureus*, uma resistência cruzada com os outros grupos de antibióticos. Apenas se verifica uma total susceptibilidade ao ácido fusídico, ciprofloxacina, mupirocina e vancomicina. A maior resistência em *S. epidermidis* do que em *S. aureus* é muito significativa (Quadro XIV)

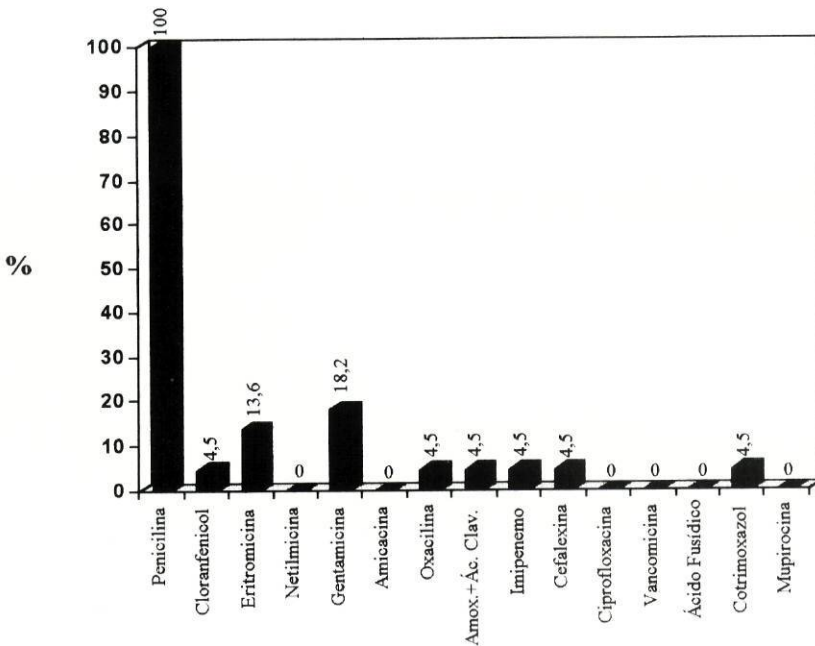


Fig. XIV - Resistências das estirpes de *S. aureus* aos antibióticos
(nº total de estirpes = 22)

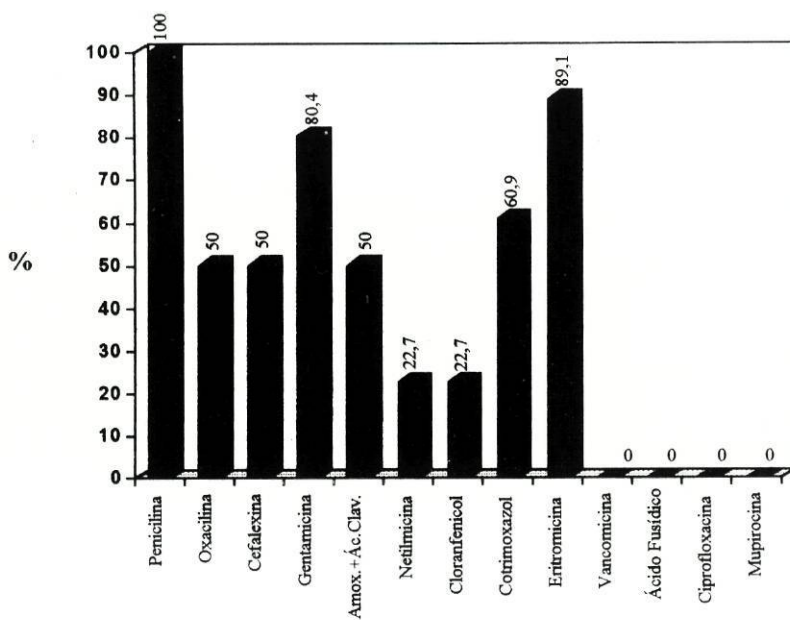


Fig.XV - Resistência das estirpes de *S. epidermidis* aos antibióticos
(nº total de estirpes = 46)

QUADRO XIV - Incidência (%) de resistência aos antibióticos em *S. aureus* e *S.epidermidis*, isolados das fossas nasais de pessoal médico e paramédico.

	<i>S. aureus</i> (n=22)	<i>S. epidermidis</i> (n=46)	p
Penicilina	100%	100%	—
Cloranfenicol	4,5%	22,7%	inf.al
Eritromicina	13,6%	89,1%	inf.al
Netilmicina	0	22,7%	inf.al
Gentamicina	18,2%	80,4%	inf.al
Amicacina	0	—	—
Oxacilina	4,5%	50,0%	inf.al
Amoxicilina+Ácido.clavulânico	4,5%	50,0%	inf.al
Imipenemo	4,5%	50,0%	inf.al
Cefalexina	4,5%	50,0%	inf.al
Ciprofloxacina	0	0	—
Vancomicina	0	0	—
Ácido Fusídico	0	0	—
Cotrimoxazol	4,5%	60,9%	inf.al
Mupirocina	0	0	—

p- teste da probabilidade exacta de Fisher

3.4.2.-CARACTERIZAÇÃO DO TIPO DE BETA-LACTÂMASES ELABORADAS POR 22 ESTIRPES DE *S. AUREUS* PROVENIENTES DE PORTADORES NASAIS.

Todas as estirpes eram produtoras de beta-lactâmases pelo teste do nitrocefim e através de hidrólises de cefalosporinas pré-selecionadas e nitrocefim foram detectadas beta-lactâmases do tipo A, B, e C.

O Quadro XV mostra a incidência de beta-lactâmases produzidas pelas estirpes de portadores nasais de *S. aureus*.

QUADRO XV: Incidência dos tipos de Beta-lactâmases produzidas pelas 22 estirpes de portadores nasais de *S. aureus*.

Tipos de β -lactâmases	Nº estirpes (n=22)
A	10* (45,5%)
B	6 (27,3%)
C	6 (27,3%)
D	0 (27,3%)

* 1 estirpe era resistente à metilina

3.4.3 - FAGOTIPIA:

Usando os fagos do conjunto básico internacional foram tipadas as vinte e duas estirpes de *S. aureus*, obtendo-se a seguinte distribuição: 6 (27,4%) das estirpes pertenciam ao grupo fágico II, 13 (59,0%) encontram-se dispersas pelos grupos fágicos I, I/III, III e 3 (13,6) eram não tipáveis (Quadro XVI) .

QUADRO XVI: Grupo e Tipo Fágico de 22 Estirpes de *S. aureus* isolados nas Fossas Nasais de Portadores.

Grupo	Tipo Fágico	Estirpes
I (n=3)	29 52,79	2 1
II (n=6)	3C 55 3A,55,71 3A,71	1 2 2 1
III (n=3)	54,75,77,83A,HK ₂ ,89,9 2 54,77,84 54,75	1 1 1
NT (n=3)	—	—
I/III (n=7)	80,42E,75,77,81 52A,79,75,77,D11 80,53,D11 52,79,75,77,84,81,HK ₂	1 1 1 1
I,81	80,81 29,80,81,HK ₂	1 1
I,III,95	52,52A,84,85,95	1

NT - não tipáveis

4-DISCUSSÃO

Historicamente as penicilinas tiveram um lugar primacial no tratamento das doenças estafilocócicas. Logo que surgiram resistências à penicilina G e ampicilina, devidas à produção de beta-lactâmases (penicilinases), foram introduzidas as isoxazolil-penicilinas (penicilinas penicilínase-resistentes) e as cefalosporinas como alternativa terapêutica às estafilocócias. Com a emergência na década de 60, de estirpes de *S. aureus* resistentes à oxacilina/meticilina (Jevons, 1961), a eficácia da terapêutica anti-estafilocócica com os antibióticos beta-lactâmicos tornou-se questionável. Presentemente as estirpes Met^R deverão ser considerados resistentes a todos os antibióticos beta-lactâmicos e exibem co-resistências com outros grupos de antibióticos, tornando-se a vancomicina e a teicoplanina os antibióticos de escolha (Smith *et al*, 1988; Sorrell *et al*, 1982). Dada a possível nefrotoxicidade e ototoxicidade destes antibióticos o tratamento das estafilocócias constitui uma preocupação permanente dos clínicos e microbiologistas.

Será que a vancomicina é a única alternativa no tratamento de infecções por *S. aureus* ?

Haverá outros antibióticos que em monoterapia ou em associação poderão constituir uma alternativa à vancomicina ?

Será que num futuro próximo vamos encontrar resistências à vancomicina ?

Todas estas interrogações são preocupantes e só um estudo profundo dos mecanismos de resistência aos antibióticos, sua evolução, e processos usados na disseminação entre estirpes da mesma espécie e mesmo entre espécies diferentes, nos poderá ajudar a estas questões.

Neste trabalho são apresentados os resultados do comportamento, *in vitro*, de 686 estirpes patogénicas (474 hospitalares e 212 ambulatorias), de *S. aureus* face aos antibióticos, usando testes de difusão em agar normalizados (NCCLS, 1988). São também explicados os mecanismos de resistência observados nestas estirpes aos antibióticos beta-lactâmicos, aminoglicosídeos-aminociclitois e antibióticos MLS (Macrólidos/Lincosamidas/Strepto-graminas). Este trabalho demonstra pormenorizadamente o comportamento das estirpes patogénicas de *S. aureus* da área urbana do Porto aos antibióticos, o que pode vir a racionalizar sobretudo as terapêuticas empíricas das infecções hospitalares e alertar os clínicos para o uso adequado dos antibióticos no tratamento das estafilocócias extra-hospitalares.

Finalmente, é estudada a incidência de *Staphylococcus* nas fossas nasais de pessoal médico e paramédico destas estirpes, seu comportamento face aos antibióticos, e questionada a sua contribuição na disseminação da infecção por estafilococos.

4.1. ANTIBIÓTICOS BETA-LACTÂMICOS - Os antibióticos deste grupo são reconhecidos como antibióticos antiparietais e têm uma acção bacteriolítica. É sabido que os antibióticos beta-lactâmicos são inibidores da biossíntese do peptidoglicano, o principal constituinte da parede celular de *S. aureus* (Tipper et Strominger, 1965; Sousa e Prista, 1988). É do consenso geral que estes antibióticos funcionam como inactivadores de enzimas intervenientes na biossíntese do peptidoglicano, bloqueando a biossíntese desta macromolécula (Strominger, 1970). Estas proteínas (transpeptidases, endopeptidases e carboxipeptidases) funcionam, portanto, como receptores dos antibióticos beta-lactâmicos, sendo por isso designadas por PBPs (Penicillin Binding Proteins) e estão localizadas no folheto da membrana citoplasmática justaposto à parede celular das bactérias Gram positivo (Sousa e Prista, 1988). O efeito lítico destes antibióticos atribui-se à activação das autolisinas em bactérias Gram positivo (Tomasz et Waks, 1975). PBPs são enzimas que catalizam as interligações "cross linking" entre os polímeros de peptidoglicano e em *S. aureus* promovem a ligação peptídica entre a L-lisina e a D-alanina, pertencentes a cadeias vizinhas de aminoaçúcares (N-acetilglucosamina e ácido N-acetilmurâmico), à custa de uma cadeia penta-glicínica.

Estirpes susceptíveis de *S. aureus* produzem 4 ou 5 PBPs: PBP1, PBP2, PBP3, PBP3' e PBP4 com pesos moleculares de 85, 80, 75, 70 e 45 Kd, respectivamente (Georgopapadakou et Lin, 1980; Georgopapadakou *et al*, 1986; Wyke, 1985).

As funções fisiológicas específicas das PBPs estafilocócicas (transpeptidases, endopeptidases e carboxipeptidases) não estão completamente definidas. PBP2 e PBP3 (Georgopapadakou et Lin, 1980) parecem ser essenciais para o crescimento de *S. aureus*, sendo duvidoso o papel desempenhado por PBP1 (Curtis et Hayes, 1981). PBP4 não parece ser essencial para o crescimento de *S. aureus* (Curtis *et al*, 1980).

Em resumo, poderemos afirmar, que as moléculas dos beta-lactâmicos só são activas se o anel beta-lactâmico chegar intacto às PBPs ocasionando a sua acilação, bloqueando a biossíntese do peptidoglicano e causando a exarcebação das autolisinas.

Em *S. aureus*, a hidrólise enzimática do anel beta-lactâmico nas moléculas dos antibióticos beta-lactâmicos, mediado por beta-lactâmases, e a alteração das PBPs constituem os principais mecanismos de resistência às penicilinas, cefalosporinas e carbapenemos (Lacey 1975; Hartman et Tomasz 1986; Sousa e Prista 1988). A alteração das PBPs normais ou a criação de novas PBPs com baixa afinidade para os antibióticos beta-lactâmicos ocasiona a resistência das estirpes à meticilina/oxacilina e, por isso, são designadas por estirpes resistentes à meticilina (Met^R).

Estas estirpes produzem PBP2a ou PBP2' anormais, em que o gene estrutural (gene *mec A*) está presente nas estirpes resistentes à meticilina/oxacilina e não nas susceptíveis (Hartman et Tomasz, 1984,1986) tendo já sido referida a sequência nucleotídica deste gene (Song *et al*, 1988 e Ryffel *et al*, 1990).

A síntese desta PBP é indutível (Ubukata *et al*, 1985) e a resistência à meticilina é cruzada com os outros beta-lactâmicos *in vitro* e *in vivo* (Chambers et Sande, 1984). Esta PBP2a ou PBP2' tem um P.M. de 78 Kd e tem uma baixa especificidade para os beta-lactâmicos (Hartman et Tomasz, 1984, 1986; Brown et Reynolds, 1980).

As estirpes de *Staphylococcus* coagulase negativa também produzem PBP2a (Chambers,1987; Chambers *et al*, 1989). PBP2a só se liga aos beta-lactâmicos em altas concentrações ao contrário das outras PBPs. Proteólise de PBP2a marcado gera fragmentos peptídicos diferentes de PBP1, PBP2, PBP3 e PBP4, obtidos nas mesmas condições. Tal facto sugere que a PBP2a não é de origem estafilocócica (Reynolds et Fuller, 1986).

A resistência à meticilina é geneticamente e bioquimicamente complexa (Lencastre *et al*, 1994). PBP2a, a proteína associada com a meticilina resistência, é codificada pelo gene *mec A*, o qual contém 37 Kd (Hackbarth et Chambers, 1989). Além deste tipo de estirpes resistentes à meticilina, existem outros designados por "baixos níveis de resistência". Um destes tipos foi descrito por Tomasz (Tomasz *et al*, 1989) num grupo de isolados clínicos resistentes à meticilina e que em vez de PBPs anormais continha PBPs normais, mas com fraca afinidade para os antibióticos beta-lactâmicos.

Os resultados por nós obtidos demonstram que as beta-lactâmases estão presentes nas estirpes patogénicas de *S. aureus*, excepto em 28 (5,8%) estirpes hospitalares e em 12 (5,6%) estirpes ambulatorias. Tal facto revela que as beta-lactâmases são o principal determinante da resistência bacteriana aos beta-lactâmicos, isoladamente ou em associação com as alterações das PBPs, nas estirpes hospitalares.

Nas estirpes ambulatorias as beta-lactâmases são o único determinante de resistência aos antibióticos beta-lactâmicos hidrolizáveis. As beta-lactâmases hidrolisam facilmente a penicilina G e as outras penicilinas hidrolisáveis, onde a CIM₉₀ atinge valores >1,5µg/ml.

Os inibidores das beta-lactâmases, ácido clavulânico e tazobactam, ampliaram o espectro de actividade da amoxicilina e piperacilina, respectivamente, diminuindo 2 vezes os valores de CIM₉₀ contra as estirpes de *S. aureus* susceptíveis à meticilina. Nas estirpes Met^R observou-se uma redução das CIM em presença dos inibidores, mas tal facto é pouco relevante em termos terapêuticos, dado que nestas estirpes o

receptor dos beta-lactâmicos apresenta modificações impeditivas da interacção PBP-antibiótico.

Pelo contrário, Boyce e Medeiros não referem qualquer efeito sinérgico do ácido clavulânico com a meticilina contra as estirpes de *S. aureus* Met^R (Boyce et Medeiros, 1987), enquanto que Kobayashi *et al*, (Kobayashi *et al*, 1989) observaram que o sulbactam, um inibidor de beta-lactâmases, exibe efeitos sinérgicos com a meticilina contra as estirpes de *S. aureus* Met^R.

O papel terapêutico desempenhado pelos inibidores nas estirpes Met^S é muito importante, diminuindo significativamente as resistências à amoxicilina e piperacilina. A associação amoxicilina-ácido clavulânico, ampicilina-sulbactam e piperacilina-tazobactam poderão vir assim a ter um papel terapêutico equivalente às isoxazolil-penicilinas, isto é, penicilinas resistentes às beta-lactâmases estafilocócicas.

Os nossos resultados assim o demonstram embora a oxacilina exiba valores de CIM₉₀ mais baixos 3 a 6 vezes que aquelas associações de antibióticos.

Para além disso, vêm mais uma vez estes resultados mostrar a menor potência contra *S. aureus* Met^S das cefalosporinas da 2^a e 3^a geração (CIM₉₀=1-8µg/ml) comparada com a actividade das cefalosporinas da 1^a geração (CIM₉₀=0,25µg/ml). Contudo, cefamandol e cefuroxima (cefalosporinas de 2^a geração) têm maior actividade que cefazolina (1^a geração), a qual é facilmente hidrolizada por beta-lactâmases A de *S. aureus* (Di Piro *et al*, 1984; Sabath, 1984; Megamey *et al*, 1975).

Imipenemo revela uma potência anti-estafilocócica superior à dos outros beta-lactâmicos exibindo uma CIM₉₀ = 0,032µg/ml.

Fica também evidente, em face dos resultados obtidos, a alta incidência no H.S.João, Porto, de estirpes de *S. aureus* Met^R (31,6%) e a sua ausência na comunidade. Como era de esperar, as estirpes de *S. aureus* Met^R exibem resistências cruzadas com os outros antibióticos beta-lactâmicos, dado que esta resistência é intrínseca.

Na maioria dos casos a meticilina-resistência é difícil de detectar, dada a heterogeneidade das estirpes, isto é, só 1-10 bactérias em cada 10⁴-10⁶ exprimem essa resistência.

Sondas de DNA (Archer et Pennell, 1990) ou técnicas de PCR (Murakami *et al*, 1991; Tokne *et al*, 1992; Geha *et al*, 1994) têm sido ultimamente indicadas para a detecção da resistência à meticilina. Contudo, as técnicas convencionais, como as utilizadas neste estudo, quando adequadamente realizadas, são de momento mais

acessíveis técnica e economicamente, sobretudo para laboratórios que não se dedicam especificamente a estes estudos. A expressão fenotípica da meticilina resistência é influenciada pelas condições culturais (temperatura, pH, NaCl, densidade do inóculo, duração da incubação), (Drew et al, 1972; Sabath, et al, 1973; Sabath, 1977; Aldridge et al, 1983 ; Boyce, 1984).

O nosso estudo mostrou que as culturas em M. Hinton a 30°C ou em M.Hinton agar com 2-5% de NaCl a 37°C, apresentava resultados idênticos na maioria das estirpes com fenótipo heterogéneo, e só em 2 estirpes foi detectado com maior evidência o fenótipo heterogéneo a 30°C do que a 37°C. Em 5 estirpes Met^R observou-se o fenótipo homogéneo da meticilina resistência (Hartman et Tomasz, 1986). A detecção da meticilina-resistência foi mais facilmente detectada quando usámos inóculos superiores a 10⁷ U.F.C./ml e a incubação durante 48 horas. As estirpes foram consideradas por nós heterogéneas quando menos que 1% U.F.C. cresceram em Trypticase Soy Agar contendo 50µg/ml de meticilina e homogéneas quando cresceram mais de 1% U.F.C. no mesmo meio. Os resultados obtidos foram calculados em relação ao crescimento das estirpes em meio de Trypticase Soy Agar sem antibiótico (Hartman et Tomasz, 1986). Conforme salientado anteriormente, a maioria das estirpes de *S. aureus* Met^R exibem resistência cruzada com os outros antibióticos beta-lactâmicos.

Algumas estirpes Met^R apresentadas neste estudo não exibem, *in vitro*, resistências ao imipenemo (68 estirpes), cefalotina e cefamandol (34 estirpes), como aliás tem sido descrito por outros autores (Wise *et al*, 1981; Markowitz *et al*, 1983; Frongillo *et al*, 1984, 1986; Woods *et al*, 1987). A interpretação deste facto não é pacífica e tem-se admitido que cefamandol (Frongillo *et al*, 1984, 1986; Menzies *et al*, 1987) e imipenemo (Wise *et al*, 1981; Thompson *et al*, 1982; Witte *et al*, 1982; Fan *et al*, 1986) possam constituir alternativas para o tratamento das infecções estafilocócicas. Dados clínicos (Acar *et al*, 1970; Shanson, 1981; Menzies *et al*, 1987; Schadeve *et al*, 1987) não parecem confirmar os resultados obtidos *in vitro* e as cefalosporinas e carbepenemos têm sido associadas a uma alta incidência de falhas terapêuticas nas infecções estafilocócicas por estirpes Met^R.

Resultados obtidos por nós com maior tempo de incubação e maior densidade de inóculo mostram que as condições culturais não afectam a avaliação dos testes de susceptibilidade ao cefamandol, cefalotina, e imipenemo.

É assim aceite que as estirpes de *S. aureus* Met^R devem ser consideradas resistentes a todos os antibióticos beta-lactâmicos, independentemente dos resultados obtidos *in vitro* (Wenzel, 1982 ; NCCLS, 1982).

McDougal et Thornsberry (1986) mostraram que algumas estirpes de *S. aureus*, estirpes denominadas "borderline", produzem largas quantidades de beta-lactâmases com baixo nível de resistência à oxacilina, sendo as CIM₅ de oxacilina 1-2µg e, por isso, segundo aqueles autores, devem ser consideradas como Met^R, apesar de possuírem PBPs normais, isto é, idênticas às das estirpes de *S. aureus* oxacilina sensíveis (McDougal et Thornsberry, 1986; Varaldo, 1993).

No nosso estudo não foram isoladas quaisquer estirpes "borderline", mas os estudos de outros vêm mostrar o interesse da determinação da CIM na avaliação do tipo de resistência em *S. aureus* (Barg *et al*, 1991; Sierra-Madero *et al*, 1988).

4.1.1. BETA-LACTÂMASES - Conforme referimos atrás, as beta-lactâmases ocorrem na maioria das estirpes de *S. aureus* Met^S e Met^R. Nas estirpes Met^S as beta-lactâmases constituem o principal determinante de resistência.

Neste estudo são caracterizadas as beta-lactâmases elaboradas por 288 estirpes (100 Met^R e 188 Met^S) de *S. aureus* através de hidrólise enzimática de cefalosporinas selecionadas (Kernodle *et al*, 1990) e adicionalmente por fagotipia (Rosdahl, 1993), o que acontece pela primeira vez no nosso País e muito raramente em outras regiões (Kernodle *et al*, 1989; Bonfiglio et Livermore 1994; Norris *et al*, 1994).

Em 1965 (Richmond, 1965) foi evidenciada a existência de 4 imunotipos (A, B, C e D) dentro das beta-lactâmases estafilocócicas.

Recentemente Kernodle (Kernodle *et al*, 1990) classificaram as beta-lactâmases pela sua actividade contra as cefalosporinas em 4 tipos, com equivalência à antiga classificação serológica.

Com base na capacidade de hidrólise relativa da cefazolina, cefaloridina e nitrocefim, detectamos a presença das beta-lactâmases A, B e C, não tendo sido detectada nenhuma estirpe produtora de beta-lactâmase D, como aliás em outros Países (Kernodle *et al*, 1989; Bonfiglio et Livermore, 1994).

Observamos um predomínio da variante A nas estirpes de *S. aureus*, sendo esta a que mais contribui para a resistência às penicilinas e à cefazolina. Em 14 estirpes, com base no poder de hidrólise, não foi nítida a distinção entre as variantes B e C, tendo sido classificadas como B dado o seu tipo fágico (Rosdahl, 1993).

Posteriormente ao nosso trabalho (Vaz *et al*, 1993), Bonfiglio e Livermore (1994) descrevem na Inglaterra, a alta incidência em *S. aureus* de beta-lactâmases A e C e a

escassez das beta-lactâmases do tipo B, ao contrário do que acontece nas estirpes de *S. aureus* da área urbana do Porto e nos Estados Unidos da América (Kernodle *et al*, 1990). A ausência naquele estudo de fagotipia de *S. aureus* poderá justificar parcialmente essa discrepância ou traduz apenas uma variação geográfica (Smith, 1972).

Como aliás descrito por Bonfiglio e Livermore, observamos que a beta-lactâmase A é mais activa que as outras beta-lactâmases contra a cefazolina, como comprovam os nossos ensaios de hidrólise, segundo a técnica de Kernodle *et al* (1990).

Embora os nossos dados nos demonstrem que as beta-lactâmases do tipo C eram menos susceptíveis que as do tipo A e B à inibição pelo ácido clavulânico e tazobactam, e que o tazobactam é menos eficaz que o ácido clavulânico contra os 4 tipos de beta-lactâmases, as estirpes Met^S por nós estudadas eram susceptíveis *in vitro* à associação ácido clavulânico + amoxicilina e tazobactam + piperacilina, não concordantes com os dados descritos por Bonfiglio e Livermore (1993).

Para além do interesse epidemiológico na caracterização das variantes de beta-lactâmases, há que salientar a possibilidade do interesse terapêutico neste conhecimento (Sabath *et al*, 1970; Fong *et al*, 1976). A constatação que nós fizemos anteriormente com a cefalotina (cefalosporinas de 1^a geração) não deve ser alargada à cefazolina na medida em que a beta-lactâmase A constitui a enzima elaborada por mais de 50% das estirpes por nós estudadas .

Apesar dos resultados, *in vitro*, serem idênticos para a associação amoxicilina+ácido clavulânico e para a associação piperacilina+tazobactam, é relevante, na nossa opinião, a constatação de que a dose inibitória do ácido clavulânico (I₅₀) ser superior 5 vezes à dose inibitória do tazobactam contra a estirpe clínica de *S. aureus* produtora de beta-lactâmase do tipo A. Resultados de outros autores e os nossos mostram que a beta-lactâmase tipo A é predominante nas estirpes de *S. aureus* Met^S e Met^R, pelo que é de prever a maior eficácia do ácido clavulânico contra as estirpes hiperprodutoras de beta-lactâmases, como aliás acontece em certas estirpes "borderline" (McDougal et Thornsberry, 1986).

4.2- ANTIBIÓTICOS AMINOGLICOSÍDEOS-AMINOCICLITÓIS - Trata-se de um grupo de antibióticos inibidores da síntese proteica, com acção bacteriolítica contra bactérias Gram positivo (Silva et Sousa, 1973). Os aminoglicosídeos-aminociclitois após penetrarem a parede celular bacteriana e a membrana citoplasmática ligam-se ao seu receptor na sub-unidade 30S do ribossoma causando alterações na síntese proteica (Sousa et Prista, 1990). Está comprovado que os aminoglicosídeos provocam uma leitura errada da mensagem codificada no mRNA. Ensaios, *in vitro*, com ribossomas bacterianos e cadeias poli U e uma mistura de aminoácidos, revela que os aminoglicosídeos provocam uma incorporação errada de aminoácidos, cuja frequência, varia de antibiótico para antibiótico (Davies et Davies, 1968). As proteínas erradas induzidas pelos aminoglicosídeos-aminociclitois incorporam-se na membrana citoplasmática alterando a sua permeabilidade, o que explica o mecanismo bactericida destes antibióticos (Schlessinger, 1988).

A resistência bacteriana aos aminoglicosídeos-aminociclitois é predominantemente mediada por enzimas inactivadoras destes antibióticos (Miller *et al*, 1980; Courvalin et Carlier, 1981; Kayser *et al*, 1981; Archer et Johnston, 1983; Mandell *et al*, 1984; Archer *et al*, 1985; Ubukata *et al*, 1985; Rodrigues *et al* 1992; Shaw *et al*, 1993), denominadas acetiltransferases, fosfotransferases e nucleotidiltransferases.

Os resultados por nós obtidos demonstram, como era de esperar, uma maior incidência de resistência aos aminoglicosídeos nas estirpes hospitalares do que nas ambulatórias, ocorrendo uma resistência cruzada entre a meticilina/oxacilina e os diversos aminoglicosídeos-aminociclitois, principalmente com a gentamicina. Entre as estirpes Met^R é de destacar a elevada resistência à gentamicina (80,0%) e a baixa resistência à netilmicina (9,3%), amicacina (10,7%) e isepamicina (10,7%).

Contrariamente ao descrito por Markowitz (Markowitz *et al*, 1983), nas estirpes Portuguesas Met^R não se observou a associação entre este tipo de resistência e a produção de 4'-nucleotidiltransferase, dada a baixa incidência da resistência observada à amicacina, em oposição à elevada resistência à gentamicina (80,0%).

Tais discrepâncias não são de estranhar, dado que a resistência aos aminoglicosídeos sofre variações regionais (Burns *et al*, 1974; Hare *et al*, 1989), o que está relacionado com a pressão selectiva, a nível de cada hospital, exercida pelo uso terapêutico dos antibióticos aminoglicosídeos-aminociclitois.

4.2.1. ENZIMAS INACTIVADORAS— Em 52 estirpes de *S. aureus* resistentes à gentamicina foi possível determinar o mecanismo de resistência (Davies et Smith, 1978) pela correlação dos fenótipos de resistência a 12 aminoglicosídeos seleccionados e ensaios de hibridização DNA.

Contrariamente ao que tem sido descrito para outros grupos bacterianos (Aminoglycoside resistance Study Groups, 1994; Miller *et al*, 1994, 1995), verificou-se em *S. aureus* apenas 3 mecanismos de resistência. O mecanismo bi-funcional APH (2'')+AAC (6') foi o mais frequente (44,87%). Combinação de APH (2'')+AAC (6') com ANT (4')-I (29,49%) ou com APH (3')- III (25,64%) também foram responsáveis pelo comportamento das estirpes de *S. aureus* face aos aminoglicosídeos-aminociclitois, como aliás é descrito em outros países (Ounissi *et al*, 1990). No entanto um estudo recente (Aminoglycoside Resistance Study Groups, 1995) demonstra a ocorrência de uma maior heterogeneidade dos mecanismos de resistência em *S. aureus* em outros países europeus e latino-americanos do que a observada no nosso estudo.

A ocorrência destes mecanismos de resistência nas estirpes de *S. aureus* Met^R justificam o facto de a netilmicina constituir o aminoglicosídeo mais activo contra *S. aureus*, ultrapassando, *in vitro*, a actividade de isepamicina, um novo antibiótico aminoglicosídeo-aminociclitol de largo espectro e ainda não utilizado em Portugal (Aminoglycoside Resistance Study Groups, 1995).

No nosso estudo apenas em 4 estirpes não foi possível detectar qualquer actividade enzimática, o que pode estar relacionado com a lise incompleta destas estirpes, não havendo DNA disponível para os ensaios de hibridização.

Os resultados obtidos demonstram que a netilmicina revela maior eficácia que os outros aminoglicosídeos-aminociclitois, ao contrário do que acontece em estirpes portuguesas de bacilos Gram negativo onde a amicacina é o aminoglicosídeo de maior eficácia (J C F Sousa- comunicação pessoal) e em outras regiões a isepamicina revela maior eficácia (Aminoglycoside Resistance Study Groups, 1994; Miller *et al*, 1995).

4.3. ANTIBIÓTICOS MLS- Este grupo de antibióticos é constituído por Macrólidos, Lincosamidas e Streptograminas, quimicamente diferentes, mas com mecanismos de acção e de resistência, análogos, pelo que geralmente são abordados conjuntamente (Jenssen *et al*, 1987; Sousa et Prista, 1991).

Estes antibióticos são inibidores da síntese proteica, com um efeito bacteriostático actuando ao nível da sub-unidade 50S ribossomal bloqueando a unidade P, prejudicando a transpeptidação e/ou a translocação (Sousa et Prista, 1990; Goldman *et al*, 1990).

A resistência simultânea a Macrólidos, Lincosamidas e Streptograminas B (MLS_B) têm sido descritas em *S. aureus* (Novick et Murphy, 1985; Thakker-Varia *et al*, 1987). Tal resistência deve-se à N⁶-dimetilação da sub-unidade 23S de rRNA (Lai *et al*, 1973), mediada por metilases produzidas constitutivamente ou indutivelmente (Weisblum *et al*, 1971), sendo a eritromicina um bom indutor (Weisblum et Demohn, 1969), ficando os ribossomas refractários à actividade dos antibióticos MLS.

Neste trabalho é discutido o comportamento das 686 estirpes patogénicas de *S. aureus* face aos antibióticos MLS, nomeadamente aos Macrólidos de 14 elementos no anel lactónico da molécula (eritromicina e claritromicina) e de 16 elementos (espiramicina), Lincosamidas (lincomicina e clindamicina) e virginiamicina (uma mistura de Streptogramina A e B) (Chabbert et Courvalin, 1971).

Os nossos resultados demonstram que os macrólidos (2,2-4,1% de resistências) podem ser uma alternativa à penicilina no ambulatório, com CIM₉₀ = 0, 0125µg/ml, enquanto que as estirpes hospitalares de *S. aureus* Met^R são muito refractárias aos macrólidos (56- 92,0% de resistências) e com CIM₉₀ >250µg/ml. O comportamento das 686 estirpes de *S. aureus* face aos antibióticos MLS revelaram 5 fenótipos de susceptibilidade, sendo claro que o comportamento das estirpes de *S. aureus* é diferente face aos diferentes antibióticos e não ocorre na maioria das estirpes com um comportamento homogéneo.

A resistência MLS é mais significativa nas estirpes hospitalares e quase sempre associada às estirpes de *S. aureus* Met^R.

Em 96 (14,0%) estirpes observou-se resistência cruzada entre a eritromicina/claritromicina/espiramicina/lincomicina/clindamicina, tratando-se provavelmente de estirpes constitutivamente produtoras de metilases, apesar da maioria das estirpes não exibirem resistência à virginiamicina. Tal razão pode atribuir-se ao facto de a virginiamicina ser uma mistura de estreptogramina A e B, sendo a estreptogramina A

refractária à metilação (Chabbert et Courvalin, 1971). Somente em 3 estirpes foi observada resistência à virginiamicina, o que nos leva a admitir que estas 3 estirpes sejam produtoras de uma acetiltransferase inativadora da estreptogramina A (Le Goffi *et al*, 1977).

Em 64 (9,3%) das estirpes observou-se somente resistência cruzada entre a eritromicina e claritromicina, e um antagonismo, *in vitro*, entre estes antibióticos e os Macrólidos de 16 elementos (espiramicina) e as Lincosamidas (lincomicina, clindamicina).

Não se observaram antagonismos ente os macrólidos de 14 elementos (eritromicina, claritromicina) e a virginiamicina, o que pode ser atribuído à presença de estreptogramina A, a qual actua sinergicamente com a estreptogramina B (Chabbert et Courvalin, 1971).

Nestas estirpes observou-se que a eritromicina ou claritromicina, quando usadas como indutores, ampliaram as CMI_S de clindamicina, bem como a diminuição dos halos de inibição à volta dos discos contendo espiramicina, clindamicina e lincomicina.

Estes resultados indicam-nos que estas estirpes exibem uma resistência MLS_B do tipo indutível, pelo que não é aconselhável nestes casos a associação terapêutica de eritromicina ou claritromicina com macrólidos de 16 elementos e lincosamidas.

Em resumo, podemos dizer que a incidência da resistência MLS não é muito significativa nos *S. aureus* Met^S, ao contrário do que acontece nas estirpes hospitalares Met^R, onde a resistência MLS do tipo constitutivo e indutivo assume uma grande relevância.

Uma vez que em *S. aureus* a resistência à lincomicina está quase sempre associada à resistência à clindamicina, macrólidos e estreptograminas B (Novick et Murphy, 1985), é de salientar o facto de no nosso estudo terem sido detectadas 20 (2,9%) estirpes de *S. aureus* resistentes à lincomicina e susceptíveis aos outros antibióticos. Segundo o nosso conhecimento, este fenótipo foi apenas descrito em isolados clínicos de *Staphylococcus haemolyticus* (Leclercq *et al*, 1985).

4.4- VANCOMICINA / TEICOPLANINA - São antibióticos activos contra bactérias Gram positivo. Inibem a biossíntese do peptidoglicano, formando complexos com o dipeptídeo D-alanil-D-alanina de NAG-NAM-pentapeptídes-(P)-(P)-lipídeo na interface membrana citoplasmática/ parede celular, impedindo a transferência das unidades recém-sintetizadas para a matriz parietal em crescimento (Jordan, 1965; Nieto et Perkins, 1971; Barne et William, 1984). Também altera a síntese do RNA e altera a permeabilidade da membrana citoplasmática (Jordan et Innis, 1959; Jordan, 1965; Nieto et Perkins, 1971).

Os antibióticos beta lactâmicos, e estes dois antibióticos glicopeptídeos (Somma et al, 1984), são antibióticos antiparietais, embora vancomicina/teicoplanina tenham um mecanismo diferente, na medida em que as estirpes de *S.aureus* Met^R são susceptíveis àqueles dois antibióticos, como aliás o comprovam os nossos resultados e outros (Guenthner et Wenzel, 1984 ; Peetermans *et al*, 1990).

Vancomicina tem sido indicado como antibiótico de escolha "gold standard" para o tratamento das infecções por *Staphylococcus* spp., sobretudo para as estirpes Met^R (Sorrel *et al*, 1982 ; Chambers *et al*, 1984 ; Guenthner *et al*, 1984 e Van der Auwera *et al*, 1990). Resultados idênticos têm sido referidos para a teicoplanina (Chambers *et al*, 1984 ; Greenwood, 1988; Bannerman *et al*, 1991).

Os nossos resultados mostram que as estirpes patogénicas de *S. aureus* Met^R são susceptíveis, *in vitro*, à vancomicina ou teicoplanina. Resultados idênticos foram obtidos com as estirpes de *S. aureus* Met^S, embora neste grupo outros antibióticos também sejam totalmente eficazes. Os valores de CIM da vancomicina demonstram ser semelhantes para as estirpes de *S. aureus* Met^S e Met^R, com valores de CIM₉₀ = 1,5 µg/ ml.

Apesar da susceptibilidade, *in vitro*, à vancomicina, têm sido descritas falhas terapêuticas com este antibiótico no tratamento das endocardites estafilocócicas (Gopal *et al.*, 1976; Favilla *et al.*, 1978). Algumas falências terapêuticas têm sido também atribuídas ao aparecimento de estirpes de *S. aureus* tolerantes à vancomicina (Sabath, 1977).

A resistência à vancomicina não tem sido descrita em *S. aureus*, mas já foi descrita em *S. haemolyticus* (Schwalbe *et al.*, 1987) e em *Enterococcus faecalis* (Lecqlerq *et al*, 1988; Boyce, 1994), e em *Enterococcus gallinarum* (Kaplan *et al.*, 1988) num doente de hemodiálise sujeito a tratamento prolongado com a vancomicina. Tal facto pode facilitar a sua disseminação para *Staphylococcus*, o que representa actualmente uma grande preocupação clínica.

Em 1993, cerca de 14% dos isolados de *Enterococcus* de uma Unidade de Cuidados Intensivos nos Estados Unidos da América eram resistentes à vancomicina (CDC, 1993) e resistentes aos beta-lactâmicos, aminoglicosídeos, fluorquinolonas e outros grupos de antibióticos (Montecalvo *et al.*, 1994).

Têm também sido descritas algumas falhas terapêuticas, em doentes com osteomielite (Greenberg, 1990), em doentes com endocardite (Gilbert *et al.*, 1991) e em doentes com aneurismas micóticos (Gilbert *et al.*, 1991).

Embora não perfeitamente esclarecido, a eficácia terapêutica da teicoplanina parece estar relacionada com o esquemas posológico (Gilbert *et al.*, 1991; Shlaes *et al.*, 1993).

A resistência intrínseca à teicoplanina parece ser mais frequente nos estafilococos coagulase-negativo, especialmente em *S. haemolyticus*, onde os MIC_S de teicoplanina são superiores aos MIC_S de vancomicina (Kenny *et al.*, 1991).

Dada a ineficácia da vancomicina em monoterapia, em algumas situações clínicas, é usada por vezes a rifampicina ou a gentamicina ou ambas (Watanakunakorn et Tisone, 1982; Karchmer *et al.*, 1983). A associação de vancomicina à gentamicina mais rifampicina é a terapêutica preferida para as endocardites de doentes com próteses cardiovasculares (Karchmer *et al.*, 1983). Os nossos resultados indicam que a netilmicina deverá ser o aminoglicosídeo de escolha contra *S. aureus*, dada a alta incidência de APH (2") + AAC (6') nas estirpes Portuguesas.

Apesar dos nossos resultados mostrarem que as estirpes portuguesas se *S. aureus* são susceptíveis, *in vitro*, à vancomicina e teicoplanina, é evidente que este estudo deve ser discutido com os clínicos e os resultados terapêuticos analisados, quer se trate de tratamento em monoterapia ou em associações de vancomicina/teicoplanina com os outros antibióticos. Os resultados obtidos, *in vitro*, neste estudo poderão ser um bom ponto de partida para a execução desse objectivo.

4.5- RIFAMPICINA - É um antibiótico bactericida inibidor do RNA polimerase, bloqueando a síntese do mRNA, impedindo portanto a transcrição.

Embora a utilização terapêutica da rifampicina seja praticamente reservada para as infecções por *Mycobacterium*, tem sido usado como agente anti-estafilocócico para as células bacterianas intra e extra-celulares (Mandell et Vest, 1972).

A resistência à rifampicina desenvolve-se rapidamente, pelo que só é utilizada associada a outros antimicrobianos (Mandell et Morman, 1980; Varaldo et al, 1985).

Os nossos resultados indicam que a rifampicina exhibe uma grande actividade, *in vitro*, contra as estirpes de *S. aureus* Met^S e uma boa actividade contra as Met^R, com uma resistência de 10,8%.

Dada a possibilidade de resultados terapêuticos insatisfatórios ocorrerem com os antibióticos glicopeptídicos (Small et Chambers, 1990), em vez de serem usados em monoterapia têm sido utilizados associados a outros antibióticos no tratamento das infecções estafilocócicas graves, nomeadamente com rifampicina (Chambers, 1991).

Os nossos resultados, *in vitro*, parecem aconselhar esta associação, de um ponto de vista estritamente microbiológico. É no entanto de admitir que para tratamentos prolongados possa ocasionar a emergência de estirpes resistentes à rifampicina, dado que os dois antibióticos têm diferentes velocidades de distribuição tecidual (Brumfitt et Hamilton-Miller, 1989). Se um segundo antibiótico deve ser associado ou não à vancomicina, é uma questão em aberto (Scheld et Sande, 1990) e ainda não convenientemente solucionada, razão pelo que deveria ser estudada no Hospital de S. João após a análise dos nossos resultados, como é aliás nosso objectivo, futuramente.

Rifampicina também tem sido ensaiada associada a ciprofloxacina ou a trimetoprim-sulfametoxazol na erradicação de portadores de *Staphylococcus* spp. (Peterson et al., 1990) e no tratamento de infecções estafilocócicas (Ayliffe et al., 1990).

Os nossos resultados, *in vitro*, não parecem confirmar essa eficácia terapêutica nos pacientes do nosso hospital, dada a alta incidência da resistência à ciprofloxacina e trimetoprim-sulfametozazol observadas nas estirpes patogénicas de *S. aureus* Met^R isoladas de doentes internados no Hospital de S. João.

4.6- QUINOLONAS - São compostos químicos com actividade bactericida, inibidores da DNA gyrase (Domagala *et al*, 1986). A DNA gyrase ou topoisomérise II cataliza o superenrolamento negativo de DNA. A sua função é essencial para a replicação de DNA de transcrição. As fluorquinolonas, nova geração de quinolonas, têm sido indicadas como tendo grande actividade contra bactérias Gram positivo (Pidcock, 1994).

A ciprofloxacina é largamente utilizada na terapêutica (Piercy *et al*, 1989; Smith *et al*, 1989; Nishigime *et al*, 1994), sendo indicada como agente anti-estafilocócico isoladamente (Smith et Eng, 1985; Kaatz *et al*, 1987; Shalit *et al*, 1989) ou associada a outros fármacos (Kaatz *et al*, 1987 e 1989; Rohner *et al*, 1989)

Neste estudo escolhemos a ciprofloxacina como protótipo das fluorquinolonas e os nossos resultados indicam que a ciprofloxacina é muito activa, *in vitro*, contra as estirpes Met^S, o que não acontece com as estirpes Met^R, onde se observa uma resistência de 30,7%.

A ciprofloxacina não pode pois ser indicada como alternativa terapêutica à vancomicina mesmo em associação nas infecções estafilocócicas hospitalares, sendo de aguardar com expectativa a actividade das novas fluorquinolonas (Kaatz *et al*, 1989) contra as nossas estirpes. A elevada incidência de resistência à ciprofloxacina observada neste estudo pode estar relacionada com a elevada utilização terapêutica desta quinolona no nosso hospital, e não resultante de uma disseminação intra-hospitalar, dada a heterogeneidade fágica observada entre as nossas estirpes. Por razões inexplicáveis esta selecção de mutantes resistentes não ocorre entre as estirpes de *S. aureus* Met^S.

Dawn *et al*. (1990) num estudo realizado no Ann Arbor Veterans Administration Medical Center observaram que em 1984 *S. aureus* era sensível à ciprofloxacina. Em 1985, 55,1% das estirpes de *S. aureus* Met^R e 2,5% das estirpes de *S. aureus* Met^S eram resistentes à ciprofloxacina. Fenómenos idênticos foram observados por outros autores (Shalit *et al*, 1989; Raviglione *et al*, 1990; Peterson *et al*, 1990). As estirpes ciprofloxacina-resistentes pertenciam a diferentes grupos fágicos e só num caso houve a comprovação da disseminação clonal de uma estirpe (Peterson *et al*, 1990).

A fim de evitar este aumento de resistências, tem sido associada a rifampicina no tratamento das infecções estafilocócicas (Ayliffe *et al*, 1990).

Dada a alta incidência de resistência às fluorquinolonas, estão a ser ensaiados novos derivados, as sulfanil-fluorquinolonas, derivados da ciprofloxacina e norfloxacin,

quais revelam boa actividade *in vitro* contra as estirpes Met^S e Met^R de *S. aureus* (Allemandi *et al*, 1994).

A elevada resistência em *S. aureus* às fluorquinolonas parece estar associada a um mecanismo de efluxo activo, conforme foi descrito recentemente por Chopra (1992) e Levy (1992).

4.7- ÁCIDO-FUSÍDICO - É um antibiótico do grupo fusidano e que é usado terapêuticamente como antiestafilocócico. Inibe a síntese proteica bacteriana na fase de tradução, ligando-se ao factor de alongamento EF-G e formando um complexo estável EF-G/GTP, impedindo assim a sua ligação ao aminoacil-tRNA (Harvey *et al*, 1966; Burns *et al*, 1974). O ácido fusídico tem uma acção bacteriolítica contra *S. aureus* (Newman *et al*, 1962; Greenwood et O'Grady, 1972). A resistência ao ácido fusídico pode ocorrer por mutação, a qual afecta a afinidade do factor EF-G (Newman *et al*, 1962; Gayral *et al*, 1986).

As estirpes de *S. aureus* Met^S usadas neste estudo foram susceptíveis ao ácido fusídico e somente 6 (4%) das estirpes Met^R foram resistentes, *in vitro*. O ácido fusídico, conjuntamente com o cloranfenicol, foram os melhores antibióticos, *in vitro*, contra *S. aureus* Met^R, logo a seguir à vancomicina, teicoplanina e mupirocina.

Não se observaram grandes diferenças para os valores de CIM₉₀ de ácido fusídico contra as estirpes Met^R e Met^S de *S. aureus*, respectivamente, 0,250 e 0,125 µg/ml.

Resultados recentes de outros países também revelaram uma baixa incidência de resistência de *S. aureus* ao ácido fusídico, sendo essa resistência de 2% na Inglaterra (Shanson, 1990), Dinamarca (Faber et Thamdrup, 1990) e na Arábia Saudita (Shibl *et al*, 1994).

Tem no entanto sido indicado para tratar infecções estafilocócicas associado a outros antibióticos (Shanson, 1990) e não em monoterapia (Pattison et Mansell, 1973). Como a ripampicina, a resistência ao ácido fusídico pode aparecer, se usado em monoterapia. Sendo assim, pode ser associado a um segundo antibiótico, como a rifampicina, se a estirpe for susceptível a este antibiótico.

No nosso entender, trata-se de um dos antibióticos que deve merecer a atenção clínica no nosso Hospital no tratamento das estafilococias, inclusivé na erradicação com as estirpes nasais de *Staphylococcus*. Será interessante averiguar qual o seu papel terapêutico *versus* mupirocina na erradicação de portadores nasais.

4.8- CLORANFENICOL - É um antibiótico bacteriostático inibidor da síntese proteica, actuando ao nível da sub-unidade 50S dos ribossomas. Admite-se que as moléculas de cloranfenicol se associam à proteína L16, a qual liga o aminoacil-tRNA ao local activo da peptidiltransferase, interferindo assim com a síntese proteica (Weisblum et Davies, 1968; Sousa et Prista, 1991).

A inactivação enzimática, mediada por acetiltransferases, do cloranfenicol constitui o principal mecanismo de resistência em *S. aureus* (Sands et Shaw, 1973; Davies et Smith, 1978; Sousa et Prista, 1991). Trata-se de acetiltransferases indutíveis, de natureza plasmídica (Sands et Shaw, 1973).

Cloranfenicol demonstra contra as nossas estirpes uma excelente actividade, nomeadamente contra as estirpes Met^R, sendo um antibiótico de eleição para o tratamento das infecções estafilocócicas, tanto no ambulatório como a nível hospitalar.

Na sua utilização terapêutica há que ter em conta a toxicidade deste antibiótico, pelo que terá sempre uma utilização muito limitada.

4.9- TRIMETOPRIM-SULFAMETOXAZOL - Trata-se de uma associação medicamentosa com actividade bacteriostática. Como é sabido, são inibidores da biossíntese do ácido tetra-hidrofólico (Brown, 1962; Burchal et Hitchings, 1965).

Tem sido apontada como alternativa à vancomicina no tratamento das infecções por *S. aureus* Met^R (Chambers, 1988), sendo a maioria das estirpes susceptíveis (Seligman, 1973; Elwell *et al*, 1986, Markowitz *et al*, 1983).

Tem também sido associado à rifampicina na erradicação de portadores nasais de *S. aureus* Met^R (Ward *et al*, 1981)

Os nossos resultados não nos permitem ter esta visão e, pelo contrário, a associação trimetoprim-sulfametoxazol tem uma fraca actividade, *in vitro*, contra as estirpes de *S. aureus* Met^R, onde se observa uma resistência de 62,7%. Pelo contrário, esta associação revela boa actividade contra as estirpes de *S. aureus* Met^S com uma susceptibilidade de 97,8%.

Não somos assim da opinião que trimetoprim-sulfametoxazol associado a rifampicina seja utilizado na erradicação nasal de *S. aureus* de portadores assintomáticos.

A resistência em estafilococos parece ser devida a um plasmídeo, DHFRS1, produzindo di-hidrofolato redutase (Coughter *et al.*, 1987), a qual não é inibida pelo trimetoprim. O gene *dhfr* A responsável por esta resistência é muito frequente em *S. epidermidis* e experiências de hibridização de DNA mostram que ocorre frequentemente entre *S. aureus* e *S. epidermidis* uma transferência horizontal na natureza (Galleto *et al*, 1987). Tal facto pode explicar a elevada incidência de resistência observada nas nossas estirpes à associação trimetoprim-sulfametoxazol, sobretudo em ambiente hospitalar.

4.10- FOSFOMICINA - É bactericida e actua contra bactérias Gram positivo e Gram negativo, inibindo a primeira etapa da síntese do peptidoglicano (Kahan *et al.*, 1974). É um análogo do fosfoenolpiruvato que irreversivelmente inibe a enolpiruvato transferase, uma enzima envolvida nas fases iniciais da síntese do peptidoglicano. A resistência é de natureza plasmídica e é atribuída aos genes Fos A e Fos B que catalizam a adição de fosfomicina e glutationa, formando um produto inactivo (Suarez et Mendonza, 1991). Tem sido referida a sua actividade contra *S. aureus* MET^S e MET^R (Guethner et Wenzel, 1984; Alvarez *et al.*, 1985).

Os resultados por nós obtidos demonstram que a fosfomicina tem boa actividade contra *S. aureus* MET^S e MET^R, com uma susceptibilidade de 99,3% e 83,3%, respectivamente.

É um dos antibióticos que deve merecer uma reavaliação clínica do nosso Hospital, dada a sua quase nula utilização terapêutica.

4.11- TETRACICLINAS - São antibióticos inibidores da síntese proteica com actividade bacteriostática. Inibem a síntese proteica ao nível do ribossoma. As tetraciclina ligam-se reversivelmente à sub-unidade 30S, impedindo a ligação codão-anticodão entre mRNA e tRNA (Buck et Cooperman, 1990). As resistências bacterianas às tetraciclina devem-se ao efluxo das tetraciclina mediadas por genes Tet (Salyers *et al.*, 1990; Speer *et al.*, 1992).

Tem sido mostrada a fraca eficácia das tetraciclina contra *Staphylococcus* coagulase-positiva e coagulase-negativa e outras espécies bacterianas Gram-positivo (Kucers et Bennett, 1987).

Os nossos resultados confirmam estes dados, observando-se uma fraca actividade da tetraciclina e minociclina, respectivamente, com as resistências de 90,7% e 56,0% contra as estirpes Met^R.

A actividade das tetraciclina contra as estirpes de *S. aureus* Met^S é significativamente eficaz, sendo apenas de 1,5% a incidência da resistência à minociclina. No nosso entender, estes antibióticos poderão ter alguma utilização terapêutica no ambulatório.

O gene que em estafilococos codifica o efluxo das tetraciclina é o gene Tet K, que medeia a resistência à tetraciclina e à doxiciclina, mas não à minociclina. É de salientar que essa proteína seja eficaz nas nossas estirpes, dado que somente 56,0% das estirpes *S. aureus* são resistentes à minociclina *versus* 90,7% das estirpes serem resistentes à tetraciclina (Archer et Climo, 1994). Fenómeno idêntico ocorre nas estirpes Met^S.

Estão neste momento em curso estudos clínicos com novos derivados das tetraciclina, as glicilciclina, as quais exibem, *in vitro*, boa actividade contra as estirpes de *S. aureus* Met^R co-resistentes à tetraciclina, minociclina e glicopeptídeos (Eliopoulos et al, 1994; Tally et al, 1995; Mogalski, 1995).

4.12- CLINDAMICINA - É um antibiótico bacteriostático inibidor da síntese proteica. Pertence ao grupo dos antibióticos MLS e revela um comportamento idêntico ao dos macrólidos de 16 átomos, conforme referimos anteriormente.

A clindamicina tem uma fraca actividade contra as estirpes de *S. aureus* Met^R, com valores de CIM₉₀ >250µg/ml., conforme comprovamos.

A actividade da clindamicina contra as estirpes de *S. aureus* Met^S é muito eficaz, observando-se apenas uma resistência de 2,2%. Na nossa opinião, os efeitos adversos possíveis com este antibiótico, como é o caso da colite pseudo-membranosa, limitam a sua utilização terapêutica no tratamento das estafilococias, devendo ser reservado preferencialmente para outras situações clínicas, nomeadamente no tratamento de infecções por anaeróbios estritos.

4.13- MUPIROCINA - É um antibiótico tópico produzido por *Pseudomonas fluorescens* e inicialmente conhecido por ácido pseudomónico (Sutherland *et al.*, 1985) Trata-se de um antibiótico inibidor da síntese proteica, inibindo a actividade da enzima isoleucil-tRNA sintetase, impedindo, portanto, a incorporação do aminoácido isoleucina durante a tradução do mRNA (Caswell et Hill., 1985).

Os resultados por nós obtidos mostram que mupirocina é totalmente eficaz contra as estirpes patogénicas de *S. aureus* MET^R e MET^S e contra as estirpes de portadores nasais de *S. aureus* e *S. epidermidis*, isolados de pessoal médico e paramédico de diversos serviços do Hospital de S. João, Porto.

Estes dados confirmam a grande actividade deste antibiótico contra estirpes patogénicas de *S. aureus* referidas por outros autores (Cookson *et al.*, 1990; Slocombe et Perry, 1991; Doebbeling et al, 1993; Fernandez et al, 1995).

Têm sido referidas raras estirpes resistentes ao mupirocina (Cookson *et al.*, 1990). Embora o nosso estudo tenha sido realizado apenas, *in vitro*, é de admitir que este antibiótico usado na prática clínica sob a forma de creme de aplicação tópica seja de grande utilidade na erradicação de portadores nasais de *Staphylococcus* spp. em ambiente hospitalar. Caswell et Hill (1986) e Boelaert *et al* (1993) mostram a eficácia do mupirocina na erradicação de portadores nasais de *S. aureus*.

A fim de evitar a utilização de antibióticos sistémicos, o que pode conduzir ao aparecimento de estirpes resistentes, a utilização tópica de mupirocina parece ser a única alternativa (Boelaert *et al.*, 1989; Caswell et Hill, 1991).

O comportamento das estirpes isoladas no Hospital de S. João face a mupirocina indicam total eficácia *in vitro* deste antibiótico. Sendo do nosso conhecimento que o mupirocina vai ser comercializado no nosso país, será de esperar futuramente o aparecimento de estirpes de *S. aureus* e *Staphylococcus* coagulase-negativa resistentes ao mupirocina ? (Smith et Eng, 1985; Kavi et al, 1987)

Será que o tratamento tópico do pessoal médico e paramédico que participou no nosso estudo vai conduzir a uma total erradicação nasal de *Staphylococcus* ? É também de ter em conta a utilização tópica de ácido fusídico, que igualmente revela uma excelente actividade, *in vitro*, contra *S. aureus* e *S. epidermidis*. Será interessante avaliar estes dois compostos, *in vivo*, e como se comportam as estirpes face a estes, após a sua utilização terapêutica.

A fagotipia das estirpes nasais de *S. aureus* isoladas não mostram uma correlação positiva com a das estirpes patogénicas de *S. aureus*. Embora realizados num número restrito de portadores nasais de *S. aureus* em que apenas um isolado era MET^R, os nossos dados não mostram a importância da ligação entre a colonização do pessoal médico e paramédico e as infeções estafilocócicas no Hospital de S. João, como aliás é descrito na literatura científica internacional.

4.14.-ESTUDO DE PORTADORES DE *STAPHYLOCOCCUS* EM PESSOAL MÉDICO E PARAMÉDICO.

Dados epidemiológicos têm demonstrado que portadores assintomáticos, quer transitórios (através das mãos), quer prolongados (através das fossas nasais), são geralmente intervenientes na transmissão de infecção nosocomial estafilocócica (Halley *et al*, 1982). Este estudo mostra a elevada prevalência (95,8%) de portadores assintomáticos de *Staphylococcus* nas fossas nasais do pessoal médico e paramédico do H.S.João, Porto; bem como o comportamento dessas estirpes aos antibióticos.

Todas as estirpes de *S. aureus* e *S. epidermidis* eram produtoras de beta-lactâmases e em *S. aureus* cerca de 50,0% eram produtoras de beta-lactâmases do tipo A. É de realçar a maior incidência de resistências aos antibióticos em *S. epidermidis* do que em *S. aureus*. Tal pode atribuir-se ao facto de só uma estirpe de *S. aureus* revelar resistência à meticilina, enquanto que 23 (50,0%) estirpes de *S. epidermidis* serem Met^R. O que acabamos de descrever tem também sido observado na pele de doentes hospitalizados e em pessoal médico e paramédico em outros locais (Archer, 1991).

No entanto, não deixa de ser preocupante o facto de *Staphylococcus* coagulase-negativa poder funcionar como reservatório de genes de resistência a antibióticos, passíveis de transferência para outras estirpes *Staphylococcus* spp (Halley *et al*, 1982; Lampson *et al*, 1986).

Não é assim de excluir a possibilidade do pessoal médico e paramédico contribuir para a disseminação da infecção estafilocócica intra-hospitalar e para o exterior. Recentemente foi admitido que estirpes de *S. aureus* Met^R podem disseminar-se através de consideráveis distâncias geográficas (Sanchez *et al*, 1995).

Em doentes imunocomprometidos (HIV positivos, doentes em Unidades de Cuidados Intensivos), em doentes em hemodiálise ou diálise peritoneal, em recém-nascidos e idosos tem sido estabelecido uma correlação entre a colonização nasal com *Staphylococcus* e a infecção (bacteriemia, doenças respiratórias, infecção de feridas, etc.) (Luzar *et al*, 1990; Casewell et Hill, 1986). Isto é preocupante principalmente quando ocorre com estirpes Met^R (Cooke, 1993), uma vez que a sua erradicação conduz ao uso de antibióticos dispendiosos e com alguma toxicidade (Keane *et al*, 1991).

A fim de interromper este elo da cadeia epidemiológica, têm sido ensaiados diversos esquemas terapêuticos (Casewell et Hill, 1986; Chow et Ya, 1989; Luzar *et al*, 1990

and Arathoon et al, 1990) sem grande eficácia e com fácil recolonização nasal e da pele.

Tem sido utilizado com algum sucesso rifampicina sistêmica, mas têm surgido rápidas resistências (Sande et Mandell, 1975). Rifampicina associada à cloxacilina tem sido usado com sucesso contra as infecções por estirpes de *S. aureus* Met^S (Wheat et al, 1981).

Os nossos resultados, conforme referido anteriormente, não mostram essa interligação, embora tenhamos de admitir que a colonização nasal do pessoal médico e paramédico possa ser um elo na cadeia epidemiológica da infecção por estafilococos, particularmente nas estirpes resistentes à meticilina

A fagotipia das estirpes patogênicas de *S. aureus* e das estirpes de portadores assintomáticos não permitiram estabelecer uma correlação de natureza epidemiológica.

RESUMO E CONCLUSÕES

Summary and conclusions

A estratégia para o tratamento das infecções estafilocócicas deve ter em conta o comportamento das estirpes, *in vitro*, face aos antibióticos. Sendo *S. aureus* Gram positivo, é primariamente tratado com antibióticos beta-lactâmicos. No entanto, como os nossos resultados o demonstram, as estirpes ambulatorias de *S. aureus* são maioritariamente produtoras de beta-lactâmases que inactivam a penicilina e outras penicilinas hidrolisáveis. A estratégia terapêutica para ultrapassar a produção de beta-lactâmases inclui a utilização de penicilinas resistentes às beta-lactâmases estafilocócicas (metecilina e as isoxazolilpenicilinas, cefalosporinas de 1ª e 2ª geração) ou a utilização das penicilinas hidrolisáveis associadas a inibidores das beta-lactâmases (amoxicilina+ácido clavulânico; ampicilina+sulbactam; piperacilina+tazobactam). No caso dos doentes alérgicos às penicilinas poderemos recorrer a outros grupos antimicrobianos, nomeadamente aos macrólidos.

Em ambiente hospitalar, numerosas estirpes de *S. aureus* produzem PBP2a ou PBP2', uma nova PBP com baixa afinidade para os antibióticos beta-lactâmicos, que as torna resistentes à metecilina e aos outros antibióticos beta-lactâmicos, apesar de, *in vitro*, cefalotina, cefamandol e imipenem revelarem alguma actividade contra estirpes de *S. aureus* Met^R. Adicionalmente estas estirpes também elaboram beta-lactâmases.

A fim de ultrapassar este problema, antibióticos não beta-lactâmicos são geralmente utilizados, nomeadamente a vancomicina ou a teicoplanina. Os resultados, *in vitro*, demonstram que estes dois antibióticos são muito eficazes. Falta provar *in vivo* a eficácia total destes fármacos em monoterapia ou em associação com outros fármacos, como a rifampicina.

Como dissemos anteriormente, as estirpes de *S. aureus* Met^R exibem PBP2a ou PBP2' com baixa afinidade para os beta-lactâmicos e a maioria das estirpes produzem beta-lactâmases. A eficácia dos antibióticos beta-lactâmicos contra estas estirpes só poderá verificar-se se houver ligação ao receptor PBP2a após escaparem à hidrólise das beta-lactâmases. Segundo alguns autores isto é possível de atingir, tendo sido descrita a eficácia terapêutica da associação amoxicilina+ácido clavulânico e ampicilina+sulbactam contra infecções por estirpes de *S. aureus* Met^R (Cantoni *et al*, 1989; Francioli *et al*, 1991; Entenza *et al*, 1994).

Perante estes problemas e resultados controversos torna-se evidente que estudos deverão ser realizados, a fim de esclarecer os esquemas terapêuticos adequados para o tratamento das estafilococias.

Uma grande atenção tem sido dada aos esquemas terapêuticos para a erradicação de portadores. As fossas nasais, o períneo e feridas abertas são locais comuns de colonização por *S. aureus* e portanto não só afectam os doentes como o pessoal

médico e paramédico das unidades hospitalares pelo que todos os mencionados podem participar na disseminação da infecção estafilocócica (Keane et Cafferkey , 1991).

Várias terapêuticas têm sido propostas para a erradicação de portadores, sendo utilizada uma terapêutica oral ou local ou em associação (Peterson *et al*, 1990).

A introdução recente no mercado nacional de mupirocina (ácido pseudomónico), um antibiótico tópico, revela resultados interessantes na erradicação de portadores nasais de *Staphylococcus* spp como é revelado por dados clínicos internacionais.

Os resultados do nosso estudo, *in vitro*, realizado com estirpes de *S. aureus* isoladas de doentes do ambulatório e de doentes hospitalares e com estirpes isoladas de portadores nasais assintomáticos de *S. aureus* e *S. epidermidis* permitem-nos tirar as seguintes conclusões:

- 1- A quase totalidade das estirpes de *S. aureus* é produtora de beta-lactâmases, havendo um claro predomínio de beta-lactâmases do tipo A (58,3%). Cerca de 23% das estirpes produzem beta-lactâmases do tipo B e cerca de 19% produzem beta-lactâmases do tipo C. Nenhuma estirpe é produtora de beta-lactâmase do tipo D;
- 2- A beta-lactâmase do tipo A é mais activa que as outras contra a cefazolina e as beta-lactâmases do tipo C são menos susceptíveis que as do tipo A e B à inibição pelo ácido clavulânico e tazobactam. Por sua vez o tazobactam é menos eficaz que o ácido clavulânico contra os 4 tipos de beta-lactâmases;
- 3- Nas estirpes de *S.aureus* oriundas do ambulatório as beta-lactâmases são o único determinante de resistência aos antibióticos beta-lactâmicos, pelo que as penicilinas hidrolisáveis associadas a inibidores de beta-lactâmases (amoxicilina+ácido clavulânico e piperacilina+tazobactam), as isoxazolilpenicilinas (oxacilina), cefalosporinas de 1ª geração (cefalotina) e de 2ª geração (cefuroxima) são totalmente eficazes, *in vitro*;
- 4- Nas estirpes ambulatórias de *S. aureus*, virginiamicina, cloranfenicol, vancomicina e teicoplanina são totalmente eficazes, *in vitro*, logo seguidas de netilmicina, rifampicina e ciprofloxacina com 99.1% de actividade;
- 5- Cerca de 32% das estipes hospitalares de *S. aureus* são resistentes à meticilina/oxacilina e co-resistentes aos outros beta-lactâmicos, excepto ao cefamandol, cefalotina e imipenemo;

6- As estirpes de *S. aureus* Met^R exibem maior incidência de resistências aos antibióticos não beta-lactâmicos do que as estirpes Met^S, sendo totalmente susceptíveis à vancomicina, teicoplanina e mupirocina. As diferenças são estatisticamente significativas;

7- Rifampicina (10,7% de resistências), ácido fusídico (4,0%), cloranfenicol (4,0%) e virginiamicina (2,0%) isoladamente ou em associação deverão ser tidos em conta no tratamento das estafilococias por estirpes Met^R;

8- O principal mecanismo de resistência observado nas estirpes de *S. aureus* aos aminoglicosídeos-aminociclitois é devido à enzima bi-funcional APH(2'')+AAC(6') isoladamente (19,2%), e associado a Ant(4')-I (23,1%) e a APH-(3')-III(48,1%). A netilmicina revelou-se como sendo o antibiótico de maior actividade, *in vitro*, em relação aos outros aminoglicosídeos incluindo a isepamicina, um novo antibiótico aminoglicosídeo-aminociclitol não usado ainda terapêuticamente no nosso País;

9- O comportamento dos antibióticos MLS face às estirpes de *S. aureus* revelou-se heterogêneo, tendo sido detectados 5 fenótipos;

10- A resistência MLS é mais significativa nas estirpes hospitalares e quase sempre associada às estirpes de *S. aureus* Met^R. Em 96 estirpes (14,0%) observaram-se resistências do tipo constitutivo à eritromicina, claritromicina, espiramicina, lincomicina, clindamicina. Somente em 3 estirpes foi observada resistência à virginiamicina, provavelmente produtoras de acetiltransferases; em 64 estirpes(9,3%) observou-se resistência cruzada entre a eritromicina, e claritromicina existindo um antagonismo, *in vitro*, entre estes antibióticos e os macrólidos de 16 elementos (espiramicina) e as lincosamidas (lincomicina, clindamicina);

11- Foram detectadas 20 estirpes (2,9%) de *S. aureus* resistentes à lincomicina e susceptíveis aos outros antibióticos MLS. Este fenótipo foi apenas descrito em *Staphylococcus haemolyticus*;

12- A maior actividade de minociclina comparada com a tetraciclina contra as nossas estirpes de *S. aureus* levou-nos a admitir que a proteína Tet K está presente na membrana citoplasmática da maioria das nossas estirpes;

13- As quinolonas, trimetoprim-sulfametoxazol e outros agentes antimicrobianos não parecem constituir alternativas terapêuticas para o tratamento empírico das estafilococias;

14- Mupirocina, um antibiótico tópico produzido por *Pseudomonas fluorescens*, revelou-se, *in vitro*, totalmente eficaz contra as estirpes patogénicas de *S. aureus* Met^S e Met^R e contra as estirpes nasais de *S. aureus* e *S. epidermidis* de portadores assintomáticos. Estes resultados fazem prever a boa eficácia deste composto na erradicação nasal de *Staphylococcus* de doentes e do pessoal médico e paramédico hospitalar; resultados idênticos foram obtidos com o ácido fusídico;

15- Não foi possível estabelecer qualquer correlação de natureza epidemiológica entre as estirpes patogénicas e as estirpes nasais de *S. aureus*, pela determinação do grupo fágico.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

The strategy for the treatment of staphylococcal infections has to take into consideration the behaviour of strains, *in vitro*, in presence of antibiotics. *S. aureus*, being Gram positive, is primarily treated with beta-lactam antibiotics. However, as evidenced by our results, the majority of *S. aureus* ambulatory strains produced beta-lactamases which inactivate penicillin and other hydrolysable penicillins. The therapeutic strategy to overcome the production of beta-lactamases resistant penicillins (methicillin and first and second generation cephalosporins) or the use of hydrolysable penicillins associated with beta-lactamase inhibitor combinations (amoxicillin+clavulanic acid; ampicillin+sulbactam; piperacillin+tazobactam). In the case of penicillin allergic patients, other antimicrobial groups may be used, namely the macrolides.

In hospital environment, a great number of *S. aureus* strains produce PBP2 or PBP2', a new PBP with low affinity for beta-lactam antibiotics, in spite of the fact that, *in vitro*, cephalotin, cephmandol and imipenem reveal some activity against *S. aureus* Met^R strains. Additionally these strains produce beta-lactamases.

In order to overcome this problem, non beta-lactam antibiotics are commonly used, namely vancomycin or teicoplanin. The results, *in vitro*, show that both antibiotics are very effective. It has not been proved yet, *in vivo*, the total effectiveness of these medical drugs in monotherapy or with other drugs as rifampicin.

As we noted before, *S. aureus*, Met^R strains show PBP2a or PBP2' with low affinity for the beta-lactams and most of the strains produce beta-lactamases. The effectiveness of beta-lactam antibiotics against these strains may only be effective if it combines with the PBP2a receptor and escapes beta-lactamases hydrolysis if it combines with the PBP2a receptor and escapes beta-lactamases hydrolysis. According to some authors, this is possible to achieve, the therapeutic effectiveness of the amoxicillin+clavulanic acid association and ampicillin+sulbactam against infections by *S. aureus* Met^R having been described (Cantoni *et al*, 1989; Francioli *et al*, 1991; Entenza *et al*, 1994).

Face to these controversial problems and results it seems obvious that studies will have to be developed, in order to clarify the adequate therapeutic schemes in the treatment of staphylococcal infections.

A major attention has been given to the therapeutic schemes for the common places of colonisation by *S. aureus* and therefore they do not only affect the patients but also

the medical paramedical staff of hospital units, in consequence of which all of them can participate in the dissemination of staphylococcal infection (Kean *et al*; 1991).

Several therapies have been suggested for the eradication of carriers, an oral or local therapy in association being used.

The recent introduction of mupirocin (pseudomonic acid), a topical antibiotic, in the national market, reveals interesting results in the eradication of nasal carriers of *Staphylococcus* spp, as it is shown by clinical international data.

The results of our study, *in vitro*, realised with *S. aureus* strains which had been isolated from ambulatory and hospital patients as well as from asymptomatic *S. aureus* and *S. epidermidis* carriers, allow us to draw the following conclusions:

- 1- Almost all *S. aureus* strains are beta-lactamases producers, with an evident prevalence of type A beta-lactamases (58,3%). Nearly 23% of the strains produce type B beta-lactamases and about 19% produce type C beta-lactamases. None of the strains are type D beta-lactamases producers.
- 2- Type A beta-lactamases are more active than the other against cefazolin and type C beta-lactamases are less susceptible than type A and B ones to inhibition through clavulanic acid and tazobactam. On the other hand, tazobactam is much less effective against the four types of beta-lactamases than clavulanic acid;
- 3- In ambulatory *S. aureus* strains, beta-lactamases are the only mechanism of resistance to beta-lactam antibiotics, in consequence of which hydrolysible penicillins, associated to beta-lactamase inhibitor (amoxicillin+clavulanic and piperacillin+tazobactam), isoxazolil-penicillins (oxacillin), first generation cephalosporin (cephalotin) and second generation cephalosporins (cephuroxime) are totally effective, *in vitro*;
- 4- In *S. aureus* ambulatory strains, virginiamicin, cloranfenicol, vancomicin and teicoplanin are totally effective *in vitro*, immediately followed by netilmicin, riphampicin and ciprofloxacin, with 99,1% activity;
- 5- About 32% of *S. aureus* hospital strains are methicillin/oxacillin resistant and co-resistant to the other beta-lactams, except to cephamandol, cephalotin and imipenem;
- 6- *S.aureus* Met^R stains show a higher incidence of resistance to non beta-lactams antibiotics than Met^S strains, being totally susceptible to vancimicin, teicoplanin and mupirocin. The differences are statistically relevant;

7- Riphampicin (10,7% of resistance), fusidic acid (4,0%), cloranfenicol(4,0%) and virginiamicina (2.0%), isolated or associated, ought to be taken into consideration in the treatment of staphylococcal infections by Met^R strains;

8- The main mechanism of resistance to aminoglycoside observed in *S. aureus* strains is owed to the bi-functional APH (2'''+AAC(6')) enzyme. Netilmicin proved to be the most active antibiotic, *in vitro*, compared to the other aminoglycoside, including isepamicin, a new antibiotic, not yet in use in our country;

9- The behaviour of MLS antibiotics towards *S. aureus* strains proved to be heterogeneous, five phenotypes having been found;

10- MLS resistance is more significant in hospital strains. In 96(14%9 strains, constitutive type resistances to erythromycin have been found. Only in three strains has resistance to virginiamicin been observed, because they are probably acetyltransferase producers; in 64 (9,3%) strains, a cross-resistance has been observed between erythromycin and clarithromycin, an antagonism being found, *in vitro*, between these antibiotics and the 16-emembered-macrolides (spiramicin) and lincosamids (lincomycin, clindamicin);

11- 20 (2,9%) *S. aureus* strains have been found resistant to lincomycin and susceptible to the other MLS antibiotics. This phenotype has only been described in *Staphylococcus haemolyticus*;

12- The greater activity of minociclin compared to tetracycline against *S. aureus* strains made us admit that tet k protein is present in the cytoplasmic membrane of most of our strains;

13- Quinolonas, trimetropim-sulphametoxazol and other antimicrobial agents do not seem to constitute a therapeutic to the empiric treatment of staphylococcal infections ;

14- Mupirocin, a topical antibiotic produced by *Pseudomonas fluorescens*, proved to be, *in vitro*, totally effective against *S. aureus* Met^S and Met^R pathogenic strains and against *S. aureus* and *S. epidermidis* nasal strains of asymptomatic carriers. These results make us foresee the high level of effectiveness of this compound in the eradication of *Staphylococcus* in hospital medical and paramedical staff;

15- It has not been possible to establish any correlation of epidemiologic kind between pathogenic strains and *S. aureus* nasal strains through determination of phagic group.

BIBLIOGRAFIA

ACAR JF, COURVALIN P, CHABERT YA. Methicillin-resistant staphylococemia: bacteriological failure of treatment with cephalosporins. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1970;**14**: 280-285.

ALDRIDGE KE, JANNEY A, SANDER CV and MARIER ML. Interlaboratory variation of antibiogram of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *S. aureus* strains with conventional and commercial testing systems. **Journal of Clinical Microbiology** 1983;**18**:1126-1236.

ALDRIDGE KE, JANNEY A and SANDERS CV. Comparison of the activities of coumermycin, ciprofloxacin, teicoplanin, and other non-beta-lactam antibiotics against clinical isolates of methicillin-resistant *S. aureus* from various geographical locations. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1985; **28**: 634-638.

ALLEMANDI DA, ALOVERO FL and MANZO RH. *In vitro* activity of new sulphanilil fluorquinolones against *S. aureus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 1994; **34**: 261-265.

ALVAREZ S, JONES M and BERK SL. *In vitro* activity of fosfomycin, alone and in combination, against methicillin-resistant *S. aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1985; **28**: 689-690.

AMINOGLYCOSIDE RESISTANCE STUDY GROUPS (including: NETO MH, SOUSA JC, VAZ MJ). The most frequently occurring aminoglycoside resistance mechanisms. Combined results of surveys in eight regions of the World. **Chemotherapy Journal (in press)** 1995.

AMINOGLYCOSIDE RESISTANCE STUDY GROUPS. Resistance to aminoglycosides in *Pseudomonas*. **Trends in Microbiology** 1994; **2**: 247-253.

AYLIFFE GAF, BRUMFITT W, CASEWELL MWC, COOKE EMC, COOKSON B D, DUCKWORTH G J, KEANE CT, MARPLES MR, PHILLIPS I, SHANSON DC, SIMONS NA, WILLIAMS JD. Revised guidelines for the control of epidemic methicillin-resistant *S. aureus* : repport of a combined Working party of the Hospital Infection Society and the British Society of Antimicrobial Chemotherapy. **Journal of Hospital Infections** 1990;**16**: 351-377.

ARATHOON EG, HAMILTON JR, HENCH CE and STEVENS DA. Efficacy of short courses of oral novobiocin-rifampin in eradicating carrier state of methicillin-resistant *S. aureus* and *in vitro* killing studies of clinical isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1990; **34**: 1655-1659.

ARCHER GL and JOHNSTON LJ. Self-transmissible plasmids in Staphylococci that encode resistance to aminoglycosides. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1983 ; **24**:70-77.

ARCHER GL, KRACHMER AW, VISHNIAVSKY N and JOHNSTON JL. Plasmid-pattern analysis for the differentiation of infecting from noninfecting *Staphylococcus epidermidis*. **Journal of Infectious Diseases** 1984 ; 149:913-920.

ARCHER GL, DIETRIK DR and JOHONSTON JL. Molecular epidemiology of transmissible gentamicin resistance among coagulase negative Staphylococci in a cardiac surgery unit. **Journal of Infectious Diseases** 1985; **151**: 243-251.

ARCHER GL, and PENNELL E. Detection of methicillin-resistance in Staphylococci by using a DNA probe. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1990;**34**:1720-1724.

ARCHER GL. Alteration of cutaneous staphylococcal flora as a consequence of antimicrobial prophylaxis. **Review of Infectious Diseases** 1991;**13**: 5805-5809.

ARCHER GL and CLIMO MW. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative Staphylococci. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1994; **38**: 2231-2237.

ARTHUR M and COURVALIN P. Genetics and mechanisms of glycopeptide resistance in Enterococci. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1993; **37**: 1563-1571.

BACKER CN, STOCKER SA, CULVER DH and THORNSBERRY C. Comparison of E test to agar dilution, broth microdilution, and agar diffusion susceptibility testing techniques by using a special challenge set of bacteria. **Journal of Clinical Microbiology** 1991; **29**:533-538

BAILEY & SCOTT'S. Diagnostic Microbiology. (1990). 8ª Edição. The C.V. Mosby company.

BANNERMAN TL, WADIK DL, and KLOOS WE. Susceptibility of *Staphylococcus* species and subspecies to teicoplanin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1991; **35**: 1919-1922.

BARG N, CHAMBERS H and KERNODLE D. Borderline susceptibility to antistaphylococcal penicillins is not conferred exclusively by the hyperproduction of beta-lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1991; **35**:1975-1979.

- BARNE JCJ and WILLIAM DH. The structure and mode of action of glycopeptide antibiotics of the vancomycin group. **Ann. Review Microbiology** 1984; **38**: 339-357.
- BLUMBERG HM, RIMLAND D, CARROLL DJ, TERRY P and WACHSMUTH I K. Rapid development of ciprofloxacin resistance in methicillin-susceptible and resistant *S. aureus*. **Journal of Infectious Diseases** 1991; **163**:1279-1285.
- BOELAERT JR, VAN LANDUYT HV, GODARD CA. Nasal mupirocin ointment decreases the incidence of *S. aureus* bacteraemias in haemodialysis patients. **Journal of Hospital Infection** 1991; **17**: 133-137.
- BOELAERT JR, de SMEDT RA, de BAERE YA. The influence of calcium mupirocin nasal ointment on the incidence of *S. aureus* infections in haemodialysis patients. **Nephrology Dialysis Transplant** 1993; **4**: 278-281.
- BONFIGLIO G and LIVERMORE DM. Behaviour of beta-lactamase-positive and-negative *Staphylococcus aureus* isolates in susceptibility tests with piperacillin/tazobactam and other beta-lactam/beta-lactamase inhibitor combinations. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 1993 **32**:431-444.
- BONFIGLIO G and LIVERMORE DM. Beta-lactamase types amongst *Staphylococcus aureus* isolates in relation to susceptibility to beta-lactamase inhibitor combinations. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 1994; **33**: 465-481.
- BOYCE JM. Reevaluation of the ability on the standardized disk diffusion test to detects methicillin-resistant strains of *S. aureus*. **Journal of Clinical Microbiology** 1984; **19**:813-817.
- BOYCE JM and MEDEIROS AA. Role of beta- lactamases in expression of resistance by methicillin-resistant *S. aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1987; **31**:1426-1428.
- BOYCE JM, OPAL SM, CHOW JW, ZERVOS MJ, POTTER-BYNOE G, SHERMAN CB, ROMULO RLC, FORTNA S and MEDEIROS AA. Outbreak of multidrug-resistant *Enterococcus faecium* with transferable VanB class vancomycin resistance. **Journal of Clinical Microbiology** 1994; **32** :1148-1153.

BRADFORD MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochemistry** 1966; **72**: 248-254.

BRINK AJ, HUYGENS, RENSBURG AJV. Alternative antimicrobial options against multiply resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 1993; **31**: 180-182.

BROWN DFJ and REYNOLDS PE. Intrinsic resistance to beta-lactam antibiotics in *S. aureus*. **FEBS Letter** 1980; **122**: 275-278.

BROWN GM. The biosynthesis of folic acid: inhibition by sulfonamides. **Journal Biological Chemistry** 1962; **237**:536-542.

BRUMFITT W and HAMILTON-MILLER J. Methicillin-resistant *S. aureus*. **New England Journal of Medicine** 1989;**320**:1189-1196.

BUCK MA, COOPERMAN BS. Single protein omission reconstitution studies of tetracyclin binding to the 30S subunits of *E. coli* ribosomes. **Biochemistry** 1990; **29**: 5374-5379.

BUCKWOLD FJ, ALBRITTON WL, RONALD AR, LERTZMAN J. and HENRIKSEN R. Investigations of the occurrence of gentamicin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1979; **15**:152-156.

BURCHALL JJ and HITCHINGS GH. Inhibitor binding analysis of dihydrofolate-reductases from various species. **Molecular Pharmacology** 1965; **1**:126-136.

BURNS K, CANNON M and GRUNDIFFE E. A revolution of complicating reports concerning the mode of action of fusidic acid. **Federation European Biochemistry Society** 1974; **40**: 219-223.

CANTONI L, WENZER A, GLAUSER M P and BILLE J,. Comparative efficacy of amoxicillin-clavulanate, cloxacilline and vancomycine against methicillin-sensitive and methicillin-resistant *S. aureus* endocarditis in rats. **Journal of Infectious Disease** 1989; **159**: 989-993.

CASEWELL MW, HILL RLR. *In vitro* activity of mupiricin (pseudomonic acid), a new antibiotic for topical use. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1985; **27**: 495-498.

CASEWELL MW, HILL RLR. Elimination of nasal carriage of *S. aureus* with mupirocin (pseudomonic acid)- a controlled trial. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 1986; **17**: 365-372.

CASEWELL MW, HILL RLR. The carrier state: methicillin-resistant *S. aureus*. **Journal Antimicrobial Chemotherapy** 1986; **18**: 1-12 (Suppl. A).

CASEWELL M, HILL RLR. Minimal dose requirements for nasal mupirocin and its role in the control of epidemic MRSA. **Journal of Hospital Infection** 1991; **19**: 35-40 (Suppl. B).

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Nosocomial enterococci resistant to vancomycin- United States. **Morbidity Mortality Weekly** 1989-1993, 1993; **42**: 597-599.

CHABBERT JA and COURVALIN P. Synergie des composants des antibiotiques du groupe de la streptogramine. **Phatology Biologic** 1971; **19**:613-619.

CHAMBERS HF. Coagulase-negative Staphylococci resistant to beta-lactam antibiotics *in vivo* produced penicillin-binding protein 2a. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1987; **31**: 1919-1924 .

CHAMBERS HF and SANDE MA .Teicoplanin versus nafcillin and vancomycin in the treatment of experimental endocarditis caused by methicillin-susceptible or-resistant *S. aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1984; **26**: 61-64.

CHAMBERS HK, HACKBARTH CJ, DRAKE TA, RUSNAK MG and SANDE MA. Endocardite due to methicillin-resistant *S. aureus* in rabbits: expression of resistance to beta-lactam antibiotics *in vivo* and *in vitro*. **Journal of Infectious Diseases** 1984;**149**:894-903.

CHAMBERS HF. Methicillin-resistant Staphylococci. **Clinical Microbiological Reviews** 1988; **1**:173-186.

CHAMBERS HF, ARCHER G and MATSUHASHI. Low-level methicillin resistance in strains of Staphylococcus aureus. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1989; **33**: 424-428.

CHAMBERS HF. Treatment of infection and colonization caused by a methicillin-resistant *S aureus*. **Infections Control of Hospital Epidemiology** 1991; **12**: 29-35.

CHOPRA F, HAWKEY P M and HINTON M. Tetracyclines, molecular and clinical aspects. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 1992; **29**: 245-277.

CHOPRA F. Efflux based antibiotic resistance mechanisms: the evidence for increasing prevalence. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 1992; **30**: 737-739.

CHOW JW, YN VL. *S. aureus* nasal carriage in hemodialysis patients. **Archives Internal Medicin** 1989; **149**: 1258-1262.

CHOW JW, KURITZA A, SHALAES DM, GREEN M, SAHM DF and ZERUN J. Clonal spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* between patients in three hospitals in two states. **Journal of Clinical Microbiology** 1993; **31**: 1609-1611.

COLLEY EW, McNICOL MW, BRACKEN PM. Methicillin-resistant Staphylococci in a general hospital. **Lancet** 1989; **13**:595-597.

COOKE ME. (1993). Patterns of methicillin-resistant outbreaks in the U K and World Wide. In : Casewell, R.M. et col. (eds). Methicillin-resistant *S. aureus*, Wells Medical, Ld, pag. 37-40.

COOKSON BD, LACEY RW, NOBLE WC. Mupirocin-resistant *S. aureus*. **Lancet** 1990; **335**: 1095-1096.

COSTA MN, COSTA D, RIBEIRO CG, MOREIRA JS, SALGADO MJ, PATO MVV. Padrões portugueses de resistências bacterianas aos antibióticos. **Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas** 1993; n° 1 : 63-71.

COUGHTER JP, JOHNSTON JL and ARCHER GL. Characterization of a Staphylococcal trimethoprim resistance gene and its product. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1987; **31**:1027-1032.

COURTIEU AL, GUILHERMET FN, LONGE-RAY C, MAKAG, et CHABERT YA. A fréquence des Staphylocoques presentant une resistance heterogene à la méthicilline et à l'oxacilline en milieu hospitalier. **Annals Institut Pasteur(Paris)** 1964;**107**: 191-197.

COURVALIN P, CARLIER C and CHABBERT J. Plasmid-linked tetracycline and erythromycin resistant in group D *Streptococcus*. **Annals Institute Pasteur (Paris)** 1972; **123**:755-759.

COURVALIN P and CARLIER C. Resistance towards aminoglycoside-aminocyclitol antibiotics in bacteria . **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 1981; **8 (suppl A)**:50-57.

CRAVEN DE, KOLLISCH NR, HASEIH CR, CONOLLY MG and McCABE WR. Vancomycin treatment of bacteremia caused by oxacillin-resistant *S. aureus*: comparison with beta-lactam antibiotic treatment of bacteremia caused by oxacillin-sensitive *S. aureus*. **Journal of Infectious Diseases** 1983; **147** :137-143.

CURTIS NAC, HAYES MV, WYKE AW and WARD JB. A mutant of *S. aureus* H lacking penicillin-binding protein 4 and transpeptidase activity *in vitro*. **FEMS Microbiology Letter** 1980; **9**: 263-266.

CURTIS NAC and HAYES MV. A mutant of *S. aureus* H deficient in penicillin-binding-protein 1 is viable. **FEMS Microbiology Letter** 1981; **10**:227-299.

DAVIES J, DAVIES BD. Misreading of ribonucleic acid code words induced by aminoglycoside antibiotics. **Journal of Biological Chemistry** 1968; **243**: 3312-3316.

DAVIES J and SMITH DI. Plasmid-determined resistance to antimicrobial agents. **Annals of Review Microbiology** 1978; **32**: 469-518.

DAWN TE, SCHABERG DR, TERPENNING MS, SOTTILE CA, KAUFFMAN. Increasing of resistance of *S. aureus* to ciprofloxacin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1990; **34**: 1862-1863.

DI PIRO JT, BOWDEN TA and HOOKS VH. Prophylatic parenteral cephalosporins in surgery: are the newer agents better ? **American Medical Association** 1984;**252**:3277-3279.

DOEBBELING BN, BRENNEMAN DL, NEU HC, ALY R, YANGCO BG, HOLLEY HP, MARSH RJ, PFALLER MA, McGOWAN JE, SCULLY BE, REAGAN DR, WENZEL RP and the Mupirocin Collaborative Study Group. Elimination of *Staphylococcus aureus* nasal carriage in health care workers: analysis of six trials calcium mupirocin ointment. **Clinical Infectious Diseases** 1993; **17**: 466-474.

DOMAGALA JM, HANNA LD, HEIFITZ CL, HUTT MP, SANCHEZ JP and SOLOMON M. New structure activity relationships of the quinolone antibacterials using the enzyme. The development and application of a DNA gyrase assay. **Journal of Medical Chemistry** 1986; **29**:394-404.

DREW WL, BARRY AL, O'TOOLE R and SHERNI JC. Reability of Kirby-Bauer disk diffusion method for detecting methicillin-resistant strains of *S. aureus*. **Pathology** 1972;**4**:247-252.

DUCKWORTH GJ, LOTHIAN JLE, and WILLIAMS JD. Methicillin-resistant *S. aureus*: report of an outbreak in a London teaching hospital. **Journal of Hospital Infections** 1988; **11**:1-15.

ELIOPOULOS GM, WENNERSTEN CB, COLE G AND MOELLERING RC. *In vitro* activities of two glycylicyclines against Gram-positive bacteria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1994; **38**: 534-541.

ELWELL LP, WILSON HR, KNICK VB and KEITH BR. *In vitro* and *in vivo* efficacy of the combination trimethoprim-sulfamethoxazole against clinical isolates of methicillin-resistant *S. aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1986; **29**: 1092-1094.

ENTENZA J, FLUCKIGER U, GLAUSER MP and MOREILLON P. Antibiotic treatment of experimental endocarditis due to methicillin-resistant *S. epidermidis*. **Journal of Infectious Disease** 1994; **170**: 100-109.

EYKYN S.J. Staphylococcal sepsis. The clamping pattern of disease and therapy. **Lancet** 1988; **i**; 100-104.

FABER M and THAMDRUP RV. Susceptibility to fusidic acid among Danish *S. aureus* strains and fusidic acid consumption. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 1990; **25**: 7-14

FAN W, DEL BUSTO R, LOVE M, MARKOVITZ N, CENDROWSKI JC, QUINN E and SARAVOLATZ L. Imipenem-cilastatin in the treatment of methicillin-sensitive and methicillin-resistant *S. aureus* infections. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1986; **29**: 26-29.

FAVILLA MJ, ZASKE DE, KAPLAN EL, GROSSLEY K, SABATH LD and QUIE PG. *S. aureus* endocarditis: combined therapy with vancomycin and rifampin. **Journal of American Medical Association** 1978; **240**: 1963-1965.

FERNANDEZ C, GASPAR C, TORRELAS A, VINDEL A, SAEZ-NIETO JA, CRUZET F and AGUILAR LA. A double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial to evaluate the safety and efficacy of mupirocin calcium ointment for eliminating nasal carriage of *S. aureus* among hospital personnel. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 1995; **35**: 399-408.

FONG JW, ENGEL KING ER, KIRBY WMN. Relative inactivation by *S. aureus* of eight cephalosporins antibiotics. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1976; **9**:939-944.

FRANCIOLLI M, BILLE J, GLAUSER MP and MOREILLON PH. Beta-lactam resistance mechanisms of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Infectious Diseases** 1991; **163**: 514-523.

FRONGILLO MF, BRIANCHI P, MORETTI A, PASTICCI BM, RIPA S and PAULUZZI S. Cross-resistance between methicillin and cephalosporins for staphylococci: a general assumption not true for cefamandole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1984; **25**: 666-668.

FRONGILLO RF, DONATI L, FEDERICO G, MARTINO P, MARONI M, ORTONA L, PALUMBO M, PASTICCI BM, PIZZIGALLO E, PRIVITERA G, SERRA P, SIGNORINI M, VENDITTI M and PAULUZZI S. Clinical comparative study on the activity of cefamandole in the treatment of serious staphylococcal infections caused by methicillin-susceptible and methicillin-resistant strains. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1986; **29**: 789-796.

GALETTO DW, JONHSTON JL and ARCHER GL. Molecular epidemiology of trimethoprim resistance among coagulase-negative Staphylococci. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1987; **31**: 1683-1688.

GARROD LP. The erythromycin group of antibiotics. **British Medical Journal** 1957; **2**:57-63.

GAYRAL JP, ALBERTINI MT, GALLICE E and OLLEON R. Sensibilité à 27 antibiotiques de 858 souches de Staphylocoques. **Pathology Biologic** 1986; **34**:368-371.

GEHA DJ, JAMES R, GUSTA FERRO CA and PERSING DH. Multiplex P.C.R. for identification of methicillin-resistant *Staphylococcus* in the Clinical Laboratory. **Journal of Clinical Microbiology** 1994; **32**: 1768-1772.

GEORGOPAPADAKOU NH and LIN FY. Binding of beta-lactam antibiotics to penicillin-binding proteins of *S. aureus* and *Streptococcus faecalis*: relation to antibacterial activity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1980; **18**: 834-836.

GEORGOPAPADAKOU NH, SMITH SA and BONNER DP. Penicillin-binding proteins in a *Staphylococcus aureus* strains resistant to specific beta-lactam antibiotics. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1982; **22**:172-175.

GEORGOPAPADAKOU NH, DIX BA and MAURIZ YR. Possible physiological functions of penicillin-binding proteins in *S. aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1986; **29**:333-336.

GEORGOPAPADAKOU NH. Penicillin-binding proteins and bacterial resistance to beta-lactams. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1993; **37**: 2045-2053.

GILBERT DN, WOOD CA, KIMBROUGH R. Infections Diseases Consortium of Oregon. Failure of treatment with teicoplanin at 5mg/Kg/day in patients with *S. aureus* intravascular infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1991; **35**: 79-87.

GOLD HS, UNAL S, CERCENADO E, THAUVIN-ELIOPONLOR C, ELIOPONLOR GM, WENNERSTEN CB and MAELLERING MC. A gene emerging resistance to vancomycin but not teicoplanin in isolates of *E. faecalis* and *E. faecium* demonstrate homology with van B, van A and van C genes of enterococci. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1993; **37**:1604-1609.

GOLDMAN R C and CAPOBIANCO JO. Role of an energy-dependent efflux pump in plasmid pNE24-mediated resistance to 14 and 15-membered macrolides in *S. epidermidis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1990; **34**: 1973-1980.

GOLDMAN RC, FESIK SW and DORAN C. Role of protonated and neutral forms of macrolides in binding to ribosomas from Gram-positive and Gram-negative bacteria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1990; **34**: 426-431.

GOPAL V, BISNO AL and SILVERBLATT FJ. Failure of vancomycin treatment in *S. aureus* endocarditis: *in vivo* and *in vitro* observations. **Journal American Medicine Association** 1976; **236**: 1604-1606.

GRADELSKY E, HUCZKO E, KESSLER RE, BONNER DE and FUNG-TOMC J. Beta lactamases parameters of heterogenously and homogenously methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 1993; **31**:441-442.

GRAY GS and FITCH WR. Evolution of antibiotic resistance genes: the DNA sequence of a Kanamycin resistance gene from *S. aureus*. **Molecular Biology Evolution** 1983 ; **1**: 57-66.

GREEN M, BINCZEWSKI B, PASCULLE AW, EDMUND M, BARBADORO K, KUSNE S and SHLAES DM. Constitutively vancomycin-resistant *E. faecium* resistant to synergistic beta-lactam combinations. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1993; **37**: 1238-1242.

GREENBERG RN. Treatment of bone, joint and vascular-associated gram-positive bacterial infections with teicoplanin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1990; **34**: 2392-2397.

GREENWOOD D and O'GRADY F. Scanning electron microscopy of *S. aureus* exposed to some common anti- Staphylococcal agents. **Journal of General Microbiology** 1972; **70**: 263-270.

GREENWOOD D .Microbiological properties of teicoplanin. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 1988; **21**: 1-3 (Suppl.A).

GROSSLEY K, LANDESMAN B and ZASKE D. An outbreak of infections caused by strains of *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin and aminoglycosides. II Epidemiologic Studies. **Journal of Infectious Diseases** 1979; **139**:280-287.

GUENTHNER SH and WENZEL RP. *In vitro* activities of teichomycin, fusidic acid, flucloxacillin, fosfomycin, and vancomycin against methicillin-resistant *S. aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1984; **26**:268-269.

GUTMANN L, AL-OBEID S, BILLOT-KLEIN D, GUERRIER ML and COLLATZ E. Synergy and resistance to synergy between beta-lactam antibiotics and glycopeptides against glycopeptide-resistant strains of *E. faecium*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1994; **38**: 824-829.

HACKBARTH C J and CHAMBERS H F. Methicillin-resistant Staphylococci: genetics and mechanisms of resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1989;**33**:991-994.

HALEY RW, HIGHTOWER AW, KHABBAZ MF, THORNSBERRY C, MATONE WJ, ALLEN JR and HUGHES JM. The emergence of methicillin-

-resistant *Staphylococcus aureus* infections in United States hospitals: possible role of in house staff-patient transfer circuit. **Annals of Internal Medicine** 1982; **97**:297-308.

HARE RS, SHAW KJ and SATELLIET FJ. Survey of a aminoglycoside resistance in 30 U.S.A. hospitals. Abst 675:215. 89th Interci Conf. **Antimicrobial Agents and Chemoterapy** . American Society for Microbiology, Washington, D.C.1989.

HARNETT N, BROWN S and KRISHAN C. Emergence of quinolone resistance among clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Ontario, Canada. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1991; **35**:1911-1913.

HARTMAN BJ and TOMASZ A. Expression of methicillin-resistance in heterogeneous strains of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1986; **29**: 85-92.

HARTMAN BJ and TOMASZ A. Low affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in *S. aureus*. **Journal of Bacteriology** 1984; **158**: 513-516.

HARVEY CL, KNIGHT SG and SIH CJ. On the mode of action of fusidic acid. **Biochemistry** 1966; **5**: 3320-3327.

HAYDEN MK, TRENHOLME GM, SCHULTZ JE and SAHM DF. *In vivo* development of teicoplanin resistance in a van B *E. faecium* isolate. **Journal of Infectious Diseases** 1993; **167**: 1224-1227.

HORI S, OHSHITA, Y, UTSUI Y and HIRMATSU K. Sequential aquisition of norfloxacin and ofloxacin resistance by methicillin-resistant and susceptible *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1993;**37**:2278-2284.

JENSSEN WD, THAKKER-VARIA S, DUBIN D T and WEINSTEIN MP. Prevalence of Macrolides-Lincosamides-Streptogramin B resistance and erm gene classes among clinical strains of Staphylococci and Stretococci. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1987; **31**:883-888.

JEVONS MP. "Celbenin"-resistant Staphylococci. **British Medical Journal** 1961; **1**:124-125.

JOHNSON AP, UTTLEY AHC, WOODFORD and GEORGE RC. Resistance to vancomycin and teicoplanin: an emerging clinical problem. **Clinical Microbiologic Review** 1990; **3**: 280-291.

JOHNSON FJ, GRIESHOP TJ, ATKINS LM and PLATT CG. Widespread colonization of personnel at veterans affairs medical center by methicillin resistant coagulase-negative *Staphylococcus*. **Clinical Infectious Diseases** 1993 ; **17**: 380-388.

JORDAN DC and INNIS WE. Selective inhibition of RNA synthesis in *S. aureus* by vancomycin. **Nature** 1959; **184**: 1894-1895.

JORDAN DC. Effect of vancomycin in synthesis of the cell wall and cytoplasmic membrane of *S. aureus*. **Canadian Journal of Microbiology** 1965; **11**: 390-393.

KAATZ GW, SEO SM, BARRIERE SL, ALBRECHT LM and RYBAK MJ. Efficacy of fleroxacin in experimental methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* endocarditis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1989; **33**: 519-521.

KAATZ GW, SEO SM, BARRIERE SL, ALBRECHT LM and RYBAK MJ. Ciprofloxacin and rifampicin, alone and in combination, for therapy of experimental *S. aureus* endocarditis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1989; **33**: 1184-1187.

KAATZ SW, BARRIERE SL, SCHABREG DR and FEKETY R. Ciprofloxacin versus vancomycin in the therapy of experimental methicillin-resistant *S. aureus* endocarditis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1987; **31**: 527-530.

KAHAN FM, KAHAN JS, CANIDY PJ and KROPP H. The mechanism of action of fosfomicin. **Annals New York Academy Science** 1974; **235**: 364-386.

KAPLAN AH, GILLIGAR PH, FACKLA MR. Recovery of resistant enterococci during vancomycin prophylaxis. **Journal of Clinical Microbiology** 1988; **26**: 1216-1218.

KARCHMER AW, ARCHER GL and DISNUNKES WE. *S. epidermidis* causing prosthetic, valve endocarditis; microbiologic and clinical observations as guides to therapy. **Annals Internal Medicine** 1983; **98**: 447-455.

KAVI J, ANDREWS JM, WISE R. Mupirocin-resistant *Staphylococcus* (letter). **Lancet** 1987; **2**: 1472

KAYER FH and MAK TM .Methicillin-resistant Staphylococcy.**American Medicine Science** 1972;**264**: 197-205.

KAYSER FH, HOMBERGER F and DEVAUD M. Aminocyclitol-modifying enzymes specified by chromosomal genes in *Staphylococcus aureus* . **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1981; **19**:766-772.

KEANE CT and CAFFERKEY MT. Methicillin-resistant *S. aureus*: a guide to epidemiology and control. **Review of Medical Microbiology** 1991; **2**: 50-56.

KEANE CT, COLEMAN DC, CAFFERKEY MT. Methicillin-resistant *S. aureus* - a reappraisal. **Journal of Hospital Infection** 1991; **19**: 147-152.

KENNY MT, DULWORTH JK, BRACKMANN MA. Comparative, *in vitro*, activity of teicoplanin and vancomycin against United States teicoplanin clinical trial isolates of gram-positive cocci. **Diagnostic Microbiologic Infectious Diseases** 1991; **4**: 29-31.

KERNODLE DS, MCGRAW PA, STRATTON CW, and KAISER AB. Use of extracts versus whole-cell bacterial suspensions in the identification of *Staphylococcus aureus* beta-lactamase variants. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1990; **34**:420-425.

KERNODLE DS, STRATTON CW, McMURRAY LW, CHIPLEY JR and MCGRAW PA. Differentiation of beta-lactamase variants of *Staphylococcus aureus* by substrate hydrolysis profiles. **Journal of Infectious Diseases** 1989 ; **159**:103-108.

KIRBY WMM. Extraction of a highly potent penicillin inactivation from penicillin resistant Staphylococci. **Science** 1944; **99**:452-453.

KLIMAK JJ. Clinical, epidemiologic, and bacteriologic observations of an outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at a large community hospital. **American Journal of Medicine** 1976; **61**:340-345.

KLOOS WE and BANNERMAN TL. Update on clinical significance of coagulase-negative Staphylococci. **Clinical Microbiology Reviews** 1994; **7**:117-140.

KOBAYASHI S, ARAI S, HAYASHI S, SAKAGUCHI T. *In vitro* effects of beta-lactams combined with beta-lactamase inhibitors against methicillin-resistant *S.aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1989; **33**:331-335.

KUCERS A and BENNETT N M. The use of antibiotics. J.B.Lippincott, Philadelphia, 1987.

LACEY RW. Antibiotic resistance plasmids of *S. aureus* and their clinical importance. **Bacteriological Review** 1975; **39**:1-32.

LAI CJ, WEISBLUM B, FAHNESTOCK SR and NOMURA M. Alteration of 23S ribosomal RNA and erythromycin-induced resistance to lincomycin and spiramycin in *S. aureus*. **Journal of Molecular Biology** 1973; **74**:67-72.

LAMPSON BC, von DAVID W, and PARISI JT. Novel mechanism for plasmid-mediated erythromycin resistance by pNE24 from *Staphylococcus epidermidis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1986; **30**:653-658.

LAWBURY EJ, BABB JR., BROWN VI and COLLINS BJ. Neomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in a burns unit. **Journal of Hygiene, Cambridge** 1964; **62**:221-228.

Le GOFFI F, CAPMAN ML, D-BONNET CERCEAU C, SOUSSY C, DOUBLANCHET A and DUVAL J. Plasmid-mediated pristinamycin resistance PACII: A new enzyme which modifies pristinamycin. **Journal of Antibiotics** 1977; **30**:665-669.

LECLERCQ R, CARLIER C, DUVAL J and COURVALIN P. Plasmid-mediated resistance to lincomicyne by inactivation in *S. haemolyticus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1985; **28**:421-424.

LECLERCQ R, DERLOT E, DUVAL J and COURVALIN P. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. **New England Journal of Medicine** 1988; **319**: 157-161.

LECLERCQ R, DERLOT E, WEBER M, DUVAL J and COURVALIN P. Transferable vancomycin and teicoplanin resistance in *Enterococcus faecium*. 1989. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1989; **33**:10-15.

LENCASTRE H, FIGUEIREDO A M S, URBAN C, RAHAL J and TOMASZ A. Multiple mechanisms of methicillin resistance and improved methods for detection in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1991; **35**: 632-639.

- LENCASTRE H, JONG B L M, MATTHEWS P R and TOMASZ A. Molecular aspects of methicillin-resistance in *S. aureus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 1994; **33**: 7-24.
- LEVY SB -Active efflux mechanisms for antimicrobial resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1992; **36**: 695-703.
- LIVERMORE DM. Mechanisms of resistance to beta-lactamic antibiotics. **Scandinavian Journal of Infectious Disease Suppl.** 1991; **78**:7-16.
- LUZAR MA, COLE GA, FALLER B. *S. aureus* nasal carriage and infection in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. **New England Journal of Medicine** 1990;**322**: 505-509.
- LYON B, MAY JW and SKURRAY RA. Analysis of plasmids in nosocomial strains of multiple-antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1983 ; **23**: 817-826.
- MADER JT and ADAMS K. Comparative evolution of daptomycin and vancomycin in the treatment of experimental methicillin-resistant *S. aureus* osteomyelitis in rabbits. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1989; **33**: 689-692.
- MALOUIN F and BRYAN LE. Modification of penicillin binding proteins as mechanisms of beta-lactam resistance. Minireviews. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1986 ; **30**: 1-5.
- MANDELL LJ, MURPHY E, STEIGBIGEL NH and MILLER MH. Gentamicin uptake in *Staphylococcus aureus* possessing plasmid-encoded, aminoglycoside-modifying enzymes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1984; **26**:563-569.
- MANDELL GL and MORMAN DR. Treatment of experimental Staphylococcal infections: effect of rifampin alone and in combination or development of rifampin resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1980; **17**: 658-662.
- MANDELL GL and VEST TK. Kill of intra-leukocytic *S. aureus* by rifampin *in vitro* and *in vivo* studys. **Journal of Infectious Diseases** 1972; **125**: 486-490.
- MARKOWITZ ND, POHLOD DJ, SARAVOLATZ LD and QUINN EL . *In vitro* susceptibility patterns of methicillin resistant and susceptible *S. aureus* strains in

a population of parenteral drug abusers from 1972 to 1981. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1983; **23**: 450-457.

MATEOS-MORA M, KNAPP CC and WASHINGTON II JA. Characterization of resistance phenotype and cephalosporin activity in oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1988; **32**:170-174.

McDOUGAL LK and THORNSBERRY C. The role of beta-lactamases in Staphylococcal resistance to penicillinase-resistant penicillins and cephalosporins. **Journal of Clinical Microbiology** 1986 ; **23**:832-839.

MEGAMEY C, LIBKE RD, ENGELKING ER, CLARK JT and KIRBY WMM. Inactivation of cefazolin, cephaloridin and cephalotin by methicillin-sensitive and methicillin-resistant strains of *S. aureus*. **Journal of Infectious Diseases** 1975;**131**:291-294.

MENZIES RE, CORNERE BM and McCULLOCH D. Cephalosporin susceptibility of methicillin-resistant, coagulase-negative Staphylococci. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1987; **31**:42-45.

MILLER GH and the AMINOGLYCOSIDE RESISTANCE STUDY GROUPS. Increasing complexity of aminoglycoside resistance mechanisms in Gram-negative bacteria. **APUA Newsletter** 1994; **12**: 1-5.

MILLER GH, SABATELLI FJ and HARE SH. Survey of aminoglycoside resistance patterns . **Developments in Industrial Microbiology** 1980; **21**:91-104.

MILLER GH, SABATELLI FJ, NAPLES L, HARE RS, SHAW KJ and the AMINOGLYCOSIDE RESISTANCE STUDY GROUPS. The changing nature of aminoglycoside resistance mechanisms and the role of isepamicin-a new broad-spectrum aminoglycoside. **Chemotherapy Journal** 1995 (in press).

MOBARAKAI N, QUALE JM and LANDMAN D. Bactericidal activities of peptide antibiotics against multidrug-resistant *E. faecium*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1994; **38**: 385-387.0

MODE H, HANSLO D, de WET PM, MILLAR AJW and CYWES S. Efficacy of mupirocin in methicillin-resistant *S. aureus* burn wound infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1989; **33**: 1358-1361.

- MOGALSKI W. Chemical modification of the tetracyclines. In the Tetracyclines, Handbook of Experimental Pharmacology 1995; **78**: 179-316. Springer Verlag, New York.
- MONTECALVO M, HAROWITZ H, GEDRIS C, CARBONARO C, TENOVER F C, ISSAH A, COOK P and WORMSER GP. Outbreak of vancomycin, ampicillin and aminoglycoside-resistant *E. faecium* bacteriemia in an adult oncology unity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1994; **38**: 1263-1267.
- MURAKAMI K, MINAMIDE W, WADE K, NAKAMURA E, TEROOKA H and WATANABE S. Identification of methicillin-resistant strains of Staphylococci by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology** 1991; **29**: 2240-2244.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests -fourth edition ; Approved Standard . NCCLS Document M2-A4 Villanova, Pa:NCCLS. 1988.
- NCCLS. Methods for dilution antimicrobial test for bacteria that grow aerobically. Approved standard publication 1982 ; M7-A, Villanova, Pa.
- NEWMAN RL, BHAL KM, HACKNEY R and ROBINSON C. Fusidic acid: laboratory and clinical assessment. **British Medical Journal** 1962; **ii**: 1645-1647.
- NICHOLS WW and HEWINSON RG. Rapid and automated measurement of Km and specific V_{max} values of beta-lactamases in bacterial extracts. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 1987; **19**: 285-295.
- NIETO M and PERKINS HR. Modifications of the acetyl-D-alanyl-D-alanina terminus affecting complex formation with vancomycin. **Biochemistry Journal** 1971; **123**: 789-803.
- NISHIGIME S, NAMURA S, AKAMATSU H, ASADE S, KAWABATA S and FUGITA M. Activity of eight fluroquinolones against methicillin-resistant *S. aureus* isolated from cutaneous infections. **Internal Journal of Antimicrobial Agents** 1994; **4**: 147-149.
- NORRIS SR, STRATTON CW and KERNODLE D. Production of A and C variants of Staphylococcal beta-lactamase by methicillin-resistant strains of

- Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1994;**38**:1649-1650.
- NOVICK JT. Analysis by transductions of mutations affecting penicillinase formation in *Staphylococcus aureus*. **Journal of General Microbiology**, 1963; **33**:637-543.
- NOVICK RP and MURPHY E. MLS-resistance determinants in *S. aureus* and their molecular evolution. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 1985; **16(Suppl A)** 101-110.
- O' CALLEGHAN CH, MORRIS A, KIRBY SM and SHINGLAR AH. Novel method for detection of beta-lactamases by using o chromogenic cephalosporin substrate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1972; **1**: 283-288.
- OUNISSI H, DERLOT E, CARLIER C. Gene homogeneity for Aminoglycoside-modifying enzymes in Gram positive cocci. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1990 ; **34**: 2164-2168.
- PARISI JT and HECHT BW. Plasmid profile in epidemiologic studies of infections by *Staphylococcus epidermidis*. **Journal of Infectious Diseases** 1980; **141**:637-643.
- PARISI JT, LAMPSON BC, HOOVER DL and KHAN JA. Comparison of epidemiology markers for *Staphylococcus epidermidis*. **Journal of Clinical Microbiology** 1986; **24**:56-60.
- PATTISON JR and MANSELL PE. Fusidic acid resistant *Staphylococci* in current hospital practice. **Journal of Medical Microbiology** 1973; **6**: 235-244.
- PEACOCK JE, MARSIK FJ and WENZEL RP. Methicillin-resistant *S. aureus*: introduction and spread within a hospital. **Annals of Internal Medicine** 1980; **93**:526-532.
- PEETERMANS WE, HOOGETERP JJ , DOKKUM AMH, Van BROEK P and MATTIE H. Antistaphylococcal activities of teicoplanin and vancomycin in vitro and in an experimental infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1990; **34**: 1869-1874.
- PETERSON LR, QUICK JN, JENSEN B, HOMANN S, JOHNSON S, TENQUIST J, SHANHOLTZER C, PETZEL RA, SINN L, GERDING DN. Emergence of ciprofloxacin-resistance in nosocomial methicillin-resistance *S. aureus* isolates. **Archives Internal Medicines** 1990; **150**: 2151-2155.

PIDDOCK LJV. New quinolones and gram-positive bacteria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1994; **38**: 163-169.

PIERCY EA, BARBARO D, LUBY JP and MACKOWIAK. Ciprofloxacin for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1989; **33**:128-130.

RAVIGLIONE MC, BOYLE JF, MARIUZ P, PABLOS-MENDEZ A, CORTES H and MERLO A. Ciprofloxacin-resistant methicillin-resistant *S aureus* in an acute-care hospital. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1990; **34**:2050-2054.

REYNOLDS PE and FULLER C. Methicillin-resistant strains of *S. aureus* : presence of identical additional penicillin-binding protein in all strains examined. **FEMS Microbiology Letter** 1986; **33**: 251-254.

RICHMOND M H. Wild-type variants of exopenicillinase from *S. aureus*. **Biochemistry Journal** 1965; **94**:584-593.

RODRIGUES AF, CANTON R and PEREZ-DIAS JC. Aminoglycoside-modifying enzymes in clinical isolates harboring extended-spectrum beta-lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemoterapy** 1992; **36**: 2536-2538.

ROHNER P, HERTER C, AUCKENTHALA R, PECHERE JC, WALDVOGEL F A and LEW DP. Synergistic effect of quinolones and oxacillin on methicillin-resistant *Staphylococcus* species. **Antimicrobial Agents and Chemoterapy** 1989; **33**: 2037-2041.

ROSDAHL VT. Naturally occurring constitutive beta-lactamase of novel serotype in *S. aureus* by substrate hydrolysis profiles. **Journal of General Microbiology** 1993; **77**: 229-231.

ROSDAHL VT. Penicillinase production in *S. aureus* strains of clinical importance. **Danish Medical Bulletin** 1986; **33**:175-184.

RUPP ME and ARCHER GL Coagulase-negative Staphylococci: pathogens associated with medical progress. **Clinical of Infectious Diseases** 1994; **19**: 231-245.

RYFFEL C, TESCH W, BIRCH-MACHIN I, REYNOLDS PE, BARBERIS-MAINO L, KAYSER FH and BERGER-BACHI B. Sequence comparison of *mecA* genes from methicillin-resistant *S. aureus* and *S. epidermidis*. **Gene** 1990; **94**: 137-138.

SABATH LD, LAVADIERE M, WHEELER N, BLAZEVIÉ D and WIEKINSON B J. A new type of penicillin-resistant in *S. aureus* **Lancet** 1970; **1** : 443-447.

SABATH LD. Chemical and physical factors influencing methicillin resistance of *S. aureus* and *S. epidermidis*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 1977; **3(Suppl C)**: 47-51.

SABATH LD, GARNER C and WILCOX C. Effect of inoculum and of beta-lactamase on the anti-Staphylococcal activity of thirteen penicillins and cephalosporins. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1973; **8**: 344-349.

SABATH LD. Chemical and physical factors influencing methicillin resistance of *S. aureus* and *S. epidermidis*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 1977; **3 (Duppl C)** :47-51.

SABATH LD. Reappraisal of the anti staphylococcal activities of first generation (narrow spectrum) and second generation (expended spectrum) cephalosporins. **Antimicrobiol Agents and Chemoterapy** 1984;**33**:407-411.

SANCHES IS, RAMIREZ M, TRONI H, ABECASAIS M, PADUA M, TOMASZ A and de LENCASTRE H. Evidence for the geographic spread of a methicillin-resistant *S. aureus* clone between Portugal and Spain. **Journal of Clinical Microbiology** 1995; **33**: 1243-1246.

SALYERS AA, SPEER BS and SHOEMAKER ND. New prespectives in tetracycline resistance. **Molecular Microbiology** 1990;**4**: 151-156.

SANDE MAC, MADELL GL. Effect of rifampicin in nasal carriage of *S. aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1975; **7**: 294-297.

SANDS LC and SHAW WV. Mechanisms of chloranfenicol resistance in Staphylococci: characterization and hybridization of variants of chloranfenicol acetyltransferases. **Antimicrobial Agents an Chemotherapy** 1973; **3**: 299-305.

SARAVOLATZ LD, MARKOVITZ N, ARKING L, POHLOD D and FISHER E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Epidemiologic observations during a community-acquired outbreak. **Annals of Internal Medicine** 1982; **96**:11-16

SATOSHI H, YOSHIMIRO O, YUKIO U, and KEIICHI H. Sequential acquisition of norfloxacin and ofloxacin resistance in methicillin-resistant and susceptible *S. aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1993; **37**:2278-2284.

SCHABERG DR, CULVER DH and GAINER RP. Major trends in the microbial etiology of nosocomial infection. **American Journal of Medicine** 1991; **91**: 725-735(Suppl .B).

SCHADEVE MH, STELLA FB. and CHAMBERS HF. Comparative activity of CGP 31608, nafcilina, cefamandole, imipenem and vancomycin against methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococci*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1987; **31**:1549-1552.

SCHELD WM, SANDE MA. Endocarditis and intravascular infections. In Mandel, G L, Douglas M G, Bennet, J. E.(eds). *Principals and pratice of Infectiouse disease*, E.Livingstone 1990; pg. 670-706.

SCHLESSINGER D. Failure of aminoglycoside antibiotics to kill anaerobi, low pH and resistant cultures. **Clinical Microbiological Review** 1988; **1**: 54-59.

SCHWALBE RS, STAPLETON and GILLIGAN. Emergence of vancomycin resistance in coagulase-negative *Staphylococci*. **New England Journal of Medicine** 1987; **316**: 927-931.

SELIGMAN SJ. *In vitro* susceptibility of methicillin-resistant *S. aureus* to sulfametoxazole and trimethoprim . **Journal of Infectious Diseases** 1973;**1288**:543-544.

SHALIT I, BERCER S A, GOREA A and FRIMERMAN H. Widespread quinolone resistance among methicillin-resistant *S. aureus* isolates in a general hospital . **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1989; **33**:593-594.

SHANSON DC, KENSIT JG and DUKE R. Outbreak of hospital infection with a strain of *Staphylococcus aureus* resistant to gentamicin and methicillin. **Lancet ii** 1976;1347-1348.

SHANSON DC. Antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Hospital Infection** 1981; **2**:11-36.

SHANSON DC. Clinical relevance of resistance of fusidic acid in *S. aureus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 1990; **25**: 15-21.

SHAW KJ, HARE RS, SABATELLI FJ, RIZZO M, CRAMER CA, NAPLES L, KOCSI S, HUNAYYER H, MANN P, MILLER GH, VAN LANDUYT H, GLUPCZYNSKI Y, CATALANO M and WOLOJ M. Correlation between , aminoglycoside resistance profiles and DNA hybridização of clinical isolates . **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1991; **35**: 2253-2261.

SHAW KJ, RATHER PN, HARE RS, and MILLER GH. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. **Microbiological Reviews** 1993; **57**: 138-163.

SHEAGREN JN. *S. aureus*. The persistent pathogenic. **New England Journal of Medicine** 1984 ; **310**:1368-1373.

SHIBL AM, TAWFIK AF, KHAN AM, QUADRI SMH, IMANBACCUS Y and RAMADAN MA. Prevalence of methicillin-resistant Staphylococci in Riyadh, Saudi Arabia and their susceptibility to antimicrobial agents. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 1994; **33**: 1255-1257.

SHLAES DM, SHLAES JH, VINCENT S, ETTER L, FEY PD and GOERING RV. Teicoplanin-resistant *Staphylococcus aureus* expresses a novel membrane protein and increases expression of penicillin-binding protein 2 complex. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1993; **37**:2432-2437.

SIERRA-MADERO JG, KNAPP C, KARAFFA C and WASHINGTON JA. Role of beta-lactamases and different testing conditions in oxacillin-borderline-susceptible-Staphylococci. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1988; **32**:1754-1757.

SILVA MT e SOUSA JCF. Alterações ultraestruturais induzidas pela gentamicina em *Bacillus cereus* e *Escherichia coli* . *Medicina de Hoje* 1973 ; **5**: 25-32.

SKURRAY RA , ROUCH DA, LYION BR, GILLESPIE MT, TENNENT JM, BRYNE ME , MESSEROTTI LJ and MAY JW. Multiresistant *Staphylococcus aureus*: genetics and evolution of epidemic Australian strains. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 1988; **21**: 19-38.

- SLOCOMB B, PERRY C. The antimicrobial activity of mupirocin-an update on resistance. **Journal of Hospital Infection** 1991; (**Suppl-B**) 19-23.
- SMALL P, CHAMBERS HK. Vancomycin for *S. aureus* endocarditis in intravenous drug users. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1990;**34**: 1227-1231.
- SMITH PD. Bacteric phage typing of *S. aureus* . In : Staphylococci, Cohen JO, ed John Wiley e Sons 1972; 431-434.
- SMITH RP, BALTCH AL, HAMMER MC, COUROY JV. In vitro activities of PD117, 596 and reference antibiotics against clinical bacterial strains. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1988; **32**:1450-1455.
- SMITH and ENG RHK. Activity of ciprofloxacin against methicillin-resistant *S. aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1985; **27**: 688-691.
- SMITH MD, SANGHRAJKA M, LOCK S. Mupirocin-resistant *Staphylococcus* (letter). **Lancet** 1987; **2**: 1472-1473.
- SMITH SM and ENG RHK Activity of ciprofloxacin against methicillin-resistant *S. aureus* . **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1985; **27**:688-691.
- SMITH SM, ENG RHK and TECSON-TUMANG F. Ciprofloxacin therapy for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections or colonizations. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1989; **33**:181-184.
- SOMMA S, GASTOLD L and CORTI A. Teicoplanin, a new antibiotic from *Actinophanes teichomyceticus* nov. sp. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1984; **26**: 917-923.
- SONG MD, MAESAKI S, WACHI M, TAKAHASHI T, DOI M, ISHINO T, MAEDA Y, OKONOGI K, IMADA A and MATSUHASHI M, 1988. Primary structure and origin of the gene encoding the beta-lactam inducible penicillin-binding protein responsible for methicillin- resistance in *S. aureus*. Pag. 352-359. In P. Actor Daneo-Moore, M. L. Higgins, M.R.J. Salton and G.D. Schockman (ed.); Antibiotic inhibition of bacterial cell surface assembly and function. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- SORREL TC, PACKMAN DR, SHANKER S, FOLDES M and MUNRO R. Vancomycin therapy for methicillin-resistant *S. aureus*. **Annals of Internal Medicine** 1982;**97**:334-350.

SOUSA JCF e LVN PRISTA, 1991- Antibióticos inibidores da síntese proteica. Vol II Tetraciclina, cloranfenicol, macrólidos, lincosamidas e ácido fusídico, editado pela Ordem dos Farmacêuticos, págs 221-231.

SOUSA JCF e LVN PRISTA, 1988. Antibióticos Inibidores da Biossíntese do Peptidoglicano editado pela Ordem dos Farmacêuticos: págs 145-151.

SOUSA JCF e LVN PRISTA, 1990. Antibióticos Inibidores da Síntese Proteica Vol.I - Aminoglicosídeos-Aminociclitois e compostos relacionados, editado pela Ordem dos Farmacêuticos : págs. 77-84 .

SPEER BS, SHAEMAKER NB and SALYERS AA. Bacterial resistance to tetracycline: mechanisms, transfer, and clinical significance. **Clinical Microbiology Review** 1992; **5**: 387-399.

STROMINGER JL. Penicilin-sensitive enzymatic reactions in bacterial cell synthesis. Harvey **Lecture** 1970;**64**:179-213.

SUAREZ JE and MENDONZA NC. Plasmid-encoded fosfomicin resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1991; **35**: 791-795.

SUTHERLAND R, BOON RJ, GRIFFIN KE, MASTERS PJ and WHITE AR. Antibacterial Activity of mupirocin (Pseudomonic Acid), a new antibiotic for topical use. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1985; **27**: 495-498.

SUZUKI E, HIRAMATSU K and YOKOTA T. Survey of methicillin-resistant clinical strains of coagulase negative Staphylococci for mecA gene distribution. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1992; **36**: 429-434.

SWENSON JM, CLARK NC, FERRARO MJ, SAHM DF, DOERN G, PFALLER MA, RELLER LB, WEINSTEIN MP, ZABRANSKY MJ and TENOVER FC. Development of a standardized screening method for detection of vancomycin-resistant enterococci. **Journal Clinical Microbiology** 1994; **32**: 1700-1704.

TALLY FT, ELLESTAD GA and TESTA RT. Glycylcyclines: a new generation of tetracyclines. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 1995; **35**: 449-452.

THAKKER-VARIA S, JENSSEN WD, MOON- McDERMOTT L, WEINSTEIN MP and DUBIN DT. Molecular epidemiology of Macrolides-Lincosamides-Streptogramin B resistance in Staphylococcus aureus and coagulase-

-negative Staphylococci. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1987; **31**:735-743.

THOMPSON RL, FISHER KA and WENZEL RP. *In vitro* activity of N-formimidoyl thienamycin and other beta-lactam antibiotics against methicillin-resistant *S. aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1982 ; **21**: 341-343.

THOMPSON RL, FISCHER KA and WENZEL RP. International recognition of methicillin-resistant strains of *S. aureus* . **Annals Internal Medicine** 1982 ; **97**:925-926.

TIPPER TJ and STROMINGER JL. Mecanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanina. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA** 1965;**54**:1133-1141.

TOKNE Y, SHOJI S, SATOH K, WATANABE A and MOTOMIYA M. Comparison of a polymerase method for detection of methicillin-resistant *S. aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1992; **36**: 6-9.

TOMASZ A and WAKS S. Mechanism of action of Penicillin: triggering of pneumococcal autolytic enzyme by inhibition of cell wall synthesis. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA** 1975;**72**:4162-4166.

TOMASZ A, DRUGEON HB, LENCASTRE HM, JABES D, McDOUGAL L and BILLE J. New mechanisms for methicillin resistance in *S. aureus*: clinical isolates that lack the PBP2a gene and contain normal penicillin-binding proteins with modified penicillin-binding capacity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1989; **33**: 1869-1874.

TONIN E and TOMASZ A. Beta-lactam-specific resistant mutants of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1986; **30**:577-583.

TOPLEY e WILSON'S Principles of Bacteriology, Virology and Immunity. 7ª Edição. Edward Arnold, London. 1983.

TORRES C, REGNERA JA, SANMARTIN MJ, PEREZ-DIAZ JC and BAQUERO F. Van A- mediated vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. in sewage. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 1994; **33**: 553-561.

- TOWNSEND DE, ASHDOWN N, BOLTON S, BRADLEY J, DUCKWORTH G, MOORHOUSE EC and GRUBB WB. The international spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Hospital Infections** 1987; **9**:60-71.
- TREES DL and IANDOLO JL. Identification of a *Staphylococcus aureus* transposon (Tn 4291) that carries the methicillin resistance gene(s) **Journal of Bacteriology** 1988; **170**:149-154.
- UBUKATA K, YAMASHITA N, KONO M. Occurrence of a beta-lactam inducible penicillin-binding-protein in methicillin-resistant Staphylococci. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1985; **27**:851-857
- UBUKATA K, ITCH-YAMASHITA N, KONNO M. Cloning and expression of the nor A gene for fluroquinolone resistance in *S. aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1989; **33**: 1535-1539.
- UBUKATA K, YAMASHITA N, GOTOH A and KONNO M. Purification and characterization of aminoglycoside-modifying enzymes from *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1984; **25**:754-759.
- VAN de KLUMBERT JAM, Vliegenthart JS and VAN DOORN E. A simple method for the identification of aminoglycoside-modifying enzymes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 1984; **14**: 339-348.
- VAN der AUWERA P, GOBARD C, DENIS C, de MAEYER S and VANHOF. *In vitro* activities of new antimicrobial agents against multiresistant *S. aureus* isolated from septicemic patients during a Belgian National Survey from 1983 to 1985. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1990; **34**: 2260-2262.
- VARALDO PE, DEBBIA E and SCHITO GC. *In vitro* activities of rifapentine and rifampin, alone and in combination with six other antibiotics, against methicillin-susceptible and methicillin-resistant Staphylococci of different species. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1985; **27**:615-618.
- VARALDO PE. The "borderline methicillin-susceptible" *Staphylococcus aureus*. Leading Articles. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 1993, **31**:1-8.
- VAZ MJ, SOUSA JC and TORRES-PEREIRA A. Caracterização das beta-lactâmases elaboradas por estirpes patogénicas de *Staphylococcus aureus*. **Arquivos de Medicina** 1993; Vol 7, nº5: 575-576

VAZ MJ, SOUSA JC, PEIXE LM and NETO HM. Comportamento de estirpes patogénicas de *Staphylococcus aureus* face aos antibióticos MLS (Macrolídeos/ Lincosamidas/ Streptomicinas). **Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas** 1993a; **Ano 16 n°1**:53-56.

VAZ MJ, SOUSA JC, FERREIRA HM, PEIXE LM. Actividade , *in vitro*, de antibióticos beta-lactâmicos e não beta-lactâmicos contra estirpes patogénicas de *S. aureus*. **Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas** 1993b; **Ano 16, n° 1**: 57-61.

VAZ MJ, SOUSA JC, TORRES PEREIRA A. Estudo de portadores de *Staphylococcus*. **Arquivos de Medicina** 1995; **Vol 9, n°2**: 85-86.

VENDITTI M, BAIOCCHI P, BRANDIMARTE C, CAPONE A, FIMIANE C, SANTINI C, TARASI A. High rate of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in an Italian University hospital. **Journal of Chemotherapy** 1994; **6**: 25-28.

WARD TT, WINN RE, HARSTEIM and SEWELL DL. Observation relativity to an inter-hospital outbreak of methicillin-resistant *S. aureus*: role of antimicrobial therapy in infection control. **Infection Control** 1981;**2**: 453-459.

WATANAKUNAKORN C, TISONE JC. Synergism between vancomycin and gentamicin or tobramycin for methicillin-susceptible and methicillin-resistant *S. aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1982; **22**: 903-905.

WEBER DA and GOERING RV. Tn4201, a beta-lactamase transposon in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1988; **32**:1164-1169.

WEISBLUM B and DEMOHN V. Eritromycin-inducible resistance in *S. aureus* : Survey of antibiotic classes involved . **Journal of Bacteriology** 1969; **98**: 447-452.

WEISBLUM B, SIDDHIKOL C and DEMOHN V. Eritromycin -inducible resistance in *S. aureus* : Requeriments for induction. **Journal Bacteriology** 1971; **106**:835-847.

WEISBLUM B, and DAVIES J. Antibiotics inhibitors of the bacterial ribosomas. **Bacteriologic Review** 1968; **32**: 493- 528.

WENZEL RP. The emergence of methicillin-resistant *S. aureus*. **Annals of Internal Medicine** 1982 ; **97**: 440-442.

- WHEAT LJ, KOLER RB, WHITE AL and WHITE A. Effect of rifampicina on nasal carriers of coagulase-positive Staphylococci. **Journal of Infectious Disease** 1981;144-177.
- WISE R, ANDREW JR and PATEL N. N-formimidoyl-thienamycin, a novel beta-lactam: an in vitro comparasion with other beta-lactam antibiotics. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 1981; 7:521-529.
- WITTE JL, SAPICO FL and CANAWATTI HN . *In vitro* susceptibility of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *S. aureus* strains to N-formimidoyl thienamycin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1982 ; 22:906-908.
- WOODS LG, KNAPP CC and WASHINGTON II JA. Relationship between cefamandole and cefuroxime activity against oxacillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* and oxacillin resistance phenotype. **Antimicrobial Agents of Chemotherapy** 1987; 31: 1332-1337.
- WYKE AW. Isolation of five penicillin-binding proteins from *S. aureus*. **FEMS Microbiology Letter** 1985; 22: 133-138.
- ZYGMUNT DJ, STRATTON CW, and KERNODLE DS. Characterization of four beta-lactamases produced by *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1992; 36:440-445.

ERRATA

	Onde se lê	Deve ler-se
Pág. 55	Eritrmicina	Eritromicina
Pág. 85	espiromicina	espiramicina (SP)
Pág. 87	clidamicina	clindamicina
	virginamicina	virginiamicina
Pág. 89	clidamicina	clindamicina
	licomicina	lincomicina
Pág. 91	clidamicina	clindamicina
	licomicina	lincomicina
Pág. 93	clidamicina (CC2)	clindamicina (CC ₂)
	licomicina (L2)	lincomicina (L ₂)
	virginiamicina (SA 15)	virginiamicina (SA ₁₅)
	eritromicina (E 15)	eritromicina (E ₁₅)