

# **Detecção precoce no meio ChromID MRSA de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina isolados em Hemoculturas**

Vanessa Rodrigues da Silva<sup>1</sup>, Ana Filipa Pereira<sup>1</sup>, Cátia Piedade<sup>2</sup>, Ana Mayté França<sup>2</sup>, Mónica Serrano<sup>1</sup>, Paulo Paixão<sup>2</sup>  
Escola Superior de Saúde da Atlântica, Universidade Atlântica<sup>1</sup>  
Laboratório General Lab, Hospital da Luz<sup>2</sup>

## **Resumo**

Este estudo tem como objectivo a obtenção de resultados laboratoriais mais rápidos em casos de pacientes em que se suspeite a presença de microrganismos na corrente sanguínea, e que possivelmente estejam infectados com as estirpes de MRSA. Como tal, realizou-se a pesquisa de MRSA através de métodos convencionais utilizados no laboratório de microbiologia e avaliou-se em paralelo o meio chromID MRSA em todas as hemoculturas que se apresentaram positivas no equipamento BACT/Alert. Este estudo realizou-se entre Dezembro de 2010 e Junho de 2011 no General Lab do Hospital da Luz.

O meio de cultura chromID MRSA revelou-se com uma elevada sensibilidade (100%) e especificidade (100%) em todas as amostras de MRSA, havendo um crescimento de colónias verdes no período de 24h como fundamenta o meio. Este meio permite assim uma forma de facilitar ao clínico resultados mais atempados.

## **Abstract**

The target of this study was the achievement of lab results in a faster way in cases of suspected patients that probably have the presence of the microorganisms in her bloodstream, and have also the possibility of being infected with the strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). So, we carried out a research of MRSA by the traditional methods used in the microbiology labs, and in parallel way we evaluated the chromogenic medium, chromID MRSA in all positives blood cultures presented in the BACT/Alert equipment. This study took place in the General Lab of Hospital da Luz between December 2010 and June 2011.

The chromID MRSA medium, revealed high sensitivity (100%), and specificity (100%) in all samples of MRSA, revealing a growth of green colonies in a 24 hour period as the underlying medium. This medium allows in this case a more quick way to facilitate the achievement of results by the clinic.

## Introdução

O género *Staphylococcus* pertence à família *Micrococcaceae*. São bactérias morfológicamente designadas como cocos em cacho Gram positivos, imóveis, capsulados e não esporulados, vivem em anaerobiose facultativa e produzem catalase. Das várias enzimas produzidas pelos *Staphylococcus*, existe uma de extrema importância, designada por coagulase, pois permite a distinção de *Staphylococcus aureus* (coagulase positiva) de todas as restantes espécies do género *Staphylococcus* (coagulase negativa) (6).

Muitos dos microrganismos que causam doenças no homem, como é o caso de *S.aureus* vivem em íntima interacção de mutualismo com este, apenas em condições particulares é que estas se tornam patogénicas para o ser humano (2). Quando tal acontece, a versatilidade e a gravidade das infecções deve-se às toxinas e enzimas produzidas pelo microrganismo como também aos vários factores de virulência (2).

Os *Staphylococcus* são microrganismos, que muito frequentemente adquirem resistências aos antimicrobianos e as transmitem entre si, este facto condiciona a terapêutica. Retrocedendo na história, constata-se que o desenvolvimento da resistência antimicrobiana em *S. aureus* tem sido bastante rápida. A resistência à penicilina em *S.aureus* foi observada um ano após a sua introdução. No início dos anos cinquenta, 3/4 dos *S.aureus* isolados nos hospitais centrais eram resistentes à penicilina. As primeiras estirpes resistentes à penicilina apresentavam hiperprodução de  $\beta$ -lactamases capazes de degradar o antibiótico. Em 1959, foi introduzido o primeiro antiestafilocócico com metilina. Após dois anos surgiu a primeira estirpe de *Staphylococcus aureus* metilina resistentes (MRSA) (9).

O *S. aureus* é considerado um importante patógeno humano capaz de causar uma grande variedade de infecções tanto na comunidade como nos hospitais, que podem ir desde lesões nos tecidos moles, infecções na pele, bacteriemia e sépsis (2). As infecções da corrente sanguínea causada por MRSA foram demonstradas também em doentes com outros problemas de saúde tais como insuficiência renal aguda, hospitalização prolongada, dependência de ventiladores, entre outros (9). Verificou-se durante os últimos 20 anos o aumento da incidência da infecção na corrente sanguínea por *S.aureus* na comunidade sendo mais de metade dos casos relatados como sendo *S. aureus* resistentes à metilina (MRSA) (8).

Devido aos altos níveis de morbidade, mortalidade e substancial aumento dos custos dos cuidados de saúde devido à permanência hospitalar prolongada, ao custo do isolamento e despesas dos cuidados intensivos tornou-se imprescindível uma identificação precoce de *S. aureus* bem como a determinação da susceptibilidade à metilina para a optimização dos resultados e a gestão do cuidado do paciente (7,8).

Como tal, actualmente, os laboratórios de microbiologia clínica têm procurado métodos que combinem uma alta sensibilidade com uma elevada especificidade e um curto período de tempo, até à comunicação dos resultados, como é o caso da técnica de biologia molecular de Reacção de Polimerização em Cadeia (PCR) em tempo real e hibridização *in situ*, através de sondas de oligonucleotídeos marcados com fluorescência. No entanto, estes métodos requerem

equipamentos e reagentes de alto custo, como também, de infraestruturas de apoio para uma adequada utilização. Para laboratórios de microbiologia com poucos recursos financeiros, torna-se impossível estas técnicas serem uma solução. Sendo assim deve-se investir noutras técnicas rápidas e sensíveis para a detecção deste microrganismo mas menos dispendiosas (4,5).

Este estudo tem como finalidade, avaliar o meio chromID MRSA (BioMérieux, França) em comparação com os métodos convencionais utilizados no laboratório de microbiologia para uma detecção mais rápida de MRSA em hemoculturas. O meio chromID MRSA é avaliado segundo o cálculo da sensibilidade e especificidade e também quanto à sua capacidade preditiva ou seja, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo.

## **Materiais e Métodos**

Este estudo teve início a partir de hemoculturas que se apresentaram positivas (obtenção de crescimento de um microrganismo) no equipamento Bact/Alert (BioMérieux, França) entre Dezembro de 2010 e Junho de 2011. As hemoculturas são incubadas no equipamento BACT/Alert até 5 dias, caso não positivem anteriormente. Quando positivas, são retiradas do equipamento e são realizados esfregaços a partir das mesmas. Estes esfregaços vão ser seguidamente corados pela técnica de coloração de Gram que permite distinguir as bactérias Gram positivas das bactérias Gram negativas. Esta coloração inicia-se com o corante violeta de cristal, e de seguida o lugol, que tem como função aumentar a afinidade entre o primeiro corante e a célula, designado por mordente. O passo seguinte consiste em colocar álcool-acetona que descolora as células. Esta situação só se verifica nas bactérias Gram negativas, pois estas possuem uma fina camada de peptidoglicano, tornando-se incapazes de reter o corante primário. Por outro lado as bactérias Gram positivas, contrariamente às anteriores possuem uma camada espessa de peptidoglicano, formando uma barreira capaz de reter o corante violeta de cristal, que lhes confere a cor deste (púrpura/roxo). Por fim, o último corante utilizado na coloração de Gram é a safranina, que cora apenas as Gram negativas com a sua respectiva cor (vermelha).

Finalizada a coloração, observam-se as lâminas ao microscópio óptico, e em todas as amostras em que se verificou a presença de cocos em cacho Gram positivos (características dos *Staphylococcus*), prosseguiu-se com o estudo, inoculando as hemoculturas referentes nos meios Gelose de Sangue (BioMérieux, França) e ChromID MRSA (BioMérieux, França).

A gelose de sangue é constituída por uma mistura de peptonas e de sangue de carneiro, tornando o meio muito nutritivo para o crescimento bacteriano até mesmo de bactérias exigentes como a *Listeria* e os *Streptococcus*. Um dos critérios base para a orientação da identificação das bactérias é a hemólise que apenas é possível devido ao sangue de carneiro.

O meio ChromID MRSA reúne condições nutritivas que associa diferentes peptonas e tem como princípio base conter um substrato cromogénico de  $\alpha$ -glucosidase e um antibiótico (cefotaxima) que permite o crescimento de *Staphylococcus* resistentes à metilina incluindo

estirpes hetero-resistentes. A detecção directa das estirpes MRSA realiza-se através da revelação da actividade da  $\alpha$ -glucosidase, quando as colónias ficam coradas de verde. Os dois meios são inoculados e incubados na estufa a 37°C durante 24h, após este período, observa-se o eventual crescimento bacteriano. Na gelose de sangue caso se verifique o crescimento, realizar-se-á seguidamente o teste da coagulase (*Slidex Staph Plus*), que consiste num teste rápido de aglutinação (BioMérieux, França). O reagente "Slidex Staph Plus" do teste, engloba partículas de látex azul sensibilizadas com fibrinogénio humano e anticorpos monoclonais, que permite a detecção do factor de afinidade para o fibrinogénio; da proteína A pelo fragmento Fc das IgG de rato; de um antigénio de grupo ligado às estruturas periféricas específicas de *S. aureus*. Este teste quando positivo, ou seja, quando se verifica aglutinação, indica que estamos na presença de *S.aureus*.

Assim, neste método convencional, se o teste da coagulase for positivo, segue-se a realização do teste da sensibilidade aos antibióticos (TSA) no equipamento Vitek (BioMérieux, França), onde podemos saber se estamos ou não em presença de estirpes MRSA.

No entanto, se houver crescimento no meio ChromID MRSA de colónias verdes, podemos concluir imediatamente que a infecção do doente é causada por MRSA, poupando o tempo despendido no teste da coagulase e do TSA. Facilitando assim ao médico os resultados microbiológicos de uma forma mais rápida. Todavia se não obtivermos crescimento de colónias verdes após 24h, deve-se voltar a incubar até perfazer 48h.

Neste estudo foram realizadas em paralelo os dois métodos de detecção (Vitek e ChromID) para comparação. Podendo assim adquirir a certeza de que todas as colónias verdes que cresceram no meio chromID eram MRSA e comprovando igualmente a eficácia do meio de cultura.

## Resultados

Para testar o meio chromID MRSA, avaliaram-se dois constituintes (enzima  $\alpha$ -glucosidase e o antibiótico cefoxitina) tanto em conjunto como separadamente. Estes permitiram o crescimento e detecção das estirpes de MRSA, conforme demonstrado nas tabelas de resultados. Os resultados laboratoriais do meio foram avaliados segundo o cálculo dos parâmetros de Sensibilidade, Especificidade, Valor Preditivo Positivo (VPP) e Valor Preditivo Negativo (VPN), que são denominados comumente de "indicadores de desempenho".

A sensibilidade de um teste diagnóstico é a proporção de indivíduos que possui o microrganismo em estudo e que são identificados pelo teste. Este parâmetro indica o quão bom é o teste (meio chromID MRSA), em identificar o microrganismo pesquisado. A sensibilidade é calculada segundo a fórmula:  $S = VP/(VP + FN)$ .

A especificidade de um teste de diagnóstico é a proporção de indivíduos sem o microrganismo em estudo e que são identificados pelo teste, indicando o quão bom é o teste em identificar amostras sem o microrganismo em questão. A especificidade é calculada pela fórmula:  $E = VN/(FP + VN)$ .

O Valor Preditivo Positivo prevê qual a probabilidade de estarmos na presença do microrganismo em estudo caso o resultado do teste seja positivo. O VPP calcula-se pela fórmula:  $VPP = VP / (VP + FP)$ . Por outro lado, o Valor Preditivo Negativo prevê qual a possibilidade de não estarmos na presença do microrganismo em estudo caso o resultado do teste seja negativo. O VPN calcula-se segundo a fórmula:  $VPN = VN / (VN + FN)$ .

**Tabela 1-**Avaliação do Antibiótico cefoxitina presente no meio chromID MRSA.

	<b>Com crescimento</b>	<b>Sem crescimento</b>	<b>Total</b>
<b>MRSA</b>	7	0	7
<b>MSSA</b>	2	4	6
<b>Total</b>	9	4	13

Sensibilidade (S)= 100%

Especificidade (E)= 67%

Valor Preditivo Positivo (VPP)= 78%

Valor Preditivo Negativo (VPN)= 100%

De acordo com a tabela 1, o meio obteve uma sensibilidade de 100%, visto que as 7 amostras com a presença de estirpes MRSA cresceram no meio de cultura chromID MRSA. Ao longo do estudo, também se obtiveram 2 amostras de *Staphylococcus aureus* meticilina sensíveis (MSSA), que cresceram no meio e não deveriam ter obtido crescimento de acordo com o princípio base do meio, ou seja, o antibiótico não permite o crescimento de estirpes sensíveis à meticilina, originando assim uma especificidade de 67%. O VPP obteve uma percentagem de 78%, sendo inferior ao VPN que foi de 100%.

**Tabela 2-**Avaliação do enzima  $\alpha$ -glucosidase presente no meio chromID MRSA.

	<b>Colônias verdes</b>	<b>Colônias Brancas</b>	<b>Total</b>
<b>S.aureus</b>	7	2	9
<b>Outros Staphylococcus</b>	0	8	8
<b>Total</b>	7	10	17

Sensibilidade (S)= 78%

Especificidade (E)= 100%

Valor Preditivo Positivo (VPP)= 100%

Valor Preditivo Negativo (VPN)= 80%

Avaliando a actividade do enzima  $\alpha$ -glucosidase (Tabela 2), o meio chromID MRSA revelou-se muito especifico com uma percentagem de 100%, visto as 8 amostras com a presença de outros *Staphylococcus* apresentaram colónias de cor branca e não verde. Quanto à sensibilidade, obteve uma percentagem de 78% pois dos 9 *S.aureus* que cresceram no meio, 7 amostras coraram de verde e 2 amostras coraram de branco, sendo que estas duas últimas não deveriam ter corado de branco. Quanto à enzima, o VPP foi de 100%, sendo superior ao VPN que foi de 80%.

**Tabela 3-** Avaliação do meio chromID MRSA

	<b>Colónias verdes</b>	<b>Sem crescimento ou Colónias Brancas</b>	<b>Total</b>
<b>MRSA</b>	7	0	7
<b>Não MRSA</b>	0	21	21
<b>Total</b>	7	21	28

Sensibilidade (S)= 100%

Especificidade (E)= 100%

Valor Preditivo Positivo (VPP)= 100%

Valor Preditivo Negativo (VPN)= 100%

No que diz respeito à tabela final (Tabela 3) que avalia o meio ChromID MRSA em geral, verificou-se que no total das 28 amostras estudadas, 7 foram identificadas como MRSA e como tal obtiveram um crescimento de colónias verdes demonstrando assim a sensibilidade de 100% do meio. As restantes 21 amostras foram identificadas como estirpes não MRSA e nenhuma obteve crescimento de colónias verdes, originando uma especificidade de 100%. Ou seja, para estarmos na presença de estirpes de MRSA, segundo o principio do meio tem de haver crescimento de colonias verdes, conforme se verificou no estudo, tendo o meio se revelado bastante especifico e sensível. Quanto aos valores preditivos, tanto o negativo como o positivo obtiveram uma percentagem de 100%, isto é, todos os resultados positivos tinham presente o microrganismo em estudo (MRSA), bem como todos os testes negativos não tinham presente o microrganismo.

## **Discussão**

Visto o âmbito do estudo ser a validação do meio chromID MRSA, este revelou-se específico e sensível, pois todas as amostras com presença de *Staphylococcus aureus* metilina resistentes, obtiveram um crescimento de colónias verdes como indica o princípio base do meio. Em paralelo realizou-se sempre o controlo positivo do meio através da identificação dos microrganismos realizado também no Vitek. Este método permite-nos identificar todas as colónias que cresçam no meio de cultura, podendo comprovar se as colónias verdes eram realmente os MRSA esperados.

Apesar de o meio se ter revelado bom na pesquisa de MRSA e facilitar um diagnóstico mais rápido, reduzindo assim o timing em 24h em relação aos métodos convencionais, este não poderia ser adoptado de imediato no laboratório baseando-se unicamente neste estudo, devido ao curto período de tempo total do estudo e como consequência o reduzido número de amostras. Dever-se-ia no entanto continuar o estudo para que este meio de cultura possa futuramente ser adoptado no laboratório.

Contudo, segundo a bibliografia pesquisada, verificou-se que existe actualmente um novo meio denominado de chromID MRSA New que é a versão modificada do meio testado neste estudo. Como tal considera-se que o passo seguinte mais importante seria testar também este meio e até realizar uma comparação entre os dois meios como foi realizado no estudo de Hoecke, F. V., N. Deloof e G. Claeys (3).

Actualmente existem também outros métodos utilizados no laboratório para a identificação directa de MRSA, baseado em técnicas de biologia molecular, como é o caso da Reacção de Polimerização em Cadeia (PCR). Mas estas técnicas ainda são muito dispendiosas e nem todos os laboratórios têm condições laboratoriais e financeiras para as suportar. Como tal, continua-se a apostar nos meios de cultura como é o caso do chromID MRSA para a identificação precoce destas estirpes causadoras de um elevado índice de mortalidade e morbidade.

## **Agradecimentos**

Agradeço a todas as pessoas que tornaram este estudo possível e que colaboraram nele com especial relevo ao Professor Doutor Paulo Paixão, à Cátia Piedade e à Ana Mayté França. Agradeço também à minha colega Filipa Pereira que juntamente comigo realizou este estudo. E por fim agradeço à minha professora Mónica Serrano pela ajuda prestada, desde o contacto com o laboratório até à elaboração final do estudo efectuado.

A todos um bem-haja.

## Referências bibliográficas

1. **Chambers, H. F., F. R. Deleo.** 2009. "Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic Era". *Nature Reviews Microbiology*. **7**:629-41.
2. **de Sousa, J. C. F., Ferreira, W. F. Canas.** 2000. *Microbiologia-volume 2*, LIDEL, Lisboa. p 39-47.
3. **Hoecke, F. V., N. Deloof e G. Claeys.** 2011." Performance evaluation of a modified chromogenic medium, ChromID MRSA New, for the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from clinical specimens". *European Journal of Clinical Microbiology and infectious diseases*. DOI: 10.1007/s10096-011-1265-3
4. **Pape, J., J. Wadlin, e I. Nachamkin.** 2006. "Use of BBL CHROMagar MRSA Medium for Identification of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Directly from Blood Cultures". *Journal of Clinical Microbiology*. **44**:2575-2576.
5. **Peterson, J. F., A. A. Dionisio, K. M. Riebe, G. S. Hall, D. A. Wilson, S. Whittier, J. R. DiPersio, e N. A. Ledeboer.** 2010. "Alternative Use for Spectra MRSA Chromogenic Agar in Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* from Positive Blood Cultures". *Journal of Clinical Microbiology*. **48**: 2265-2267.
6. **Plata, K., A. E. Rosato, G. Wegrzyn.** 2009. "*Staphylococcus aureus* as an infectious agent: overview of biochemistry and molecular genetics of its pathogenicity" (review). *Acta Biochimica Polonica*. **56**: 597-612.
7. **Qian, Q., L. Venkataraman, J. E. Kirby, H. S. Gold, T. Yamazumi.** 2010. "Direct Detection of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus* in Blood Culture Broth by Use of a Penicillin Binding Protein 2a Latex Agglutination Test". *Journal of Clinical Microbiology*. **48**: 140-1421.
8. **Riedel, S., L. Dam, P. D. Stamper, S. A. R. Shah, e K. C. Carroll.** 2010. "Evaluation of Bio-Rad MRSASelect Agar for Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Directly from Blood Cultures". *Journal of Clinical Microbiology*. **48**: 2285-2288.
9. **Sakoulas, G., R. C. Moellering Jr.** 2008. "Increasing Antibiotic Resistance among Methicillin - Resistant *Staphylococcus aureus* Strains". *Clinical Infectious Diseases*.**46**: S360-S367.