

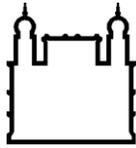
**MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

Mestrado em Biologia Celular e Molecular

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE *Staphylococcus aureus*
RESISTENTES E SENSÍVEIS À METICILINA NO RIO DE
JANEIRO/RJ**

Frederico Medeiros Rosas da Silva

**Rio de Janeiro
2005**



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Oswaldo Cruz

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE *Staphylococcus aureus*
RESISTENTES E SENSÍVEIS À METICILINA NO RIO DE JANEIRO/RJ**

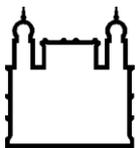
Frederico Medeiros Rosas da Silva

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos à obtenção do Título de Mestre em Ciências

Orientador: Dr. Octávio Fernandes da Silva Filho

Rio de Janeiro

2005



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Oswaldo Cruz

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Frederico Medeiros Rosas da Silva

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE *Staphylococcus aureus*
RESISTENTES E SENSÍVEIS À METICILINA NO RIO DE JANEIRO/RJ**

ORIENTADOR: Dr. Octávio Fernandes da Silva Filho

Aprovada em: 28 / dezembro / 2005.

Examinadores:

Prof^a. Dr^a Marise Asensi Dutra (IOC/Fiocruz), Presidente

Prof. Dr. João Ramos Costa Andrade (UERJ)

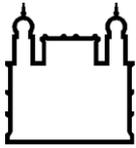
Prof^a. Dr^a Marisa Zenaide Gomes Ribeiro (IPEC/Fiocruz)

Rio de Janeiro, em 28 de dezembro de 2005

Dedico este trabalho às quatro gerações do meu amor, com carinho:
Aos meus queridos avôs, Oswaldo e Zizinha (*in memoriam*), meus guias,
A minha linda, divina, guerreira e maravilhosa mãe, Olésia,
A minha amada e competente Ziza, meu amor e minha paixão,
e a minha bela, espetacular e carinhosa filha, Manuela, minha vida e inspiração.

AGRADECIMENTOS

- A Deus, em primeiro lugar, pelo entusiasmo, discernimento e saúde;
- Ao Octávio, orientador, professor e estimulador, grande pessoa e profissional, que não hesitou em deixar o projeto sob minha responsabilidade. Obrigado especial pela confiança e credibilidade, além dos ensinamentos imprescindíveis;
- Ao meu grande amigo, irmão, cumprade e orientador Fábio, preocupado com minha formação profissional, se tornou importante também na formação de meu caráter, com sua responsabilidade, inteligência, afeto, pureza e carisma; e ainda me ensinou tudo em Bioquímica e Biologia Molecular;
- À Fabiana, especial, que nos brindou com anjos que nos iluminam: Gabi e Pedro.
- Ao IOC, pela estrutura e pelos dois anos ininterruptos de bolsa;
- Aos responsáveis, professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, pela orientação e ensinamento dispensados, em especial para a Cleide Souza, obrigado pela amizade;
- A todo o pessoal do Departamento de Medicina Tropical e do Laboratório de Epidemiologia Molecular de Doenças Infecciosas, em especial ao Adelfton, pelas ricas discussões, à Nédia e Mariângela, anjas que estimulam com amizade e carinho, à querida linda Helena Keiko, ao Leonardo e à Carla Gama, que me ajudaram muito, à Marta Mutis e Alicia, pelos ensinamentos e carinhos, ao Geraldo, pela dedicação no preparo dos meios, ao Eduardo de Recife, à Simone Kikushi, ao Márcio e à Regina: a todos, muito obrigado;
- À Dra. Rosseane e ao grande Amorim, pelo apoio e fornecimento das amostras;
- Ao pessoal responsável pelo sequenciador do DBBM, em especial ao Érico, obrigado;
- Ao pessoal do LABENT, do Depto Bacteriologia, em especial à Dra. Marise Assensi, Luciana e Naiara, pelo auxílio com o PFGE.
- A todos os colegas e amigos de Mestrado, pela ajuda e companheirismo nos momentos difíceis e alegrias, principalmente à Ana Cláudia, Flávia e Josélio;
- A toda a minha família, principalmente aos meus queridos irmãos, Júlio e Suzane, e a minha tia Odaléia, pelo apoio e entusiasmo,
- A todos aqueles que, de uma forma ou de outra, permitiram e incentivaram a realização deste trabalho, meu muito obrigado, que Deus abençoe todos vocês.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTES E SENSÍVEIS À METICILINA NO RIO DE JANEIRO/RJ

RESUMO

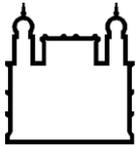
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Frederico Medeiros Rosas da Silva

No Brasil, apenas uma cepa disseminada, o clone epidêmico brasileiro (BEC) de MRSA, foi amplamente caracterizada, apresentando o cassete estafilocócico de resistência à meticilina (SCC*mec*) IIIA de 67 Kb e multirresistência antibiótica. Entretanto, novos clones de MRSA não-multirresistentes com alta virulência têm sido descritos em infecções comunitárias e hospitalares em vários países. Estes clones abrigam SCC*mec* curtos, com cerca de 24 Kb, portanto mais eficiente na transferência, replicação e tradução. Este estudo objetiva descrever o *background* genético dos clones de *S. aureus* envolvidos em infecções no Rio de Janeiro/RJ. Foram coletadas 139 amostras de *S. aureus* (54 MRSA), isoladas de pacientes de sete hospitais e de um laboratório de patologia clínica. As amostras foram submetidas a análises moleculares por diversos métodos. Com a análise por *Multilocus Restriction Fragment Typing* (MLRFT), caracterização do tipo de SCC*mec* e a presença de genes para leucocidina Panton-Valentine (PVL), juntamente com o perfil de resistência antimicrobiana, definiu-se 37 cepas representativas que foram posteriormente submetidos ao sequenciamento por *Multilocus Sequence Typing* (MLST) e caracterizados por *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE). A combinação de todas as abordagens permitiu o agrupamento dos isolados em 22 grupos clonais. O genótipo prevalente correspondeu à cepa nosocomial MRSA/BEC e foi caracterizada pelo RTF-BAAACAC / *Sequence Type* (ST) 239/SCC*mec* IIIA / Pulsotipo A / PVL negativo / multirresistência antibiótica. Outros 5 grupos clonais apresentaram cepas de MSSA e MRSA não-MDR com SCC*mecs* curtos. Quinze RFTs apresentaram somente cepas de MSSA com grande diversidade genotípica entre si, sendo 27,4% dessas PVL-positivas. Algumas cepas MRSA não-MDR PVL-positivas foram

agrupadas em dois genótipos: RFT-AAAAAAA (ST-1) e RFT-BBBBBBAB (ST-30), com SCCmec IVa e IV, respectivamente. Essas são características de clones comunitários disseminados pelo mundo, porém foram encontradas em MRSA hospitalares. De forma interessante, amostras pertencentes ao ST-30 foram identificadas como de origem hospitalar. Entretanto, um isolado foi derivado de infecção comunitária, demonstrando compartilhamento de cepas entre comunidade e hospital. A presença de SCCmecs curtos em cepas MRSA não-MDR direciona à possível emergência de novos clones resistentes. Os perfis heterogêneos de MRSA encontrados no Brasil reforçam a dinâmica da estrutura genética populacional deste patógeno e a importância de procedimentos de tipagem molecular para definir as relações entre isolados nosocomiais e comunitários.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*, MRSA, MSSA, MLST, MLRFT, SCCmec, PVL.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTES E SENSÍVEIS À METICILINA NO RIO DE JANEIRO/RJ

ABSTRACT

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Frederico Medeiros Rosas da Silva

In Brazil, a solely strain has been found disseminated, the Brazilian Epidemic Clone (BEC) of MRSA, was detected, characterized by the presence of a 67Kb staphylococcal chromosomal cassette of methicillin resistance (*SCCmec*) IIIA and antibiotic multiresistance. However, new non-multiresistant highly virulent MRSA strains have been described in community and nosocomial infections in several countries. These clones harbor a smaller *SCCmec* of around 24Kb and therefore more efficient in transferring, replication and translation. This study aim to describe the genetic background of *S. aureus* clones associated to infections in Rio de Janeiro/RJ. One hundred and thirty nine *S. aureus* samples were collected (54 MRSA isolates) from patients from seven hospitals and from a clinical pathology laboratory. These samples were submitted to molecular analyses by several methods. *Multilocus* Restriction Fragment Typing (MLRFT), *SCCmec* typing and the presence of the Panton-Valentine Leucocidin (PVL) genes, in association with the antimicrobial resistance profile, defined 37 representative isolates that were further submitted to DNA sequencing by *Multilocus* Sequence Typing (MLST) and also characterized by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE). The combination of all approaches allowed the clustering of the isolates into 22 clonal groups. The most prevalent genotype corresponded to MRSA/BEC nosocomial strain and was characterized as RFT-BAAACAC, Sequence Type (ST) 239, *SCCmec* IIIA, Pulsotype A, PVL-negative and antibiotic multiresistance. The other 5 clonal groups presented MSSA and non-MDR MRSA strains with smaller *SCCmec*s. Fifteen RFTs presented only MSSA strains with large genotypic diversity being 27,4% of the MSSA samples PVL-positives. Some PVL-positive non-MDR MRSA strains were clustered into two

genotypes: RFT-AAAAAAA (ST-1) and RFT-BBBBBBAB (ST-30), with SCC*mec* IVa and IV, respectively. These are characteristics of community isolates worldwide disseminated, however they are found in nosocomial MRSA strains. Notably, in this study, samples characterized as ST-30 was identified, in its majority, from hospital origin. However, an isolate was derived from community infection, depicting sharing among community and hospital settings. The presence of shorter SCC*mecs* in non-MDR MRSA strains leads to the possible emergence of new resistant clones. The heterogeneous MRSA profiles found in Brazil reinforce the dynamics of the genetic population structure of this pathogen and the importance of molecular typing procedures to define the relationship among nosocomial and community strains.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, MRSA, MSSA, MLST, MLRFT, SCC*mec*, PVL.

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

ArcC	Carbamato quinase
AroE	Chiquimato desidrogenase
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BEC	<i>Brazilian Endemic clone</i>
BHI	<i>Brain hearth infusion</i>
BLAST®	<i>Basic local alignment search tool</i>
Burst	<i>Based upon related sequence type</i>
CA-MRSA	<i>Community-associated Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus</i>
CC	Complexo clonal
CCIH	Comissão de Controle de Infecções Hospitalares
CDC	<i>Center of Disease Control and Prevention</i>
CIM	Concentração inibitória mínima
GC	Grupo Clonal
GenS	Gentamicina sensível
GlpF	Glicerol quinase
Gmk	Guanilato quinase
HA-MRSA	<i>Hospital-associated Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus</i>
HGB	Hospital Geral de Bonsucesso
ICTM	Infecção cutânea e de tecido moles
MDR	Multi droga resistente
MDS	Multi droga sensível
MLRFT	<i>Multilocus Restriction Fragment Typing</i>
MLST	<i>Multilocus Sequence Typing</i>
MRSA	<i>Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus</i>
MSSA	<i>Methicillin-Susceptible Staphylococcus aureus</i>
NA	Não aplicável
NCCLS	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
NNISS	<i>National Nosocomial Infection Surveillance System</i>
NORSA	<i>Non-Oxacillin Resistant Staphylococcus aureus</i>
PFGE	<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i>
PVL	<i>Panton-Valentine Leukocidin</i>
Pta	Fosfato acetil transferase
RAPD	<i>Random amplified polymorphism DNA</i>
RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphism</i>
RFT	<i>Restriction Fragment Type</i>
SaPI	<i>Staphylococcus aureus Pathogenic Island</i>
SCCmec	<i>Staphylococcal Chromosome Cassete mec</i>
1 SLV	<i>Single locus variant</i>
ST	<i>Sequence Type</i>
Tpi	Triosefosfato isomerase
TSA	Teste de sensibilidade antimicrobiana
VISA	<i>Vancomycin-intermediated Staphylococcus aureus</i>
VRSA	<i>Vancomycin-resistant Staphylococcus aureus</i>
YqiL	Acetil-CoA acetil transferase

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1: Organização estrutural dos elementos genéticos <i>SCCmec</i> I, II, III e IV.....	11
Tabela 2.1: Genes <i>house-keeping</i> analisados por MLRFT, com os respectivos iniciadores e enzimas de restrição utilizadas.....	23
Tabela 2.2: Iniciadores utilizados na abordagem multiplex-PCR para classificação do <i>SCCmec</i> , incluindo os <i>loci</i> adicionais utilizados nas reações uniplex para diferenciação entre os subtipos do <i>SCCmec</i> IV (IVa e IVb).....	27
Tabela 4.1: Número de amostras referentes aos ambientes (hospital ou ambulatório) nas quais foram isoladas, em função do perfil de resistência à metilina (MRSA ou MSSA).....	32
Tabela 4.2: Distribuição do número de isolados por sítio de infecção de acordo com o perfil de resistência à metilina, identificados em ambiente hospitalar e ambulatorial.....	32
Tabela 4.3: Perfil de resistência antimicrobiana dos isolados de MRSA e MSSA hospitalares e ambulatoriais.....	34
Tabela 4.4: Correlação entre características moleculares e fenotípicas das cepas de <i>S. aureus</i> do Rio de Janeiro/RJ, em função do RTF.....	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 4.1: Eletroforese em gel de agarose 1% de produtos de PCR para o gene <i>mecA</i> corados com brometo de etídio e visualizados em UV (162 pb).....	33
Figura 4.2: A) Digestão enzimática dos produtos de PCR correspondentes ao gene <i>arcC</i> de <i>S. aureus</i> - MLRFT. Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos de PCR correspondentes ao gene <i>arcC</i> corados com brometo de etídio e visualizados sob luz UV.....	36
Figura 4.2: B) Digestão enzimática dos produtos de PCR correspondentes ao gene <i>arcC</i> de <i>S. aureus</i> - MLRFT. Eletroforese em gel de agarose 4% (2% agarose ultrapura e 2% agarose <i>Nusieve</i>) dos produtos de PCR digeridos <i>Hinfl</i> , corados com brometo de etídio e visualizados sob luz UV.....	36
Figura 4.3: Eletroforese em gel de agarose 1% de produtos de PCR correspondentes aos genes codificantes para a leucocidina Panton-Valentine (PVL) de amostras de <i>S. aureus</i> , corados com brometo de etídio e visualizados sob luz UV, demonstrando quatro amostras positivas além do controle positivo (canaletas 15-18).....	37
Figura 4.4: A) Classificação molecular do SCC <i>mec</i> . Eletroforese em gel de agarose 2% de produtos de PCR corados com brometo de etídio e visualizados sob luz UV, de amostras de MRSA submetidas a multiplex-PCR.....	38
Figura 4.4: B) Classificação molecular do SCC <i>mec</i> . Eletroforese em gel de agarose 1% para amostras de MRSA não IIIA submetidas a uniplex-PCR para subtipagem do SCC <i>mec</i> IVa.....	38
Figura 4.5: Dendograma comparativo e representação esquemática dos fragmentos obtidos a partir da digestão enzimática por <i>SmaI</i> das 40 amostras de <i>S. aureus</i> selecionadas para análise por PFGE, através do software Gelcompar versão 2.1, utilizando o algoritmo UPGMA.....	41
Figura 4.6: Eletroferograma editado, a partir do programa SeqMan, das seqüências nucleotídicas (5'-3' e 3'-5') do trecho 253-278 do gene <i>ArcC</i> (Carbamato quinase), obtido da cepa R436. Na linha superior (Translate), a seqüência consenso gerada.....	42

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	O GÊNERO <i>Staphylococcus</i>	2
1.2	COLONIZAÇÃO E INFECÇÃO POR <i>Staphylococcus aureus</i>	3
1.3	IMPORTÂNCIA CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICA.....	5
1.4	RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA EM <i>S. aureus</i>	8
1.5	RESISTÊNCIA À METICILINA.....	9
1.6	FATORES DE VIRULÊNCIA: ILHAS GENÔMICAS DE PATOGENICIDADE.....	12
1.7	CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE <i>S. aureus</i>	13
1.7.1	Fagotipagem	13
1.7.2	Análise do perfil de eletroforese de enzimas	14
1.7.3	Análise do perfil plasmidial	14
1.7.4	Análise do DNA após restrição enzimática e <i>southern blotting</i>	14
1.7.5	Reação em cadeia da polimerase	15
1.7.6	Análise de fragmentos de DNA por eletroforese em campo pulsado	15
1.7.7	<i>Multilocus Sequence Typing</i>	16
1.7.8	<i>Multilocus Restriction Fragment Typing</i>	16
1.7.9	Multiplex-PCR para tipagem do cassete <i>mec</i>	16
1.8	OBJETIVOS.....	17
1.8.1	Objetivo geral.....	17
1.8.2	Objetivos específicos.....	17
2	MATERIAL E MÉTODOS	18
2.1	AMOSTRAS.....	18
2.1.1	Cultivo bacteriano	18
2.2	PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS.....	18
2.3	EXTRAÇÃO DO DNA.....	19
2.4	TESTE MOLECULAR CONFIRMATÓRIO DE RESISTÊNCIA À METILINA.....	20
2.5	TIPAGEM MOLECULAR.....	21
2.5.1	Caracterização das amostras por <i>Multilocus Restriction Fragment Typing</i> ..	21
2.5.2	Determinação do tipo estrutural do <i>SCCmec</i>	25
2.5.3	Deteção dos genes para leucocidina Panton-Valentine	26
2.5.4	Caracterização das amostras por <i>Multilocus Sequence Typing</i>	26
2.5.5	Análises dos perfis de fragmentação do DNA após restrição enzimática e separação por eletroforese em gel de campo pulsado	26
3	RESULTADOS	27

3.1	DADOS CLÍNICOS E AMOSTRAIS.....	27
3.2	PERFIL DAS AMOSTRAS COM RELAÇÃO À RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS.....	33
3.3	IDENTIFICAÇÃO DE GRUPOS CLONAIIS.....	35
3.3.1	<i>Multilocus Restriction Fragment Typing</i>	35
3.3.2	Leucocidina Panton-Valentine.....	37
3.3.3	Tipagem do elemento <i>mec</i>	38
3.3.4	<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i>	39
3.3.5	<i>Multilocus Sequence Typing</i>	40
3.3.6	Análise dos dados moleculares.....	42
4	DISCUSSÃO.....	43
5	CONCLUSÕES.....	56
	REFERÊNCIAS.....	57
	APÊNDICE 1 – Artigo publicado.....	71

1 INTRODUÇÃO

A associação de *Staphylococcus aureus* com a formação de abscessos e septicemia foi elucidada no distante final do século XIX, entre os anos 1882 e 1884. Contudo, mais de cem anos depois, essa bactéria de cerca de um micrômetro de tamanho, se mantém como um patógeno versátil e ameaçador para humanidade (Lowy, 1998), atingindo populações em todas as faixas etárias e sociais. Amostras de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) foram identificadas em 1961, um ano após a introdução dessa penicilina semi-sintética. Porém, em meados dos anos noventa, sua histórica represália culminou com a emergência de cepas de MRSA como um dos mais importantes patógenos nosocomiais em todo o mundo (Deresinski, 2005).

No Brasil, *S. aureus* tem sido o patógeno mais prevalente em infecções hospitalares, dependendo do hospital e de possíveis surtos epidêmicos de outras bactérias, com índice de resistência à meticilina aumentando gradativamente (Sader *et al.*, 2001).

A plasticidade do genoma bacteriano tem possibilitado a fácil adaptação de *S. aureus* a nichos ecológicos diversos (Hao & Golding, 2004). A pressão seletiva imposta pelo uso de antibióticos, por exemplo, resultou na aquisição e manifestação do fator genético de resistência à meticilina, tendo sua mobilidade mediada por um elemento móvel de transferência gênica (Katayama *et al.*, 2000).

Esses fatores têm favorecido a disseminação mundial de cepas de MRSA multirresistentes endêmicas em hospitais e possibilitou também a recente emergência de amostras de MRSA altamente virulentas, com certa preferência por ambientes comunitários sem pressão seletiva antibiótica (Okuma *et al.*, 2001).

Atualmente, abordagens moleculares têm elucidado essas importantes características epidemiológicas de *S. aureus* (Deresinski, 2005). A estrutura dos elementos genéticos móveis, que conferem resistência antibiótica, e análises *multilocus* de genes responsáveis por manutenção celular têm fornecido resultados decisivos para estudos epidemiológicos. Esses dados têm sido utilizados também para avaliações da relação genética entre os isolados de *S. aureus*, possibilitando traçar um perfil da disseminação das infecções estafilocócicas (Saiman *et al.*, 2003; Diep *et al.*, 2004; Berglund *et al.*, 2005; Hanssen *et al.*, 2005; Ma *et al.*, 2005; Trindade *et al.*, 2005).

No Brasil, as características do principal clone de MRSA, endêmico em vários hospitais, estão sendo elucidadas (Teixeira *et al.*, 1995; Aires *et al.*, 2001). Porém, estudos mais completos de vigilância e epidemiologia molecular devem ser realizados, visando o monitoramento das infecções causadas por esse clone endêmico brasileiro (BEC). Análises

moleculares também são necessárias para rápida detecção de possíveis surtos epidêmicos de novos clones de MRSA, a exemplo das amostras emergentes de MRSA comunitário, e principalmente para o desenho do perfil genético-epidemiológico, ainda pouco esclarecido, das cepas de *S. aureus* sensíveis à meticilina (MSSA), através de análise das informações contidas nos dados de seqüências nucleotídicas por MLST (Enright *et al.*, 2002).

Este estudo visa à caracterização molecular de *S. aureus* no município do Rio de Janeiro, analisando, através dos principais métodos de tipagem molecular, um grupo de isolados coletado entre 2000 e 2004, enviado ao Laboratório de Epidemiologia Molecular de Doenças Infecciosas do Departamento de Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), na Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). A informação molecular resultante deverá permitir analisar hipóteses relacionadas à evolução de diferentes populações bacterianas, e juntamente com a informação fenotípica e epidemiológica, inferir sobre a caracterização e disseminação das cepas.

1.1 O GÊNERO *Staphylococcus*

A espécie *Staphylococcus aureus* está inserida no gênero *Staphylococcus* por apresentar algumas características tais como: produção de pigmento, imobilidade, não formar esporos e apresentar-se sob a forma de cocos Gram-positivos, agrupados em cachos de uva. Adicionalmente, a espécie diferencia-se pela propriedade metabólica de respiração anaeróbia facultativa (Bannerman, 2003).

Tal gênero foi formalmente descrito em 1884 por Rosenbach, sendo associado à família *Micrococcaceae*. Contudo, recentemente, o gênero *Staphylococcus* foi classificado na família *Staphylococcaceae* incluindo, além do *Staphylococcus*, os gêneros *Gemella*, *Macrococcus* e *Salinicoccus*, por diversos fatores fenotípicos e genotípicos. De acordo com a lista de nomenclatura bacteriana hospedada no *site* de Euzéby, membro da União Internacional de Sociedades Microbiológicas, o gênero *Staphylococcus* apresenta atualmente 40 espécies e 24 subespécies descritas, sendo que apenas 16 espécies e 4 subespécies tiveram sua nomenclatura aprovada na revisão de 1980 e encontram-se na *Approved Lists of Bacterial Names* (Euzéby, 2005).

Aproximadamente 50% destas espécies fazem parte da microbiota humana, principalmente fossas nasais e tecido cutâneo, locais principais de isolamento bacteriológico de estafilococos. A espécie mais conhecida do gênero, *S. aureus*, está entre os mais importantes patógenos humanos, responsável por uma grande variedade de infecções, algumas das quais associadas com alta morbidade e mortalidade (Cosgrove *et al.*, 2003). É reconhecida como a

mais patogênica entre os estafilococos em infecções humanas, tanto de origem comunitária como hospitalar (Mylotte *et al.*, 2001, Scanvic, 2001).

A espécie *S. aureus* teve sua nomenclatura atualizada devido à descrição de uma subespécie de *S. aureus* isolada de carneiros, distinta por não possuir a opção de respiração aeróbia: *S. aureus* subsp. *anaerobius*. Após seu reconhecimento, automaticamente foi criada a subespécie *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*. Essa atualização foi aprovada em uma reunião internacional de nomenclatura bacteriana, organizada pela Sociedade Americana de Microbiologia, em 1992 (Lapage *et al.*, 1992). Contudo, a denominação *S. aureus* utilizada neste estudo será em referência à espécie *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*.

As principais características da espécie *S. aureus* constituem-se na multiplicação em meio de cultivo salino rico formando colônias amarelas abundantes, sendo freqüentemente hemolítico em ágar-sangue. São bactérias catalase positiva e oxidase negativa, tendo temperatura variável de crescimento entre 15 e 45° C, com temperatura ótima de 37°C, para desenvolvimento colonial em meio seletivo (Kloos & Bannerman, 1999).

Além dessas características, a morfologia colonial, a produção de coagulase, capacidade de fermentação de manitol e trealose, e produção de nuclease estável (DNase) são fatores importantes para a definição da espécie. Sendo a reação da coagulase e a morfologia colonial os testes mais utilizados nos laboratórios clínicos na identificação presuntiva da espécie (Kloos & Bannerman, 1999).

1.2 COLONIZAÇÃO E INFECÇÃO POR *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus pode tanto ser uma bactéria colonizadora comensal como ter a capacidade de causar uma ampla variedade de infecções com ameaça à vida. A colonização nasal por *S. aureus* é um dos maiores fatores de risco para infecção por este microrganismo (Lowy, 2003). Embora *S. aureus* possa ser isolado de diferentes locais, as fossas nasais são o nicho ecológico primário em humanos. Em seguida, tecido cutâneo, com regiões específicas mais prevalentes, com temperatura elevada e com excesso de sais oriundos de sudorese, como axilas (Doebbeling, 1994, Reagan *et al.*, 1991). Evidências moleculares têm demonstrado que colonização nasal parece exercer um importante papel no desencadeamento de infecções por *S. aureus*, principalmente em acometimentos do trato respiratório em pacientes graves (Corne *et al.*, 2005). Estudos realizados em populações saudáveis estimaram que 10 - 35% dos indivíduos são colonizados por *S. aureus* persistentemente, 20 - 75% apresentam colonização intermitente, e 5 - 50% nunca foram portadores nasais de *S. aureus*. Contudo, as proporções de padrões de colonização nasal podem diferenciar, dependendo do desenho do estudo e das definições prévias para indivíduo portador persistente, intermitente e não portador (Nouwen *et al.*, 2001).

Outros fatores de risco se associam à colonização para desencadear infecções por *S. aureus* como idade, diálises, infecção por HIV, imunodepressão medicamentosa, lesões cutâneas e condições subjacentes como doenças renais, hepáticas e diabetes. No entanto, *S. aureus*, além de colonizadora, é uma bactéria considerada como patógeno versátil e bem sucedido, de virulência intrínseca. Possui habilidade de causar uma diversidade de infecções com sérios riscos à vida do paciente (Lowy, 2003).

A etiologia estafilocócica é multifatorial, como uma doença infecciosa, sendo dependente da resposta imunológica do hospedeiro, é resultante de fatores bacterianos variados, mediados pela expressão de genes acessórios que compreendem proteínas de associação à parede celular ou proteínas extracelulares (Jarraud *et al.*, 2002).

A lesão clínico-patológica básica que caracteriza a infecção por *S. aureus* é o abscesso. Porém, em alguns casos específicos, como na intoxicação alimentar, as manifestações clínicas são resultado da ação de exotoxinas.

As principais infecções causadas por *S. aureus* são caracterizadas por:

- Infecções cutâneas: afecções mais simples que podem ser divididas em purulentas localizadas, sem erupções e infecções que apresentam erupções cutâneas difusas, com descamação. No primeiro grupo estão incluídos a foliculite, a furunculose, o carbúnculo, o impetigo e as infecções de feridas. O segundo grupo inclui a síndrome da pele escaldada e a do choque tóxico .
- Sepsis/bacteremia: na maioria dos casos se desenvolve como consequência de uma infecção localizada, evoluindo a seguir para um quadro séptico. Os fatores de risco incluem idade avançada, imunocomprometimento e procedimentos invasivos (Lowy, 1998). A sepsis estafilocócica é similar à causada por Gram- negativas, apresentando febre, hipotensão, taquicardia e taquipnéia. O prognóstico da septicemia é bastante desfavorável: a mortalidade varia entre 40 a 60%, mesmo com o arsenal disponível de drogas antimicrobianas. Adicionalmente, *S. aureus* é o agente etiológico Gram-positivo mais prevalente causador de sepsis humana (Lowy, 1998).
- Infecções em órgãos determinados: *S. aureus* é agente etiológico de infecções em órgãos variados. Dentre os órgãos atingidos, o de pior prognóstico é a endocardite, tendo 40 a 60% de mortalidade. Adicionalmente, podem apresentar-se como pericardite (causada especialmente por ferimento perfurante), pneumonias (resultantes de aspiração ou por via hematogênica), osteomielite e artrite séptica .
- Toxemias: patologias mediadas por toxinas como intoxicações alimentares, síndrome da pele escaldada e a síndrome do choque tóxico são causadas por *S. aureus* produtoras de

exotoxinas com ação de superantígenos. Entre estas exotoxinas podemos citar as enterotoxinas, a toxina esfoliatina e a toxina da síndrome do choque tóxico (TSST) .

1.3 IMPORTÂNCIA CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICA

A transmissão de *S. aureus* pode ocorrer por rotas distintas incluindo objetos contaminados, mãos de profissionais de saúde, coriza nasal, e principalmente através do contato entre indivíduos apresentando lesões abertas infectadas (Bradley, 1997). Por essa transmissão facilitada e dos inevitáveis fatores de risco, a erradicação total das infecções hospitalares estafilocócicas tem sido dificultada. Intervenções cirúrgicas invasivas e dispositivos médicos, como cateteres, criam oportunidades para invasão tecidual. Os fatores de risco que provavelmente resultam em infecções por cepas multirresistentes incluem: idade avançada, gravidade da doença, transferência entre hospitais; cirurgias, principalmente gastrointestinais, estadia prolongada em hospitais, transplantes, exposição a dispositivos médicos invasivos e uso de antibióticos de amplo espectro, de maneira empírica (Safdar & Maki, 2002). Contudo, algumas infecções hospitalares são evitáveis, principalmente dentre aquelas que se originam de transmissões cruzadas.

As infecções nosocomiais são consideradas um problema para a saúde e economia mundial, sendo definidas como infecções adquiridas em hospital, diagnosticadas após 48 horas de admissão e pós-alta e, portanto, não levadas no período de incubação pelo paciente por ocasião da entrada no hospital. Contudo, pode ser causada por um organismo colonizador oportunista, nas quais transmissões cruzadas entre pacientes, profissionais de saúde e visitantes podem direcionar infecções pontuais a uma epidemia (Garner *et al.*, 1988). Os pacientes hospitalizados apresentam-se, geralmente, susceptíveis a infecções devido às terapias imunocomprometedoras ou à doença de base.

Qualquer agente microbiano, bactéria, fungo, vírus ou parasito, pode causar infecção nosocomial, sendo as bactérias os agentes etiológicos mais prevalentes. Contudo, um problema adicional é a emergência da disseminação de bactérias nosocomiais portadora de resistência à maioria dos agentes antimicrobianos disponíveis. Por exemplo, *S. aureus* (MRSA) e *S. epidermidis* resistentes à meticilina (MRSE), enterococos resistentes à vancomicina (VRE) e bactérias Gram negativas multirresistentes produtoras de β -lactamases de espectro ampliado (ESBL). Essa emergência acentuada de espécies bacterianas resistentes a várias drogas (MDR, *multi-drug resistant*) pode ser considerada como oriunda de vários fatores. Esses determinantes incluem o uso inadequado de antimicrobianos, a extensiva utilização desses agentes como estimuladores de crescimento animal e vegetal, e com o aumento das facilidades para viagens

regionais e internacionais, diminuindo as barreiras geográficas contra aquelas bactérias MDR (Witte, 2004).

Nos anos noventa, *S. aureus* foi reconhecido como a espécie mais frequentemente associada às infecções hospitalares nos Estados Unidos da América (EUA) . No Brasil, foi o patógeno mais frequente em infecções hospitalares entre os anos 1997 e 1999, conforme um amplo estudo multicêntrico que analisou 3.728 amostras bacterianas, sendo *S. aureus* responsável por 22,8% das infecções (Sader *et al.*, 2001). Em outros estudos, essa prevalência varia entre 30 e 60% (Pannuti & Grinbaum, 1995; Wey, 1995).

Conforme estudos multicêntricos internacionais, *S. aureus* é o agente mais frequente em bacteremias e infecções cutâneas diagnosticadas em hospitais da América Latina. Deve-se acrescentar a realidade da resistência à meticilina ao cenário das frequentes infecções hospitalares causadas por *S. aureus*. Observa-se um aumento gradativo anual de isolados resistentes à meticilina, provenientes de pacientes internados em unidades de tratamento intensivo (UTI) nos EUA, notificados ao Sistema de Vigilância Nacional em Infecção Hospitalar (NNISS) americano (www.cdc.gov/incidod/hip/surveil/nnis). De igual forma, na América Latina, um estudo de vigilância antimicrobiana em infecções do trato respiratório avaliou 1.806 isolados bacterianos entre 1999 e 2000, sendo que 351 destes eram *S. aureus*. Participaram trinta e três centros, nos quais a Argentina, Brasil e México, obtiveram a resistência à meticilina detectada em média de 26,5% (Argentina, 15%, México 20% e Brasil, 31,3%) (Mendes *et al.*, 2003).

Porém, esses números não podem ser considerados de forma absoluta. Existe uma grande deficiência em sistemas de vigilância em relação às infecções hospitalares, principalmente em países em desenvolvimento, como o Brasil. Adicionalmente, o hábito da notificação não está plenamente implantado entre os profissionais de saúde.

É necessária uma fonte segura e substancial de dados para o relato preciso de uma provável infecção hospitalar (CDC, 1991). Como geralmente alguns setores ou até todo o sistema hospitalar não se preocupam em obter precisamente essas informações de forma constitutiva, anteriormente a um surto epidêmico, a vigilância epidemiológica no Brasil não se faz eficiente.

Complementarmente, a epidemiologia de MRSA tem sido considerada ultimamente como instável e desafiadora (Chambers, 2001). Atualmente, três novos estágios evolutivos de MRSA estão ocorrendo de forma simultânea em várias partes do mundo:

- (i) Emergência de cepas de MRSA com susceptibilidade reduzida aos glicopeptídeos, sendo a vancomicina/teicoplanina os únicos disponíveis, designadas *S. aureus* com

resistência intermediária à vancomicina (VISA) ou cepas resistentes à vancomicina, conhecidas como *S. aureus* resistente à vancomicina (VRSA) (CDC, 2002);

- (ii) Estabelecimento de clones de MRSA multirresistentes considerados endêmicos em hospitais de diferentes localidades no mundo; e
- (iii) A recente emergência de cepas não-multirresistentes de MRSA, isoladas principalmente de infecções adquiridas em comunidade, por pessoas sem os fatores de risco conhecidos (Okuma *et al.*, 2002).

O primeiro estágio (i) foi ocasionado pelo drástico aumento do uso de vancomicina para tratamento de infecções por enterococos e estafilococos resistentes à meticilina (coagulase-positivos e negativos), gerando emergência de cepas resistentes a vancomicina (Lowy, 2003). Entre os *S. aureus*, o primeiro isolado de VISA foi relatado em 1997 no Japão (Hiramatsu *et al.*, 1997). Posteriormente, alguns relatos pontuais similares foram descritos em outros países como EUA, França, Coreia, África do Sul (Smith *et al.*, 1999), e, inclusive, Brasil, onde foi observado o isolamento de cepas VISA em diferentes hospitais do estado de São Paulo (Oliveira *et al.*, 2001a).

Inesperadamente, essas cepas VISA não apresentaram qualquer dos genes *van* (*vanA*, *vanB* ou *vanC*) ou qualquer outro determinante de resistência à vancomicina, sendo relatos de amostras clonais (Lowy, 2003). Contudo, em 2002, relatos de MRSA resistentes à vancomicina abalaram a comunidade médico-científica (CDC, 2002). Essas amostras de VRSA adquiriram resistência por transferência do operon *vanA* de *Enterococcus faecalis* resistentes à vancomicina, elevando o espectro de uma disseminação mais eficiente entre os estafilococos (Lowy, 2003).

O segundo estágio (ii) evolutivo, referente ao estabelecimento de clones de MRSA MDR, tem posicionado este patógeno como de grande interesse em estudos direcionados à proteção coletiva. Como resultado de métodos moleculares, principalmente análise dos polimorfismos após digestão enzimática do DNA genômico e separação dos fragmentos por eletroforese em campo pulsado (PFGE), cinco principais clones ou linhagens clonais de MRSA foram descritas (Sanchez *et al.*, 1998). Os nomes dados a estes clones MDR de MRSA epidêmicos refletem a região geográfica na qual foram primeiramente identificados, indicando uma característica epidemiológica: Clone Brasileiro (BEC), endêmico na América Latina e Portugal; Clone Ibérico (CI), disseminado pela Europa Ocidental; Clone Húngaro (CH), em hospitais húngaros e Tailândia; Clone Nova York/Japão, em vários estados norte-americanos e Tóquio; e, finalmente, Clone Pediátrico (CP), relacionado a infecções em crianças na Europa e Américas .

O terceiro estágio (iii) é relacionado à emergência mundial de cepas não-multirresistentes de MRSA, porém altamente virulentas, isoladas principalmente de infecções associadas à comunidade. Nos últimos anos, a prevalência desses casos de infecções estafilocócicas comunitárias tem aumentado consideravelmente, inclusive com casos fatais em crianças que apresentaram pneumonia necrosante ou síndrome séptica anteriormente à hospitalização (CDC, 1998).

1.4 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA EM *S. aureus*

O desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos tem se apresentado como um importante problema, de evolução acentuada, principalmente em ambiente hospitalar. A resistência aos compostos β -lactâmicos não hidrolisados pelas β -lactamases, tais como a meticilina e a oxacilina, recebe a denominação geral de “resistência à meticilina” e é considerada de grande importância uma vez que a oxacilina é a droga de primeira linha no tratamento de infecções por *S. aureus*.

Dentre as cepas de MRSA, o perfil fenotípico de sensibilidade antimicrobiana classifica os isolados em multirresistentes ou não-multirresistentes (Gosbell *et al.*, 2003). MRSA multirresistentes agrupam amostras que, além de resistentes a todos os antibióticos β -lactâmicos, são resistentes a várias outras classes, como aminoglicosídeos (gentamicina), trimetopim/sulfametoxazol, quinolonas, tetraciclina, clindamicina e eritromicina. Essas cepas são comumente encontradas em ambientes hospitalares devido à constante pressão seletiva imposta pelo uso de antibióticos, sendo designadas como MRSA associado a hospital (HA-MRSA, *Hospital-Associated MRSA*).

Os MRSA não-multirresistentes são amostras que apresentam geralmente resistência somente aos agentes β -lactâmicos, porém são susceptíveis à maioria das outras classes de antibióticos. São principalmente cepas de MRSA emergentes em nichos comunitários, não relacionadas com ambientes hospitalares, que apresentam fatores extras de virulência. Sendo, portanto, essas cepas denominadas de MRSA associados à comunidade (CA-MRSA, *Community-Associated MRSA*). Foram detectadas também MRSA não-multirresistentes provenientes de infecções nosocomiais, porém em menor proporção. Essas cepas de origem hospitalar caracterizadas como não-multirresistentes são denominadas de *S. aureus* Não-multirresistente Oxacilina-Resistente (NORSA, *Non-multiresistant Oxacillin-Resistant S. aureus*) (Gosbell *et al.*, 2003).

Além da resistência aos β -lactâmicos, grande atenção vem sendo dada à emergência de resistência aos glicopeptídeos (vancomicina) e à mupirocina. Esta preocupação se deve ao fato dos glicopeptídeos serem, juntamente com a linezolida, as drogas de escolha para o tratamento

de infecções por *S. aureus* resistentes à metilina/oxacilina (MRSA), e a mupirocina, por ser a principal droga utilizada no controle da colonização nasal por *S. aureus*

1.5 RESISTÊNCIA À METILINA

A resistência estafilocócica aos agentes β -lactâmicos (ou penicilinas) é mediada por *blaZ*, um gene que codifica a enzima conhecida como penicilinase, capaz de hidrolisar o anel β -lactâmico estrutural do fármaco, inativando os agentes antimicrobianos desta classe (Lowy, 2003). Em função deste cenário bioquímico, a metilina foi desenvolvida sinteticamente e introduzida no mercado como agente β -lactâmico resistente àquelas penicilinas. Sua introdução foi seguida de relatos de cepas resistentes (Jevons, 1961), denominadas posteriormente como MRSA. Essa resistência é devido à expressão de uma proteína de ligação à penicilina (PBP, *penicilin binding protein*) adicional modificada, chamada PBP2a ou PBP2'. Essa uma proteína, de 78 KDa, possui afinidade diminuída aos agentes β -lactâmicos, sendo então capaz de participar da síntese da parede celular peptidoglicana da bactéria mesmo na presença do antibiótico (Chambers, 1997). Portanto, cepas de MRSA são consideradas como resistentes a todos antibióticos β -lactâmicos, incluindo cefalosporinas e penicilinas estafilocócicas (NCCLS, 2000). O gene que codifica esta nova PBP, chamado *mecA*, determinante de resistência à metilina, está presente no cromossomo de MRSA, com aproximadamente 2,5 Kb .

O mecanismo responsável pela mobilidade e transferência horizontal do gene *mecA* foi caracterizado completamente. Esse elemento genético móvel foi designado como cassete cromossômico estafilocócico *mec* (SCC*mec*, “Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*”), considerado a única ilha genômica de resistência de *S. aureus* , podendo possuir outras ilhas, porém de patogenicidade.

O SCC*mec* é um conjunto de genes composto por dois componentes essenciais, determinados a partir de clonagem e sequenciamento de DNA. O primeiro é o complexo do gene *mec*, contendo o gene *mecA* e seus genes regulatórios, e o segundo compreende os genes responsáveis por codificar recombinases, que modulam a mobilidade do SCC*mec*, o complexo *ccr* (Ito *et al.*, 2003).

O complexo *mec* é composto pela seqüência de inserção IS431, o determinante de resistência à metilina (gene *mecA*) e seus genes assessórios de regulação *mecRI* e *mecI*, isolados, intactos ou truncados. Diferentes combinações desses dois genes regulatórios classificam o complexo *mec* em quatro classes: A, B, C e D (Ito *et al.*, 2003). Todas as quatro

classes possuem a seqüência de inserção *IS431* e gene *mecA*. Porém diferenciam-se conforme disposição e organização daqueles genes acessórios de regulação, conforme a seguir:

- classe A: genes *mecA*, *IS431*, *mecR1* e *mecI*;
- classe B: genes *mecA*, *IS431*, *mecR1* e *IS1272*;
- classe C: genes *mecA*, *IS431*, *mecR1* e *IS431*; e
- classe D: genes *mecA*, *IS431* e *mecR1*.

A segunda região essencial compreende o complexo de genes *ccr*, que codifica recombinases do cassete cromossômico. As proteínas codificadas por esses genes, *ccrA*, *ccrB* ou *ccrC*, catalisam a excisão e a integração do cassete em um sítio específico (*attSCC*), localizado próximo à origem de replicação, no cromossomo de *S. aureus* (Ito *et al.*, 2003). Para os genes *ccrA* e *ccrB*, os alotipos 1, 2, 3 e 4 foram descritos, sendo designados como *ccrA1* e *ccrB1*, por exemplo, enquanto que para *ccrC* conhece-se apenas o alotipo 5 (Ito *et al.*, 2004).

O restante do cassete *SCCmec* é designado como região J (do inglês *Junkyard*), que pode conter vários genes que não parecem ser essenciais para a célula bacteriana em certos ambientes. Geralmente, são genes de resistência a agentes não- β -lactâmicos ou a metais pesados. Essa região J complementar condiciona o tamanho dos *SCCmecs* e estipula alguns variantes ou subtipos dos cassetes (Ito *et al.*, 2004).

Conforme a Tabela 1.1, o *SCCmec* é classificado em tipos estruturais de acordo com a combinação da classe de elemento *mec* e do alotipo de recombinases: Os tipos I, II e III foram descritos primariamente em amostras de origem hospitalar, sendo o tipo I caracterizado de uma amostra ancestral de MRSA (Ito *et al.*, 2001). Cada um desses três tipos de *SCCmec* descritos apresenta tamanhos distintos (34 Kb para o tipo I, 53 Kb para o tipo II e 67 Kb para o tipo III), refletindo a variedade de elementos genéticos contidos em cada um deles e o tamanho da região J (Tabela 1.1).

Apesar de compartilharem elementos comuns, tais como cópias da seqüência de inserção *IS431*, o complexo genético *mec* e o complexo *ccr* das recombinases, o cassete do tipo III apresenta outros determinantes adicionais, principalmente genes de resistência a antibióticos, como o pseudogene ψ Tn554, que codifica resistência para eritromicina e tetraciclina. De forma adicional, o tipo III apresenta segmentos que codificam resistência a metais pesados tais como *cadC* e *cadA* (resistência ao cádmio) e *merB* e *merA* (resistência ao mercúrio). O tipo III apresenta subtipos ou variantes por diferenças na seqüência nucleotídica da região J: tipos IIIA e IIIB. Complementarmente, o transposon Tn554 se encontra presente apenas nos cassetes dos tipos II e III.

Tabela 1.1: Organização estrutural dos elementos genéticos SCC*mec* I, II, III e IV.

Cassete Cromossômico Estafilocócico <i>mec</i> (SCC<i>mec</i>)			
1º Região essencial		2º Região essencial	
Classes /	Complexo <i>mec</i> ^a	Complexo <i>ccr</i> /	Alótipos
A	<i>mecR1</i> e <i>mecI</i>	<i>CcrA</i>	<i>ccrA1-ccrA4</i>
B	<i>mecR1</i> e IS1272	<i>CcrB</i>	<i>ccrB1-ccrB4</i>
C	<i>mecR1</i> e IS431	<i>CcrC</i>	<i>ccrC5</i>
D	<i>mecR1</i>		

Classificação do SCC<i>mec</i>			
Tipo de SCC <i>mec</i> (tamanho) ^b	Composição do SCC <i>mec</i> ^c		
	Classe <i>mec</i>	Complexo <i>ccr</i>	Região J ^d
I (34 Kb)	B	<i>ccrA1/ccrB1</i>	<i>Pls</i> ^e
II (53 Kb)	A	<i>ccrA3/ccrB3</i>	pUB110, Tn554, <i>kdp</i>
III, IIIA e IIIB (67 Kb)	B	<i>ccrA2/ccrB2</i>	ψTn554, <i>cadC</i> , <i>cadA</i> , <i>merB</i> e <i>merA</i>
IV (IVa, IVb e IVc) (28 Kb)	C	<i>ccrC5</i>	-

^a(genes regulatórios e seqüência de inserção).

^b(quilo base, Kb).

^c(classe do elemento *mec* combinado com o alotipo de *ccr*).

^d(genes adicionais que constituem a região J do cassete).

^e(*pls*, proteína de superfície sensível a plasmídeos).

Em 2002, foi descrito o quarto cassete SCC*mec*, associado às amostras comunitárias de MRSA: o SCC*mec* tipo IV (Ma *et al.*, 2002). Essas amostras abrigavam cassetes menores (com cerca de 22Kb) do que aqueles previamente descritos em amostras de MRSA de origem hospitalar. Porém, assim como os SCC*mec* dos tipos I, II e III, apresentavam o complexo de recombinases e o complexo *mec*, compartilhando o mesmo sítio de integração ao genoma.

Portanto, o cassete do tipo IV abriga, além do determinante *mecA* de resistência à meticilina, apenas as seqüências responsáveis pela sua mobilidade e regulação, com uma pequena região J, diferentemente dos cassetes de MRSA hospitalar como o tipo III (Ito *et al.*, 2003). Contudo, a composição da região J do SCC*mec* tipo IV o separa em três subtipos ou variantes: IVa, IVb e IVc. Os variantes IVa e IVb não abrigam qualquer gene adicional de resistência antimicrobiana, exceto o gene *mecA* (Ito *et al.*, 2003).

Em 2004, foi descrito o SCC*mec* tipo V (Ito *et al.*, 2004), associado a uma nova classe de recombinase (*ccrC*), apresentando um tamanho de 28 Kb. Também foi descrito em uma amostra de MRSA de origem comunitária, isolada na Austrália.

1.6 FATORES DE VIRULÊNCIA: ILHAS GENÔMICAS DE PATOGENICIDADE

O sequenciamento do genoma de sete cepas distintas de *S. aureus* demonstrou que aproximadamente 25% do genoma bacteriano é composto por genes exógenos, sendo que a maioria deles são associados a fatores de virulência ou resistência, recentemente descritos (Lindsay & Holden, 2004).

Muitos desses elementos, tais como bacteriófagos, plasmídeos, transposons, ilhas genômicas de patogenicidade e resistência (cassetes cromossômicos), geram a plasticidade genética de *S. aureus*. Esse fenômeno tem possibilitado a evolução de cepas virulentas e resistentes a múltiplas drogas, consistindo-se um importante desafio às implicações clínicas (Martinez & Baquero, 2002). A única ilha genômica de resistência em *S. aureus*, o SCCmec, foi abordada no item anterior.

Recentemente, várias ilhas genômicas de patogenicidade (*SaPI*, *S. aureus Pathogenic Island*) foram descritas no cromossomo de *S. aureus* (Ito *et al.*, 2003). Essas SaPIs abrigam, freqüentemente, genes com ação de superantígenos tais como enterotoxinas, esfoliatinas, exotoxinas e *tst*, que codifica para a toxina da síndrome do choque tóxico (TSST) (Baba *et al.*, 2002). Como resultado da atividade de superantígeno, essas toxinas promovem a ativação policlonal de linfócitos T, resultando na produção de citocinas inflamatórias responsáveis pelos sintomas sistêmicos, tais como febre, choque e hipotensão, observados em muitos dos casos.

As SaPis podem abrigar também outros fatores de virulência como leucocidinas, hemolisinas, proteases e hialuronidas (Lindsay & Holden, 2004). Os bacteriófagos também se constituem em classes de ilhas genômicas, carreando genes para toxinas que contribuem efetivamente na patogenicidade de *S. aureus*. Isso pode ser ilustrado pelos genes da leucocidina Pantan-Valentine (PVL), denominados de *lukS-PV* e *lukF-PV*, inseridos no cromossomo através do fago ϕ PVL (Deresisnsky, 2005). Essa leucocidina é uma citotoxina que pode causar necrose tecidual e destruição dos leucócitos, e está geralmente associada a infecções de pele comunitárias e pneumonia necrotisante severa (Lina *et al.*, 1999).

Geralmente, tais toxinas exógenas, responsáveis por invasão celular ou evasão da defesa do hospedeiro, são expressas na fase pós-exponencial de crescimento (Lowy, 1998). Contudo, proteínas de superfície, responsáveis pela fixação ao tecido do hospedeiro, são produzidas na fase logarítmica de crescimento bacteriano. Esses componentes da superfície microbiana reconhecem várias moléculas adesivas da matriz extracelular (Patti *et al.*, 1994) como fibronectina, fibrinogênio e colágeno (Loughman *et al.*, 2005). A proteína A, outra molécula de superfície encontrada na maioria das cepas de *S. aureus*, parece ter um importante papel também na evasão da defesa do hospedeiro, uma vez que se liga ao domínio Fc da Imunoglobulina G (IgG) (Lowy, 1998).

1.7 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *S. aureus*

Os métodos de tipagem molecular de microrganismos visam definir se um grupo de isolados de uma mesma espécie apresenta perfil clonal, ou seja, se evoluiu de um ancestral comum. Para estudos com *S. aureus*, essa informação é necessária em investigações de surtos epidêmicos. Quando há um aumento significativo no número de isolados bacterianos, em um espaço físico-temporal delimitado, informações moleculares permitem identificar se o surto é devido à disseminação clonal de uma única cepa ou multiclonal.

A caracterização molecular também fornece informações fundamentais sobre possíveis alterações populacionais de *S. aureus*, juntamente com o perfil fenotípico de susceptibilidade antimicrobiana. Essas informações podem ser utilizadas durante uma vigilância epidemiológica constante, após mudanças na política de prescrição antibiótica ou na análise de eficácia dos métodos de controle. A tipagem molecular também é utilizada para avaliar a evolução e a disseminação global de cepas, principalmente de clones multirresistentes de MRSA (Enright *et al.*, 2000).

Vários métodos de genotipagem têm sido desenvolvidos nos últimos anos. A escolha do método depende do propósito da análise (investigação de surtos, vigilância ou estudos evolutivos) e do seu poder de discriminação. Um método, para ser considerado como ótimo para todos os propósitos, deve ser reprodutível, de fácil interpretação, de baixo custo e com alto poder discriminatório (Foxman & Riley, 2001). As metodologias utilizadas atualmente consideram as recentes e esclarecedoras descobertas a partir do genoma bacteriano, como por exemplo, tipagem do cassete *SCCmec* e pesquisa de fatores extras de virulência. A seguir, descreveremos as metodologias moleculares mais usadas no passado e atualmente, apontando seu poder discriminatório e esquema metodológico.

1.7.1 Fagotipagem

Dentre as abordagens moleculares utilizadas para discriminação de cepas de *S. aureus*, a fagotipagem é uma das mais antigas, estabelecida há mais de cinquenta anos (Parker, 1972). Esse método é baseado na capacidade variável de diferentes bacteriófagos em lisar diferentes cepas de *S. aureus* (Aucken & Westwell, 2002). Apesar da relativa praticidade e boa discriminação, esse método demonstra considerável variabilidade entre os laboratórios (Aucken & Westwell, 2002).

1.7.2 Análise de padrão de eletroforese de enzimas

A análise eletroforética enzimática *multilocus* (MLEE, *Multilocus Enzyme Electrophoresis*) é uma abordagem fenotípica com grande correspondência genotípica (Boerlin, 1997). É baseada no perfil de mobilidade eletroforética de proteínas essenciais para a viabilidade celular, denominadas de isoenzimas, codificadas por genes “house-keeping” (de manutenção celular) (Selander *et al.*, 1986). Por ser laborioso e possuir baixo poder discriminatório, esse método não é eficaz na investigação de surtos epidêmicos, porém fornece importantes informações para estudos populacionais. Um estudo baseado em MLEE analisou 254 amostras prospectivas de MRSA isoladas entre 1961 e 1992 em nove países de quatro continentes (Musser & Kapur, 1992). Foi verificado que o determinante de resistência à meticilina estava inserido em amostras de diversas linhagens de *S. aureus*, sugerindo que esta aquisição seria um evento de transmissão horizontal. Anos depois, este determinante foi molecularmente caracterizado e denominado como gene *mecA*, associado ao cassete *SCCmec*.

1.7.3 Análise de perfil plasmidial

Métodos absolutamente genotípicos são baseados na análise cromossômica ou extra-cromossômica de ácidos nucléicos, principalmente DNA, permitindo comparação direta de genótipos entre cepas. Uma das primeiras técnicas moleculares utilizadas para tipagem epidemiológica de *S. aureus* foi a análise do perfil plasmidial e análise do padrão de restrição plasmidial. Esse método também apresenta baixo poder discriminatório, porém foi amplamente utilizado até meados dos anos oitenta (Wanger *et al.*, 1992). As grandes desvantagens da análise plasmidial são: possibilidade de perda espontânea do plasmídeo e a existência de cepas que simplesmente não possuem plasmídeos (Weller, 2000).

1.7.4 Análise de DNA após restrição enzimática e *southern blotting*

A digestão do DNA genômico com enzimas de restrição e posterior análise por eletroforese em gel de agarose forneceu um tipo de impressão digital de todo o genoma. Devido ao grande número de fragmentos e a necessidade de análise visual e comparativa dos géis, as interpretações eram subjetivas e, portanto, com baixa reprodutibilidade. Contudo, essa metodologia pode ser otimizada pela aplicação de hibridização de fragmentos de DNA (*southern blotting*) com sondas específicas, tendo como alvos preferenciais seqüências de DNA ribossômico (Weller, 2000). Essa complementaridade, especialmente com múltiplas sondas, é mais eficiente, contudo a abordagem é muito trabalhosa.

1.7.5 Reação em Cadeia da Polimerase

Com o advento da reação em cadeia da polimerase (PCR), vários métodos de tipagem baseados na amplificação de DNA foram desenvolvidos. Genes específicos com regiões conservadas e polimórficas têm sido utilizados como alvos para amplificação (Frenay *et al.*, 1996). Discriminações adicionais podem ser realizadas por subseqüentemente análise do polimorfismo de fragmentos de restrição (RFLP, *Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Tenover *et al.*, 1994). Variações na seqüência do gene codificador para Proteína A (*spa*) podem ser alvos para a discriminação, porém falham em propostas de investigações de surtos (van Belkun *et al.*, 1996). Seqüências de RNA ribossômico e seqüências intergênicas entre 16S e 23S DNAr também tem sido utilizados como alvo.

Alternativamente, iniciadores que pareiam de forma randômica no DNA podem ser utilizados em técnica denominada de *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD), gerando uma assinatura genômica para cepas específicas. No entanto, não foram propostos critérios claros de análise dos resultados de RAPD, o que dificulta a sua utilização em avaliações epidemiológicas e em estudos de vigilância e controle de infecção. Adicionalmente, as condições de baixa estringência do método reduzem a sua reprodutibilidade, dificultando a sua padronização.

Adicionalmente, a pesquisa de fatores de virulência por PCR também tem sido utilizada para a caracterização de *S. aureus*. Dentre esses fatores, a presença de genes para PVL, uma citoxina leucocitária associada a infecções de pele e pneumonia comunitárias, parece ser um marcador de prognóstico desfavorável de infecções por CA-MRSA. Alguns estudos sugerem que certos fatores de virulência relacionados às ilhas de patogenicidade, como genes de toxinas, são associados às linhagens particulares (Moore & Lindsay, 2002, Peacock *et al.*, 2002).

1.7.6 Análise de fragmentos de DNA por eletroforese em campo pulsado

Em 1984, o estudo da epidemiologia de *S. aureus* teve avanço considerável com a introdução da técnica de análise dos perfis de fragmentos do DNA cromossômico após restrição por endonucleases, separados por eletroforese em campo pulsado (PFGE, *Pulsed Field Gel electrophoresis*) (Schwartz & Cantor, 1984). É um processo laborioso, adequado para estudos de surtos epidêmicos, na qual o emprego na análise de *S. aureus* é baseado na digestão cromossômica por *SmaI* e comparação visual de bandas. Em 1995, uma proposta de padronização da interpretação dos resultados pelo emprego da técnica de PFGE facilitou os estudos envolvendo amostras isoladas em uma mesma localidade em curtos períodos de tempo, sendo então reconhecida como padrão-ouro para investigação de cepas de *S. aureus*.

1.7.7 *Multilocus Sequence Typing*

Considerando que as metodologias moleculares disponíveis até o início da década de 2000 (MLEE, RAPD e PFGE) apresentavam graus de variação, foi desenvolvida uma abordagem baseada na aplicação do sequenciamento de sete genes *house-keeping*. Essa metodologia, denominada como análise *multilocus* por sequenciamento nucleotídeo (MLST, *Multilocus Sequence Typing*) foi descrita para a caracterização de amostras de *S. aureus*, minimizando as dificuldades metodológicas descritas anteriormente (Enright *et al.*, 2000).

Essa abordagem, uma correlação genotípica da MLEE, permite a tipagem através do sequenciamento direto dos produtos de PCR. Os resultados obtidos com MLST são armazenados em um banco de dados eletrônico, o que permite a comparação de amostras de *S. aureus* de todas as partes do mundo, com uniformidade na nomenclatura, na qual cada cepa é designada como um *sequence type* (ST) (Enright *et al.*, 2000).

1.7.8 *Multilocus Restriction Fragment Typing*

Em 2003, foi descrita uma nova metodologia para tipagem molecular de *S. aureus*, baseada na técnica do MLST, denominada de *Multilocus Restriction Fragment Typing* (MLRFT) (Diep *et al.*, 2003). Nesta metodologia são analisados os mesmos sete genes de manutenção celular avaliados em MLST, porém, como alternativa ao seqüenciamento, é realizada a digestão enzimática dos produtos de PCR. Os diferentes perfis de restrição são considerados como diferentes *Restriction Fragment Types* (RFTs). MLRFT permitiu demonstrar 94,5% da diversidade genética detectada pelo uso da técnica de MLST numa população de 155 amostras de *S. aureus*.

1.7.9 *Multiplex-PCR para tipagem do cassette mec*

Para uma completa caracterização de cepas de MRSA é necessária a definição da estrutura do complexo e heterogêneo cassette *mec*, elemento móvel associado com o determinante de resistência à meticilina (Oliveira & Lencastre, 2002). Para essa definição organizacional do SCC*mec* em tipo I, II, III e IV (e alguns variantes), foi desenvolvida uma abordagem rápida e presuntiva de multiplex-PCR, que consiste na amplificação simultânea de nove diferentes alvos em uma única PCR, flanqueando regiões diferenciais nas seqüências nucleotídicas dos cassetes previamente descritos.

1.8 OBJETIVOS

1.8.1 Objetivo geral

Investigar as características dos isolados de *S. aureus*, resistentes e sensíveis a meticilina, do município do Rio de Janeiro, utilizando ferramentas moleculares para correlação com aspectos clínicos, epidemiológicos e fenotípicos.

1.8.2 Objetivos específicos

- Determinar as características moleculares das cepas de *S. aureus* predominantes no município do Rio de Janeiro, através de análise genotípica e sensibilidade antimicrobiana;
- Avaliar a relação genética entre as amostras de *S. aureus*; e a correlação destes perfis com aqueles descritos no banco de dados de MLST correspondentes a cepas com distribuição mundial.
- Traçar o padrão genético-epidemiológico inicial da disseminação de infecções estafilocócicas no município do Rio de Janeiro, principalmente por MRSA.
- Determinar as cepas de importância para a saúde pública, fornecendo dados para estudos futuros de epidemiologia e vigilância molecular bacteriana.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 AMOSTRAS

Foram estudadas 139 amostras de *S. aureus* provenientes de infecções e colonizações, coletadas de pacientes internados e ambulatoriais, oriundas de sete hospitais do município do Rio de Janeiro, incluindo um público federal de grande porte. As amostras clínicas de hospitais e ambulatorios, cujos nomes não serão divulgados por questões de ética médica, foram enviadas para o Setor de Microbiologia da Diagnósticos da América, Núcleo Técnico Operacional do Rio de Janeiro, local na qual tiveram sua identificação específica. As amostras do hospital federal foram isoladas e caracterizadas no setor de Microbiologia daquele hospital. Estas amostras corresponderam a períodos temporais determinados (janeiro de 2000 a janeiro de 2001 (consecutivamente) e fevereiro de 2003 a agosto de 2004 (aleatoriamente, devido à emergência de MRSA não-multidroga resistentes).

As amostras eram denominadas numericamente de acordo com a ordem de recebimento. Assim, um arquivo banco de dados foi criado para a organização dos dados fenotípicos previamente levantados, tais como: denominação da cepa, tipo (MRSA ou MSSA), origem hospitalar (paciente internado) ou origem ambulatorial. Complementarmente, o material clínico forneceu o tipo de infecção/colonização, definindo-se entre: infecção sangüínea, infecção óssea, infecção respiratória inferior (incluindo escarro, lavado bronco-alveolar e secreção pleural), respiratório superior (principalmente colonização/secreção nasal, faríngea e traqueal), infecção cutânea e de tecidos moles (ICTM) (incluindo desde abscessos a feridas cirúrgicas), infecção articular, infecção urogenital e isolamento de cateter.

2.1.1 Cultivo bacteriano

As amostras recebidas foram repicadas em meio ágar-sangue. Estas placas foram incubadas a 37°C e o crescimento observado após 18 horas, realizando-se observação da morfologia colonial. Colônias isoladas foram recolhidas e armazenadas sob a forma de suspensões densas em infusão de cérebro e coração (BHI) (Life Technologies ®, Rockville, Maryland, EUA), acrescido de 15% (v/v) de glicerol. Estas suspensões foram mantidas a - 4°C.

2.2 PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

Os testes de suscetibilidade antimicrobiana dos isolados provenientes da Diagnósticos da América foram feitos através do sistema automatizado Vitek ® (bioMérieux Brasil S/A, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), de acordo com as especificações do fabricante, no setor de

microbiologia do núcleo técnico operacional. Os testes realizados foram: detecção de β -lactamase e análise de sensibilidade aos seguintes agentes antimicrobianos: ampicilina, ampicilina/sulbactam, ciprofloxacina, clindamicina, eritromicina, gentamicina, mupirocina, nitrofurantoína, penicilina, oxacilina, tetraciclina, sulfametoxazol-trimetoprima e vancomicina.

As amostras provenientes do hospital federal foram recebidas e processadas no Laboratório de Enterobactérias do Departamento de Bacteriologia do IOC/Fiocruz, onde os testes de identificação tradicionais foram realizados. Os testes de sensibilidade antimicrobiana também foram realizados automaticamente pelo sistema Vitek®.

2.3 EXTRAÇÃO DO DNA

A extração do DNA bacteriano, realizada de acordo com Enright e colaboradores (2000), foi otimizada, sendo o método baseado em lise enzimática, utilização de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico para purificação e etanol para precipitação do DNA.

Este protocolo inicia com o crescimento bacteriano em tubo cônico plástico (Falcon®) com 5 mL meio BHI líquido, sendo o inóculo inicial proveniente de cerca de três colônias isoladas da placa de ágar-sangue, como descrito no item 3.2.1. Após 4 horas de incubação a 37°C, o meio turvo com o crescimento bacteriano foi centrifugado a 4000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado seguindo-se as normas de biossegurança. O precipitado foi lavado com a adição de 1 mL de TE (Tris-HCL 10 mM, EDTA pH 8,0 1 mM). Esta lavagem se caracteriza por uma agitação suave, sem comprometer a integridade do sedimento celular, com o objetivo de retirar o meio BHI restante no tubo. A partir deste ponto foram adicionados 500 μ L da solução de lise contendo lisostafina (500 U/mL) e lisozima (5000 U/mL). A mistura foi agitada vigorosamente em vórtex e incubada a 37°C por 30 minutos. Neste estágio, foram adicionados 50 μ L de SDS 10% e 100 μ L de proteinase K (100 μ g/mL). Esta mistura foi então incubada novamente a 50°C por 30 minutos, sendo em seguida aquecida a 90°C por 5 minutos para garantir a lise total da parede bacteriana. Depois desta fase, o tubo foi colocado em gelo sendo adicionado 600 μ L de fenol:clorofórmio:ácido isoamílico (25:24:1).

A mistura foi agitada cuidadosamente por inversão e centrifugada a 13000 g por 10 minutos. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo limpo e seco e repetiu-se a extração orgânica, desta vez somente com clorofórmio para a retirada de eventuais traços de fenol. O DNA foi precipitado após a adição de 10% Acetato de Sódio 3M e dois volumes (aproximadamente 1 mL) de etanol absoluto. A mistura foi incubada por 15 minutos em gelo e centrifugada a 13000 g por 15 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento

correspondendo ao DNA genômico lavado com 600 µL de etanol 70%. O DNA foi ressuspensão em 50 µL de TE contendo 20 µg/mL de RNase.

2.4 TESTE MOLECULAR CONFIRMATÓRIO DE RESISTÊNCIA À METICILINA

Para confirmação do teste fenotípico de resistência à meticilina, foi realizada a detecção do gene *mecA* por PCR. Os iniciadores MecA P4 (5'-TCC AGA TTA CAA CTT CAC CAG G-3') e o MecA P7 (5'-CCA CTT CAT ATC TTG TAA CG-3') (Oliveira & Lencastre, 2002) foram utilizados na amplificação de um fragmento de 162 pb do gene. A mistura para a PCR (volume total de 50 µL) foi composta de 3 µL da suspensão contendo DNA extraído conforme item 3.4, 5 µL de tampão 10X (10mM Tris-HCl, 25 mM KCl), 4 mM MgCl₂, (Promega Biosciences Inc., Madison, Wisconsin, EUA), 0,2 mM de cada deoxinucleotídeo trifosfatado (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) (Amersham Biosciences do Brasil Ltda), 50 pmoles de cada iniciador (MecA P4 e MecA P7) (MWG Biotech AG, Ebersberg, Alemanha) e 1 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen ® Corp., Carlsbad, Califórnia, EUA).

A reação foi realizada no equipamento de amplificação automatizado Mastercycler Gradiente 5331, modelo 2,3 (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), com ciclo de amplificação incluindo uma etapa inicial de desnaturação a 95°C/1min e 30 ciclos compostos das seguintes etapas: desnaturação a 95°C/1min, anelamento a 56°C/30 seg e extensão a 72°C/1min, seguidos por um passo de extensão final de 72°C/5min.

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% em TBE (0,89M Tris, 0,89mM ácido bórico, 2,5mM EDTA, pH 8,0) a 110V por 1 hora, utilizando-se como padrão de tamanho molecular, o marcador de 100 pb (Amersham Biosciences do Brasil Ltda). Após 10 minutos de imersão em solução contendo brometo de etídio (0,5 µg/mL), os géis foram observados e fotografados sob luz U.V. As amostras padrão *S. aureus* ATCC 25923 e ATCC 33591, gentilmente cedidas pela Diagnósticos da América, foram utilizadas como controles negativo e positivo, respectivamente.

Dois amostras controles de *S. aureus* (uma positiva para gene *mecA* e a cepa ATCC 25923) foram submetidas a seqüenciamento nucleotídico conforme as condições descritas no item 3.9. As seqüências obtidas foram submetidas a alinhamento por similaridade utilizando o programa Blast® (*Basic local alignment search tool*), disponível no site www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST, para confirmação do amplicon como sendo do gene *mecA*, verificando a especificidade dos iniciadores.

2.5 TIPAGEM MOLECULAR

Todas as amostras de *S. aureus* com caracterização fenotípica acurada foram submetidas à genotipagem por MLRFT, PCR para detecção de genes para leucocidina Pantone-Valentine e, as amostras de MRSA, após confirmação molecular de resistência à meticilina, foram submetidas à Multiplex-PCR e duas reações uniplex-PCR adicionais para tipagem e subtipagem do cassete *SCCmec*.

Deste rastreamento inicial, considerando-se também o perfil de sensibilidade antimicrobiana, foi selecionado um subgrupo de amostras representativas de cada grupo clonal para serem submetidas a sequenciamento por MLST e à análise de restrição cromossômica por PFGE.

2.5.1 Caracterização de amostras por *Multilocus Restriction Fragment Typing*

Nesta abordagem, objetivando-se uma diferenciação inicial para agrupamento dos isolados, analisou-se o perfil de restrição do produto de amplificação por PCR de sete genes de manutenção celular, descritos na tabela 2.1, com as respectivas enzimas de restrição (Diep *et al.*, 2003). Foram utilizadas algumas enzimas que clivam no mesmo sítio (isoesquizômeros) ao invés das descritas pelo autor.

Todos os sete genes foram submetidos às mesmas condições de amplificação, diferenciando-se apenas na temperatura de anelamento, não informadas pelos autores da metodologia. Para defini-las, foram realizados testes de gradiente de temperatura, de acordo com o T_m de cada par de iniciador. Então, foram utilizadas as seguintes temperaturas de anelamento, em graus Celcius: para o gene *ArcC*: 58,0°; para o *AroE*: 55,0°; para o *GlpF*: 56,8°; para o *Gmk*: 55,3°; para o *Tpi*: 58,5°; e para o *YqiL*: 60,6°

As amplificações para esses genes foram realizadas com um ciclo inicial de 94°C/5 min, seguido de 30 ciclos de 94°C/1 min, variação de 55,0 a 60,6 °C/1min, de acordo com o gene, 72°C/1 min e um ciclo de extensão final por 72°C/5 min.

A mistura para a reação, com volume final de 50 µL, consiste em 2 µL da suspensão contendo DNA extraído conforme item 3.4, 5 µL de tampão 10X (10mM Tris-HCl, 25 mM KCl), 4 mM MgCl₂, (Promega Biosciences Inc., Madison, Wisconsin, EUA), 0,2 mM de cada deoxinucleotídeo trifosfatado (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) (Amersham Biosciences do Brasil Ltda), 50 pmoles de cada iniciador (conforme tabela X) (MWG Biotech AG, Ebersberg, Alemanha) e 1 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen Corp., Carlsbad, Califórnia, EUA). Porém, no controle negativo sem DNA de cada grupo de reações, foi adicionado 2µL de água ultrapura ao invés de suspensão de DNA.

Tabela 2.1: Genes *house-keeping* utilizados nas análises por MLRFT, com os respectivos iniciadores e enzimas de restrição utilizadas em *S. aureus*.

<i>Locus</i> ¹	Iniciadores (5'-3') ²	Tamanho (pb)	Enzima de Restrição ³
<i>ArcC</i>	TTGATTCACCAGCGCGTATTGTC AGGTATCTGCTTCAATCAGCG	570	<i>HinfI</i>
<i>AroE</i>	ATCGGAAATCCTATTTACATTC GGTGTGTATTAATAACGATATC	536	<i>AluI</i> e <i>CfoI</i> (<i>AluI</i> ⁴)
<i>GlpF</i>	CTAGGAACTGCAATCTTAATCC TGGTAAAATCGCATGTCCAATTC	543	<i>Tsp509I</i>
<i>Gmk</i>	ATCGTTTTATCGGGACCATC TCATTAAC TACAACGTAATCGTA	488	<i>CfoI</i> (<i>HhaI</i> ⁴)
<i>Pta</i>	GT TAAAATCGTATTACCTGAAGG GACCCTTTTGTGAAAAGCTTAA	575	<i>RsaI</i>
<i>Tpi</i>	TCGTTCAATTCTGAACGTCGTGAA TTTGACCTTCTAACAATTGTAC	475	<i>BbuI</i> (<i>SphI</i> ⁴) e <i>MboI</i>
<i>YqiL</i>	CAGCATACAGGACACCTATTGGC CGTTGAGGAATCGATACTGGAAC	598	<i>VspI</i> (<i>AseI</i> ⁴) e <i>DdeI</i>

pb - pares de base

¹*ArcC* - Carbamato quinase

AroE - Chiquimato desidrogenase

GlpF - Glicerol quinase

Gmk - Guanilato quinase

Pta - Fosfato acetil transferase

Tpi - Triosefosfato isomerase

YqiL - Acetil-CoA acetil transferase

² Enrigh e colaboradores (2000)

³ Diep e colaboradores (2003)

⁴ Isoesquizômeros utilizados nesta tese (*AluI*, *AseI*, *HhaI* e *SphI*)

Sete microlitros dos produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, coloração por brometo de etídeo e fotografados sob luz U.V. Somente as amostras com produtos de amplificação específicos foram submetidos à restrição enzimática nas condições apropriadas a cada enzima. Para cada reação de digestão, com volume final de 14µL, foram utilizadas 3U de cada endonuclease (New England Biolabs Inc., Inglaterra), 1,4µL do tampão 10X específico para cada enzima e 7 µL do produto de PCR. As enzimas de restrição utilizadas no estudo para cada *locus* encontram-se descritas na Tabela 3.1. Após 2 horas de reação enzimática, os fragmentos obtidos foram separados por meio de eletroforese em gel de agarose a 4,0% (2,0% agarose Nusieve e 2,0% agarose ultrapura) em tampão TBE e corados em brometo de etídeo, utilizando-se um marcador de peso molecular de 100 pb, com exceção ao gene *GlpF*, separado em gel de poliacrilamida 12,5% (sistema GenePhor®, Amershan Biosciences do Brasil Ltda), corado por Prata e utilizando-se marcador de 50 pb, devido ao elevado número de fragmentos entre 20 e 100 pb.

A designação do alelo referente a cada perfil de restrição foi realizada por comparação visual das bandas. Para cada *locus*, cada padrão de restrição único era designado por uma letra. O *Restriction Fragment Type* (RFT) de uma cepa, que define seu perfil alélico, era definido pela combinação dos alelos dos sete *loci*, como por exemplo, o RFT-BAAACAC de uma amostra estudada, tendo a ordem *arcC* (padrão B), *aroE* (padrão A), *glpF* (padrão A), *gmk* (padrão A), *pta* (padrão C), *tpi* (padrão A) e *yqiL* (padrão C).

2.5.2 Determinação do tipo estrutural do SCC*mec*

A determinação do tipo estrutural do elemento *mec* foi realizada por um sistema de multiplex-PCR, como descrito por Oliveira e Lencastre (2002), e por reações de PCR adicionais para determinação de variantes do SCC*mec* IV, os subtipos IVa e IVb (Okuma *et al.*, 2002).

A abordagem multiplex-PCR inclui a utilização de oito *loci* baseados nas diferentes estruturas dos SCC*mecs* e um controle interno adicional baseado na amplificação de um fragmento do gene *mecA*. A Tabela 3.2 demonstra os oito *loci* utilizados na aplicação do multiplex-PCR e os iniciadores, além dos iniciadores e *loci* utilizados em uma reação de PCR diferencial entre os SCC*mecs* IVa e IVb.

A reação de multiplex foi realizada com volume final de 50 µL contendo 2,5 µL da suspensão, 5 µL de tampão 10X (10mM Tris-HCl, 25 mM KCl), 4 mM MgCl₂, (Promega Biosciences Inc., Madison, Wisconsin, EUA), 0,2 mM de cada deoxinucleotídeo trifosfatado (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) (Amersham Biosciences do Brasil Ltda), 400 nM dos iniciadores CIF2 F2, CIF2 R2, MECI P2, MECI P3, RIF5 F10, RIF5 R13, pUB110 R1 e pT181 R1, 800 nM dos iniciadores DCS F2, DCS R2, MECA P4, MECA P7 e IS431 P4, 200 nM dos iniciadores KDP F1, KDP R1, RIF F3 e RIF4 R9 (MWG Biotech AG, Ebersberg, Alemanha), conforme tabela 3.4, com 1 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen Corp., Carlsbad, Califórnia, EUA). Na reação de controle negativo foi adicionado 2,5 µL de água ultrapura ao invés de suspensão de DNA.

As condições de amplificação para a reação multiplex-PCR foram as seguintes: um ciclo inicial de 94°C/4 min, seguido de 30 ciclos de 94°C/30 segundos, 53°C/30 segundos e 72°C/1 minuto, e um ciclo de extensão final por 72°C/4 min. Oito microlitros dos produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5 %, coloração por brometo de etídeo e fotografados sob luz U.V.

A combinação das bandas amplificadas pelo esquema multiplex definiu o tipo de SCC*mec*, conforme descrito por Oliveira & Lencastre (2002). Contudo, este esquema não é

capaz de discriminar entre os diferentes subtipos do SCC*mec* tipo IV. Portanto, um esquema adicional de amplificação por PCR foi realizado sob as amostras positivas para o SCC*mec* IV na abordagem multiplex.

Tabela 2.2: Iniciadores utilizados na abordagem multiplex-PCR para classificação do SCC*mec* com a respectiva especificidade, incluindo os *loci* adicionais utilizados nas reações uniplex para diferenciação entre os subtipos do SCC*mec* IV (IVa e IVb)

Iniciadores	Seqüências dos iniciadores (5'-3')	Tipo de SCC <i>mec</i>
CIF2 F2 CIF2 R2	TTC GAG TTG CTG ATG AAG AAG G ATT TAC CAC AAG GAC TAC CAG C	I
MECI P2 MECI P3	ATC AAG ACT TGC ATT CAG GC GCG GTT TCA ATT CAC TTG TC	II, III
RIF5 F10 RIF5 R13	TTC TTA AGT ACA CGC TGA ATC G GTC ACA GTA ATT CCA TCA ATG C	III
IS431 P4 pUB110 R1	CAG GTC TCT TCA GAT CTA CG GAG CCA TAA ACA CCA ATA GCC	IA
IS431 P4 pT181 R1	CAG GTC TCT TCA GAT CTA CG GAA GAA TGG GGA AAG CTT CAC	IIIA
DCS F2 DCS R2	CAT CCT ATG ATA GCT TGG TC CTA AAT CAT AGC CAT GAC CG	I, II, IV
MECA P4 MECA P7	TCC AGA TTA CAA CTT CAC CAG G CCA CTT CAT ATC TTG TAA CG	Controle interno (gene <i>mecA</i>)
KDP F1 KDP R1	AAT CAT CTG CCA TTG GTG ATG C CGA ATG AAG TGA AAG AAA GTG G	II
RIF4 F3 RIF4 R9	GTG ATT GTT CGA GAT ATG TGG CGC TTT ATC TGT ATC TAT CGC	III
IVa 1 IVa 2	TTT GAA TGC CCT CCA TGA ATA AAA T AGA AAA GAT AGA AGT TGG AAA GA	IVa
IVb 1 IVb 2	AGT ACA TTT TAT CTT TGC GTA AGT CAT CTT CAA TAT CGA GAA AGT A	IVb

Adaptado de Oliveira e Lencastre (2002) e Okuma e colaboradores (2002).

As reações adicionais para a subtipagem do SCC*mec* IV foram realizadas conforme condições de amplificação do gene *mecA* (item 3.5), obviamente utilizando-se os pares de iniciadores específicos (Tabela 3.4) com suas respectivas temperaturas de anelamento. Para a reação do subtipo IVa, a temperatura de anelamento foi de 53°C, e para os iniciadores específicos do SCC*mec* IVb, 54°C. Um fragmento de 450 pb amplificado foi considerado como positivo na reação do SCC*mec* IVa e um fragmento de 1 kb na reação positiva para IVb.

2.5.3 Detecção dos genes para leucocidina Panton-Valentine

Os genes que codificam a leucocidina Panton-Valentine (PVL) *lukS-PV* e *lukF-PV* foram co-amplificados em uma reação única através de reações de PCR como descrito por Lina

e colaboradores, utilizando-se os iniciadores unidirecionais luk-PV-1 (5'-ATC ATT AGG TAA AAT GTC TGG ACA TGA TCC A-3') e luk-PV-2 (5'-GCA TCA AS(G ou C)T GTA TTG GAT AGC AAA AGC-3'). As condições de amplificação foram realizadas conforme item 3.5, alterando-se somente os iniciadores. A reação compreende um ciclo inicial de 94°C/4 min, seguido de 30 ciclos de 94°C/30s, 55°C/30s, 72°C/1 min e um ciclo final de extensão por 4 min/72°C. Os fragmentos amplificados foram submetidos à eletroforese e visualização conforme item 3.5. Dois fragmentos foram revelados no gel, de 433 e 468 pb, referentes às subunidades *lukS-PV* e *lukF-PV*, respectivamente, compreendendo a estrutura dimérica da leucocidina PVL.

Uma amostra positiva para genes codificadores de PVL foi submetida a seqüenciamento nucleotídico conforme as condições descritas no item 3.9. Os fragmentos foram purificados a partir do gel de agarose, utilizando-se o mesmo *kit* destinado a purificação direta dos produtos de PCR. As seqüências foram submetidas a alinhamento, utilizando-se o programa Blast (www.ncbi.nlm.nih.org/BLAST), para verificação da especificidade dos iniciadores para genes da PVL.

2.5.4 Caracterização de amostras por *Multilocus Sequence Typing*

Neste procedimento foi utilizada a metodologia descrita por Enright e colaboradores (2000). Após tipagem por MLRFT, pesquisa de genes para PVL e definição do SCC*mec*, um subgrupo de 37 amostras foi selecionado para o seqüenciamento. Estas amostras foram selecionadas baseadas na representatividade de cada RFT e perfil antimicrobiano. Para as reações de amplificação, foram utilizados os mesmos iniciadores e condições de reação para MLRFT, descritos na tabela 3.1 e no item 3.5.1, respectivamente. Os produtos obtidos na amplificação foram purificados utilizando-se o *kit* Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega® Biosciences Inc., Madison, Wisconsin, EUA) de acordo com as especificações do fabricante, e como garantia de purificação, os produtos foram submetidos à visualização após eletroforese em gel de agarose. Os produtos purificados foram, então, submetidos à reação de sequenciamento com dideoxi-nucleotídeos marcados através do 'kit' Big Dye, versão 3,1 (Applied Biosystems®). Na reação de sequenciamento com 20 µL de volume final, foram utilizados de 2 a 4 µL de produto de PCR, dependendo da intensidade da banda após purificação. Do tampão de sequenciamento 5X foram adicionados 3,5 µL, adicionado 1,0 µL do Big Dye e 3,2 pmol de um somente um iniciador (*forward* ou *reverse*), completando com água destilada estéril. A reação foi baseada em um ciclo inicial de 96°C por 1 minuto, seguidos de 25 ciclos de 96°C/10 segundos, 50°C/5 segundos e 60°C/4 minutos.

Após a reação, os produtos foram precipitados por etanol absoluto até a concentração de 60%, centrifugados por 20 minutos à velocidade máxima, lavados com 250 µL de etanol 70 %, centrifugados novamente por 10 minutos, desprezando o sobrenadante e secos sob proteção de luz a temperatura ambiente e armazenados a -4 °C. Para o envio ao seqüenciador ABI 3700 (Applied Biosystems), os produtos são ressuspensos com 10 µL de formamida ultrapura e enviados para sequenciamento automatizado na Plataforma de Sequenciamento Fiocruz/PDTIS, no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do IOC/Fiocruz, Rio de Janeiro/RJ. Para cada gene de cada amostra, foi realizado sequenciamento nos sentidos 5'-3' (*Foward*) e 3'-5' (*Reverse*) para obtenção de uma seqüência consenso e confirmação das recombinações pontuais. Os cromatogramas obtidos foram analisados, editados e alinhados através do *software SeqMan*® (DNASTar Inc., Madison, Wisconsin, USA). As seqüências foram submetidas ao banco de dados de MLST (<http://saureus.mlst.net>) para determinação dos alelos e perfil de combinação alélica (denominado *sequence type*, ST) de cada amostra. As seqüências dos novos alelos encontrados foram depositadas no banco de dados de MLST e no *GenBank* (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index/html). Novas combinações de perfis alélicos também foram encontradas e inseridas no banco de dados de MLST.

2.5.5 Análise dos perfis de fragmentação do DNA após restrição enzimática e separação por eletroforese em gel de campo pulsado

O mesmo subgrupo selecionado para análise por MLST (37 amostras) foi submetido à análise por PFGE, com a adição de 8 cepas de MRSA multirresistentes possivelmente pertencentes ao clone BEC, com diferenças fenotípicas. Esta análise foi realizada no Laboratório de Enterobactérias do Departamento de Bacteriologia do IOC/Fiocruz, onde as amostras foram submetidas à extração e processamento do DNA cromossômico, conforme protocolo adaptado daquele utilizado por Sader e colaboradores (1994). Resumidamente, o ácido nucléico protegido em plugs de agarose foi digerido com 10 U da enzima *SmaI* (New England Biolabs Inc., Inglaterra) durante 20 horas à 30 °C, sendo em seguida submetido à eletroforese em campo alternado à 6V/cm por 20 horas em tampão TBE 0,5X a 13 °C em agarose 1% e ângulo de pulso de 120°, no aparelho Chef-DR II (BioRad). Após eletroforese, os géis foram corados por brometo de etídeo, fotodocumentados e digitalizados. A interpretação das imagens obtidas nos géis foi realizada por inspeção visual seguindo os critérios de Tenover e colaboradores (1995) e por método automatizado com auxílio do software Gelcompar versão 2.1, utilizando-se o algoritmo UPGMA e coeficiente de Dice com 3% de tolerância para posição de bandas e construção dos dendrogramas.

3 RESULTADOS

Os resultados obtidos foram analisados como parte de um estudo de vigilância molecular regional do Rio de Janeiro/RJ, caracterizando os principais clones de *S. aureus* predominantes no município.

O grupo amostral foi caracterizado como heterogêneo devido aos espécimens clínicos serem provenientes de diferentes hospitais e ambulatórios, de forma temporal não consecutiva. Portanto, as análises comparativas entre hospitais e/ou ambulatórios ficam inviabilizadas (referentes a número de casos de MRSA e de infecções hospitalares, índice de resistência das amostras entre hospitais e definição de clones predominantes em hospital- ou região-específicos), não sendo o propósito deste estudo.

3.1 DADOS CLÍNICOS E AMOSTRAIS

Cento e trinta e nove amostras clínicas provenientes de cento e trinta e um pacientes foram incluídas neste estudo. Esses pacientes apresentaram infecções por *S. aureus* (136 amostras; 97,8 %) ou tinham colonização nasal caracterizada (3 amostras; 2,2 %) pelo isolamento local deste organismo sem patologia associada. As amostras caracterizadas como MRSA incluíram 54 exemplares (38,9 %) e os isolados de MSSA estudados computaram um total de 85 (61,1 %). Das 139 amostras, setenta e oito amostras (56,1 %) foram provenientes de pacientes internados e 61 (43,9 %) de pacientes ambulatoriais, conforme Tabela 4.1.

Neste estudo foram observados casos de infecção por MRSA identificadas em pacientes sem internação, isoladas ambulatorialmente. Contudo, para a diferenciação entre infecção comunitária e hospitalar, foram considerados os seguintes fatores de risco para aquisição de MRSA de origem nosocomial: (i) recente hospitalização, (ii) uso prolongado de antibióticos, (iii) idade avançada (Pujol *et al.*, 1994), (iv) perfil fenotípico e (v) genotípico da cepa (Okuma *et al.*, 2002). Das 54 amostras de MRSA, 10 (18,5 %) foram identificadas como MRSA de origem ambulatorial, sendo que quatro MRSA dessas apresentaram padrões típicos de infecção comunitária, e as seis restantes, mesmo com a identificação ambulatorial, apresentaram características dúbias, sendo então consideradas como de infecção hospitalar. As infecções consideradas como comunitárias foram provenientes da emergência de amostras de MRSA não-multiresistentes ocorrida no período de junho a agosto de 2004. Todas as amostras de MRSA isoladas entre julho de 2000 e maio de 2004 apresentaram perfil multirresistente, característico de cepas BEC.

Tabela 4.1: Número de amostras referentes aos ambientes (hospital ou ambulatório) nas quais foram isoladas, em função do perfil de resistência à meticilina (MRSA ou MSSA).

Número de isolados	MRSA	MSSA	Total
Hospitalares	44 (31,7%)	34 (24,5%)	78 (56,1%)
Ambulatoriais	10 (7,2%)	51 (36,6%)	61 (43,9%)
	54 (38,9%)	85 (61,1%)	139 (100%)

As infecções/colonizações estafilocócicas apresentadas pelos pacientes estudados estão organizadas em forma de tabela (Tabela 4.2), na qual também foram incluídas as amostras isoladas de sítio previamente estéril como cateter. As amostras provenientes de pacientes com colonização nasal não foram incluídas na tabela referente aos sítios de infecção.

Portanto, os principais sítios foram: infecção cutânea e de tecidos moles (ICTM), agrupando principalmente lesão cutânea (13,9 %) e secreção ocular (13,21 %). As infecções do trato respiratório superior totalizaram 31,6 %, sepse/bacteremias (14%), infecção do trato respiratório inferior (7,4 %) e infecção urogenital (4,4 %).

Tabela 4.2: Distribuição dos isolados por sítio de infecção/colonização, de acordo com o perfil de resistência à meticilina, identificados em ambiente hospitalar e ambulatorial

SÍTIO	MRSA (n=53)^a		MSSA (n=83)^a		TOTAL
	Hosp.	Amb.	Hosp.	Amb.	
ICTM^b					
Abcesso	-	1	1	2	4 (2,9%)
Ferida cirúrgica	2	-	-	-	2 (1,48%)
Lesão cutânea	-	5	2	12	19 (13,9%)
Secreção ocular	-	2	-	16	18 (13,21%)
Tecido mole	-	-	1	1	2 (1,48%)
Trato respiratório superior	17	-	15	11	43 (31,6%)
Trato respiratório inferior	5	1	2	2	10 (7,4%)
Sepse/Bacteremias	10	-	8	1	19 (14%)
Cateter	5	-	3	-	8 (5,9%)
Urogenital	2	1	-	3	6 (4,4%)
Articular	-	-	-	1	1 (0,7%)
Óssea	1	-	-	-	1 (0,7%)
Sem registro	1	-	1	1	3 (2,2%)
	43	10	33	50	136 (100%)

^a Valores referentes a amostras provenientes somente de infecções e cateter, não incluindo 3 amostras de colonização

^b ICTM - infecção cutânea e de tecido mole

Entre as infecções hospitalares, houve predomínio das infecções de trato respiratório superior (41 %) e das sepse/bacteremias (23 %), sendo divididas entre amostras de MRSA e MSSA. No entanto, entre as infecções de pacientes ambulatoriais predominaram as infecções cutâneas e de tecidos moles (64%), sendo MSSA prevalente. A predominância de ICTM em amostras ambulatoriais foi devido às infecções oculares e lesões cutâneas terem sido isoladas ambulatorialmente. Também foi observada uma alta incidência de MRSA (6 - 60%) em amostras de infecções respiratórias inferiores.

3.2 PERFIL DAS AMOSTRAS EM RELAÇÃO À RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

Das 139 amostras de *S. aureus* analisadas, 54 (38,9 %) foram previamente definidas como MRSA por testes fenotípicos pelos laboratórios clínicos de origem. Contudo, sete destes isolados apresentaram identificação fenotípica de resistência à oxacilina dúbia, sendo consideradas como amostras com perfil de resistência questionável pelos laboratórios que realizaram o TSA (concentração inibitória mínima baixa).

Todas as 54 amostras tipadas fenotipicamente como MRSA apresentaram o fragmento de 162 pb referente ao gene *mecA* (Figura 4.1), inclusive as amostras com resultado fenotípico questionável. De igual forma, todas as outras amostras definidas como MSSA por testes fenotípicos foram negativas para o gene *mecA*, apresentando portanto 100% de concordância entre testes fenotípico e molecular. As amostras foram, portanto, classificadas como MRSA e MSSA, de acordo com perfil de resistência à oxacilina/meticilina.



Figura 4.1: Eletroforese em gel de agarose 1% de produtos de PCR para o gene *mecA* corados com brometo de etídio e visualizados sob luz UV (162 pb). 1- Marcador de tamanho molecular (100 pb), 2- controle positivo (ATCC BEC.), 3- S2 (MSSA), 4- R11 (MRSA), 5- S12 (MSSA), 6- S13 (MSSA), 7- R30 (MRSA), 8- S32 (MSSA), 9- Controle negativo (ATCC MSSA), 10- Controle negativo (sem DNA).

Para facilitar a correlação com os resultados moleculares, as amostras foram subdivididas entre cepas multidroga resistentes (MDR), não-multidroga resistentes (não-MDR) e multidroga sensíveis (MDS). Em uma normatização da NCCLS (2000), foi reafirmado que as cepas de *S. aureus* com resistência à oxacilina são resistentes a todos antibióticos β -lactâmicos. Assim, uma cepa de MRSA foi considerada como multidroga resistente (MDR) quando, além da resistência aos β -lactâmicos e oxacilina, foram resistentes à quatro ou mais agentes não β -lactâmicos. Cepas de MRSA não multidroga resistentes (não-MDR) apresentam resistência somente à três ou menos agentes antimicrobianos não β -lactâmicos. Obviamente, uma cepa MRSA nunca pode ser considerada como multidroga sensível (MDS).

As amostras de MSSA foram analogamente definidas como MDR, não-MDR e MDS, de acordo com o número de agentes antimicrobianos ao qual apresentaram resistência, contudo, cepas MDR de MSSA são resistentes aos agentes β -lactâmicos e a três ou mais outros antibióticos.

Designou-se cepas não-MDR de MSSA para as amostras que apresentaram resistência somente aos antibióticos β -lactâmicos ou até dois agentes não β -lactâmicos. Para as cepas de MSSA sensíveis a todos os antimicrobianos testados, designou-se o termo MDS.

Os resultados referentes aos perfis de sensibilidade antimicrobiana para MSSA e MRSA estão demonstrados na Tabela 4.3, de acordo com a classificação mencionada acima.

Neste estudo, a presença de MRSA foi associada principalmente à co-resistência aos antibióticos não β -lactâmicos, conseqüentemente, cepas de MRSA resistentes à várias drogas (MDR – 39/54), disseminadas em ambientes hospitalares.

Tabela 4.3: Perfil de resistência antimicrobiana dos isolados de MRSA e MSSA hospitalares e ambulatoriais

Número de isolados		MDR ^a	Não-MDR ^b	MDS ^c	Total
MRSA	Hosp.	34	10	-	44
	Amb.	5	5	-	10
MSSA	Hosp.	-	19	15	34
	Amb.	-	46	5	51
		39 (28 %)	80 (57,5 %)	20 (15,5 %)	139 (100 %)

^a MDR – Multidroga resistente

^b Não-MDR – Não multidroga resistente

^c MDS - Multidroga sensível

De acordo com o perfil de sensibilidade antimicrobiana, nenhuma amostra de MSSA foi considerada como MDR. Dos 85 isolados de MSSA, 20 (23,5 %) foram sensíveis a todos os antibióticos testados, sendo estas amostras denominadas MDS. Os 65 MSSA restantes foram cepas não-MDR, sendo que 46 (71 %) foram obtidos de infecções ambulatoriais.

As amostras de MRSA foram mais resistentes aos antibióticos não β -lactâmicos do que as amostras de MSSA. Com exceção de duas, as amostras de MSSA mostraram co-resistência a um pequeno número de antimicrobianos não β -lactâmicos em comparação com as amostras de MRSA.

Características relevantes de resistência observadas em amostras de certos genótipos estão descritas no ítem a seguir.

3.3 IDENTIFICAÇÃO DE GRUPOS CLONAIIS

Todos os 139 isolados de *S. aureus* foram, portanto, analisados através das técnicas de MLRFT e pesquisa de genes para PVL. Todas as 54 amostras de MRSA foram submetidas à tipagem do SCC*mec*. Os resultados foram correlacionados com as características fenotípicas relacionadas ao perfil de resistência antimicrobiana.

Um sub-grupo de 37 amostras correspondentes a representantes de cada RFT foi submetido a tipagem adicional por MLST e PFGE, e quando o RFT possuía amostras de MRSA e MSSA, uma amostra de cada foi analisada. No caso de haver RFT com amostras de MRSA abrigando diferentes SCC*mec*, uma amostra de cada elemento *mec* também foi analisada. Amostras com mesmo RFT, porém com relevantes características fenotípicas específicas também sofreram uma análise mais refinada.

Portanto, MLRFT, tipo de cassete *mec*, presença de genes para PVL e perfil de sensibilidade antimicrobiana foram utilizados como referência para seleção de amostras para análise adicional por MLST e PFGE.

3.3.1. *Multilocus Restriction Fragment Typing*

A análise através do perfil de restrição de genes constitutivos (MLRFT) definiu 22 diferentes RFT entre os 139 isolados de *S. aureus* do Rio de Janeiro/RJ. As características dos diversos RFTs estão apresentadas na Tabela 4.4. De modo ilustrativo, um exemplo de definição de alelos por restrição enzimática de um dos genes constitutivos está demonstrado na Figura 4.2.

Apenas dois RFT apresentaram somente cepas de MRSA, perfazendo 29,5 % do total das cepas: RFT-BAAACAC (40), o mais prevalente do estudo, que agrupa cepas BEC, e RFT-AAAACBC (1). Cinco RFT incluíram tanto cepas de MRSA como MSSA (41,7 % do total das

cepas). Desses, o RFT-AAACCAA foi o que apresentou o maior número de amostras - 15 MSSA e 5 MRSA. As amostras de MRSA deste grupo de RFT apresentam perfil não-multirresistente, relacionado com o perfil de sensibilidade das amostras MSSA de origem. Quinze diferentes RFT apresentavam somente cepas de MSSA, porém agruparam somente 28,8% dos isolados, demonstrando relevante heterogeneidade.

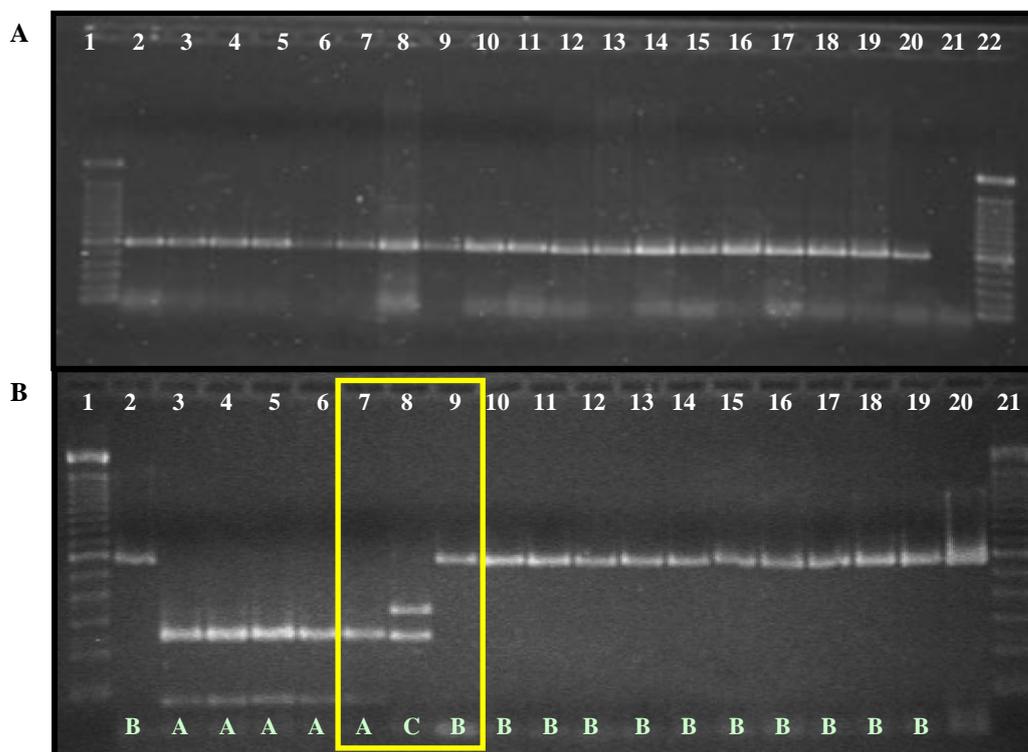


Figura 4.2: Digestão enzimática dos produtos de PCR correspondentes ao gene *arcC* de *S. aureus* - MLRFT. **A)** Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos de PCR correspondentes ao gene *arcC* corados com brometo de etídio e visualizados sob luz UV. 1 e 22- Marcadores de tamanho molecular de 100 bp, 2- R2, 3- R261, 4- R265, 5- R277, 6- R283, 7- R312, 8- R411, 9- R436, 10- R29, 11- R56, 12- R58, 13- R236, 14- R240, 15- R241, 16- R64, 17- R253, 18- R255, 19- R255, 20- Controle pos. (ATCC BEC) e 21- Controle neg (sem DNA). **B)** Eletroforese em gel de agarose 4% (2% agarose ultrapura e 2% agarose Nusieve) dos produtos de PCR digeridos *Hin*I, corados com brometo de etídio e visualizados sob luz UV. 1 e 21- Marcadores de tamanho molecular (100 bp), 2- R2, 3- R261, 4- R265, 5- R277, 6- R283, 7- R312, 8- R411, 9- R436, 10- R29, 11- R56, 12- R58, 13- R236, 14- R240, 15- R241, 16- R64, 17- R253, 18- R255, 19- Controle Pos. (ATCC BEC) e 20- Controle neg. (amplicons sem enzima de restrição). As letras A, B e C se referem aos alelos designados de acordo com o perfil de fragmentos, na qual o conjunto dos alelos dos sete genes forma o RFT das amostras. Em destaque (amarelo), três diferentes perfis alélicos, A, B e C.

3.3.2. Leucocidina Panton-Valentine:

A análise de presença de genes para PVL identificou 47 (33,8%) amostras positivas, distribuídas em 12 diferentes RFTs, apresentando os fragmentos de 436 e 468 pb correspondentes aos genes codificadores da leucocidina (Figura 4.3). Trinta e oito (80% do total de PVL-positivas) foram cepas MSSA e 9 (20%) foram MRSA. Trinta (63,8%) das amostras positivas para PVL foram isoladas de casos de infecções diagnosticadas ambulatorialmente, provenientes de 8 diferentes RFTs.

As percentagens de amostras positivas para PVL em cada RFT variou de 0% a 100%. O RFT mais prevalente com cepas PVL-positivas foi o CAFBCAB, na qual 100% (15) das amostras apresentaram os genes para a leucocidina. Esse RFT apresentou 4 amostras de MRSA (todas Não-MDR) e 11 MSSA [10 sensíveis somente a eritromicina (Não-MDR) e 1 MDS]. Das 15 amostras, 93,3% (14) foram isoladas de infecções cutâneas ou tecido mole (ICTM), das quais 64,3 % (9) foram provenientes de secreção ocular e 35,7 % (5) de lesão cutânea. A outra amostra deste RFT (6,7 %) foi proveniente de infecção urogenital e apresentou um diferente perfil por PFGE, discutido posteriormente.

Outros RFTs, RFT-BBBBBBAB e RFT-BBBBAAB, que apresentaram 9 e 7 isolados respectivamente, possuíram somente um isolado em cada RFT que não foi positivo para genes da PVL.

O RFT-BAAACAC, que agrupou 40 amostras de MRSA, a grande maioria multirresistentes (38/40), apresentou somente 3 amostras positivas para PVL, todas de origem hospitalar.

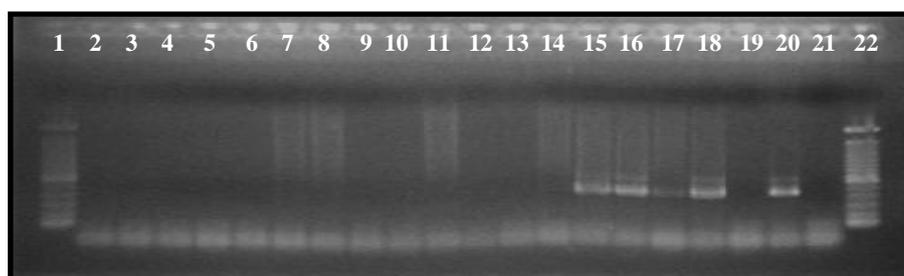


Figura 4.3: Eletroforese em gel de agarose 1% de produtos de PCR correspondentes aos genes codificantes para a leucocidina Panton-Valentine (PVL) de amostras de *S. aureus*, corados com brometo de etídio e visualizados sob luz UV, demonstrando quatro amostras positivas além do controle positivo (canaletas 15-18). 1 e 22- Marcadores de tamanho molecular de 100 bp, 2- S12, 3- S13, 4- S14, 5- S15, 6- S16, 7- S17, 8- S18, 9- S19, 10- S20, 11- S22, 12- S24, 13- S25, 14- S26, 15- S27, 16- S28, 17- S29, 18- S30, 19- Controle negativo (Cepa negativa para PVL), 20- Controle positivo (Cepa positiva para PVL) e 21- Controle negativo (sem DNA).

3.3.3. Tipagem do elemento SCCmec:

Os resultados da tipagem do elemento genético móvel de resistência à meticilina, o SCCmec, mostrou que das 54 amostras de MRSA, 70,4 % (38) abrigavam o SCCmec tipo IIIA, 20,4 % (11) apresentaram o tipo IVa e 5,6 % (3) abrigavam o SCCmec IV. Em 3,6 % (2) a tipagem do SCCmec não foi possível pelos iniciadores utilizados, apesar de serem isolados positivos para gene *mecA*. Neste estudo, não foram identificados os seguintes tipos de SCCmec: I, IA, II, III, IIIB e IVb. Não foram utilizados marcadores para os recém-descritos SCCmecs, tipos IVc e V.

Todas as 38 amostras de MRSA com SCCmec do tipo IIIA foram de um único RFT, o –BAAACAC, característico do clone multirresistente BEC, na qual 5 fragmentos foram amplificados na reação de multiplex-PCR, conforme canaletas 2 e 6 da Figura 4.4-A. As outras duas amostras deste RFT foram as que apresentaram impossibilidade técnica de tipagem do elemento *mec*. Essas duas amostras apresentaram perfil divergente do restante do grupo RFT-BAAACAC por PFGE (demostrado a seguir), e uma delas foi PVL-positiva.

As amostras correspondentes ao SCCmec IVa apresentaram um fragmento de 450 pb após amplificação por uniplex-PCR, referentes à região J exclusiva do tipo IVa (Figura 4.4-B). As amostras de MRSA com esse SCCmec se incluíram em cinco diferentes RFTs: RFT-CAFBCAB (4), -RFT-AAACCAA (3), RFT-BBBBBB (2), RFT-AAAACBC (1) e RFT-CAAAABC (1). Desses, o RFT-CAFBCAB foi o que apresentou maior número de amostras (4) de MRSA com o SCCmec IVa.

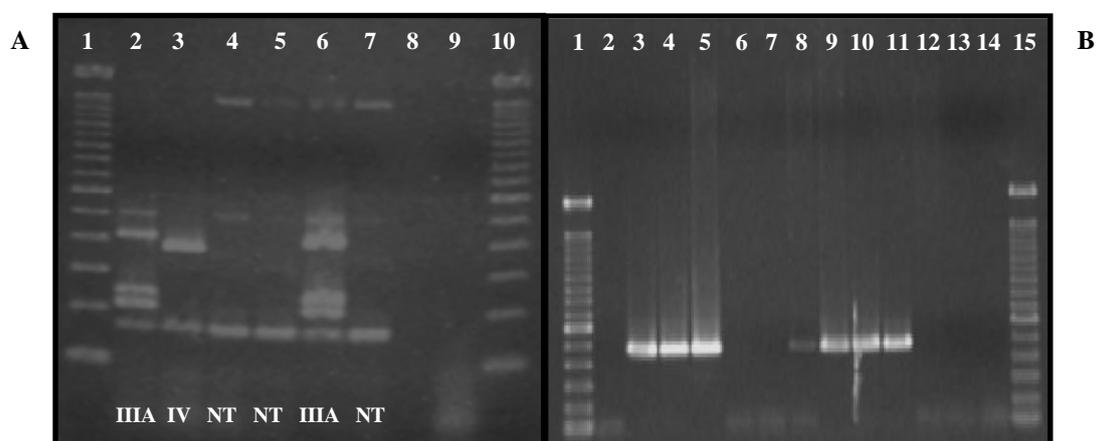


Figura 4.4: Classificação molecular do SCCmec. **A)** Eletroforese em gel de agarose 2% de produtos de PCR corados com brometo de etídio e visualizados sob luz UV, de amostras de MRSA submetidas a multiplex-PCR. 1 e 10- Marcadores de tamanho molecular (100 pb), 2- controle positivo (ATCC BEC.), 3- R161 (IIIA), 4- R165 (IV), 5- R253 (NT), 6- R168 (IIIA), 7- R283 (NT), 8- Controle negativo (ATCC MSSA) e 9- Controle negativo (sem DNA). **B)** Eletroforese em gel de agarose 1% para amostras de MRSA não IIIA submetidas a uniplex-PCR para subtipagem do SCCmec IVa. 1 e 15- Marcadores de tamanho molecular (100 pb), 2- R165, 3- R167 (IVa), 4- R170 (IVa), 5- R261 (IVa), 6- R265, 7- R277, 8- R283 (IVa), 9- R312 (IVa), 10- R411 (IVa), 11- R436 (IVa), 12- R253, 13- Controle negativo (ATCC BEC - IIIA) e 14- Controle negativo (sem DNA).

O SCCmec IV (canaleta 3 da Figura 4.4-A), menos prevalente, ocorreu somente em duas amostras (40 %) das cinco de MRSA do RFT-AAACCAA, e na única amostra de MRSA correspondente ao RFT-AAAAAAA, que incluiu ainda mais 11 amostras de MSSA.

3.3.4. Pulsed Field Gel Electrophoresis

A análise computadorizada dos perfis de bandas obtidos pela técnica de PFGE caracterizou 12 diferentes grupos considerados molecular/epidemiologicamente relacionados, aos quais foram definidos com letras (genótipos). Esses grupos foram subdivididos em 20 subtipos definidos com a letra de origem e um algarismo numérico, perfazendo um total de 32 diferentes perfis de restrição cromossômica para as 40 amostras analisadas, selecionadas a partir de 17 diferentes RFTs em conjunto com presença de genes PVL, tipo de SCCmec e características fenotípicas. Alguns RFTs que apresentaram apenas um isolado de MSSA não foram submetidos a análises refinadas de PFGE e MLST. Do RFT-BAAACAC, que incluiu 40 amostras de MRSA multirresistentes, foram selecionadas 17 representantes para a análise por PFGE.

O resultado do perfil de PFGE cada RFT, com as referentes amostras selecionadas, está demonstrado na Figura 4.5. De igual forma, se encontram assinalados na figura os resultados de genotipagem e o perfil de sensibilidade antimicrobiana para cada amostra representativa.

A análise de PFGE mostrou que 76,5 % (13) das 17 amostras representativas pertencentes ao RFT-BAAACAC podem ser agrupadas em um único genótipo (A), pois apresentam até 90% de similaridade, de acordo com os critérios de Tenover e colaboradores (1995), apresentando 7 diferentes pulsotipos relacionados (A, A1, A2, A3, A5, A6 e A7). Contudo, este RFT apresentou mais quatro amostras incluídas em diferentes pulsotipos, não genótipo A: pulsotipos C, I, M e M1, com uma amostra cada, com exceção do pulsotipo I, que apresentou uma amostra adicional de outro RFT (-AAAAAAA).

Os perfis de bandas obtidos pela técnica de PFGE revelou que as amostras dos genótipos A e I/M apresentaram cerca de 78% de similaridade. A tipagem do SCCmec mostrou que 38 amostras do RFT-BAAACAC (inclusive aquelas dos genótipos C e M1) apresentaram SCCmec do tipo IIIA. As outras duas amostras pertencentes aos genótipos I e M apresentaram SCCmec diferentes do tipo IIIA, não tipáveis, sendo que a amostra R253, com pulsotipo I, foi PVL-positiva, conforme Tabela 4.4, na qual todos os resultados moleculares estão organizados de acordo com cada RFT.

Em contraste com a similaridade apresentada por PFGE entre as amostras de MRSA multirresistentes que abrigam SCCmec IIIA, pertencentes principalmente ao genótipo/pulsotipo A, as cepas de MRSA não multidroga resistentes analisadas, carregando cassetes *mec* curtos (IV

ou IVa), apresentaram-se em três diferentes genótipos: H, I e J, cada um com três, duas e três subclassificações, respectivamente, totalizando 8 diferentes perfis. Deve-se considerar que foram analisadas 9 amostras de MRSA abrigoando cassetes menores (7 do tipo IVa e 2 do tipo V).

Dos cinco RFT que incluíram tanto cepas de MRSA como MSSA (41,7 % do total das cepas), quatro RFTs tiveram exemplares de MRSA e MSSA analisados por PFGE (RFT-AAAAAAA, RFT-AAACCAA, RFT-BBBBBBAB e RFT-CAFBCAB). Inesperadamente, essas quatro amostras de MRSA apresentaram, pela análise por PFGE, perfis diferentes das amostras de MSSA de mesmo RFT.

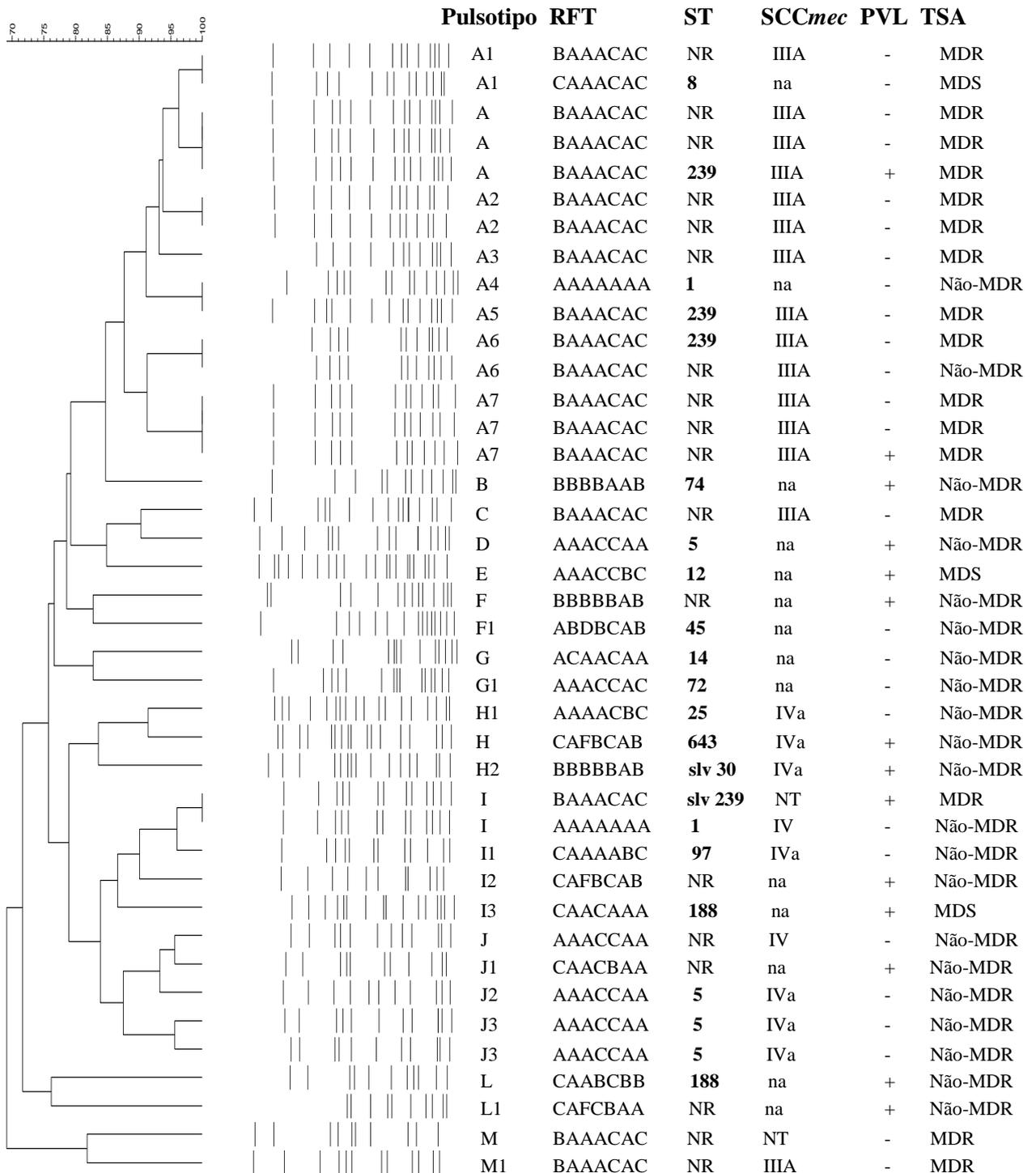
Uma amostra de MSSA com RFT-CAAACAC apresentou mesmo perfil de PFGE (A1) com um exemplar MRSA do RFT-BAAACAC, na qual possui apenas um *locus* variante por MLRFT.

Dos quinze diferentes RFTs que apresentavam somente cepas de MSSA (28,8% dos isolados), 14 RFTs foram analisados por PFGE, metodologia que discriminou 9 diferentes genótipos com 5 subclassificações, portanto 14 diferentes pulstipos para os mesmos 14 RFTs, confirmando a heterogeneidade dos MSSA por MLRFT.

3.3.5. Multilocus Sequence Typing

As 37 amostras selecionadas para o sequenciamento, referentes a 15 diferentes RFTs, apresentaram 17 “Sequence Types” (STs) por MLST. A diferença de dois STs a mais quando comparado com o número de RFTs se deve a variabilidade em apenas um *locus*, caracterizando dois STs ainda não descritos.

Foram seqüenciadas 6 exemplares do RFT-BAAACAC, que incluiu 40 amostras, todas MRSA (74 % da população de MRSA) e a amostra padrão ATCC de MRSA, representante do clone BEC. Cinco exemplares deste RFT pertenceram ao ST-239 (alelos 2-3-1-1-4-4-3) e um foi variante de um único *locus* (single *locus* variant, SLV) deste ST, pelo gene *Gmk* (alelos 2-3-1-65-4-3-3), caracterizando um novo ST. Essa cepa variante do ST-239 foi PVL-positiva, e apresentou cassete *mec* não tipável, diferente das outras amostras deste RFT, com SCC*mec* IIIA.



ST- sequence type; SLV- “single locus variant” (variante de locus único); NT- não tipável; NR- não realizado; na- não aplicável; PVL- leucocidina Panton-Valentine; MDR- multidroga resistente; Não-MDR- não multidroga resistente; MDS- multidroga sensível.

Figura 4.5: Dendrograma comparativo e representação esquemática dos fragmentos obtidos a partir da digestão enzimática por *Sma*I das 40 amostras de *S. aureus* selecionadas para análise por PFGE, através do software Gelcompar versão 2.1, utilizando-se o algoritmo UPGMA e coeficiente de Dice, com 3% de tolerância para posição de bandas. A definição dos pulsotipos foi realizada seguindo os critérios de Tenover e colaboradores (1995).

Outro clone que apresentou uma cepa SLV foi o ST-30 (alelos 2-2-2-2-6-3-2), na qual um exemplar MRSA foi variante no gene *Pta* (alelos 2-2-2-2-89-3-2), caracterizando um novo ST. Essa diferença genotípica entre as duas amostras não foi detectada por outras metodologias moleculares. Essa amostra SLV foi coletada de ambiente hospitalar e as cepas de MSSA do ST-30 isoladas de infecções comunitárias.

Duas novas seqüências (*AroE* e *Tpi*) originárias de cepas com RFT-CAFBCAB, foram depositadas no banco de dados de MLST e no *Genbank* (acession number DQ279298 e DQ279299), caracterizando um novo clone, ST-643 (alelos 19-122-12-2-13-89-15). Todos os exemplares deste clone foram positivos para genes PVL e isolados de pacientes ambulatoriais, principalmente de secreção ocular e lesão cutânea, com casos que desenvolveram bacteremia. As cepas de MRSA do ST-643 apresentaram perfil não-MDR e as MSSA, MDS.

Em contraste com a heterogeneidade revelada por PFGE, os quatro RFT analisados que apresentaram amostras de MRSA e MSSA, apresentaram o mesmo ST. Um exemplo de edição, alinhamento e geração de uma seqüência consenso para posterior submissão ao banco de dados de MLST, com a finalidade de se obter o perfil alélico, é demonstrado na Figura 4.6.

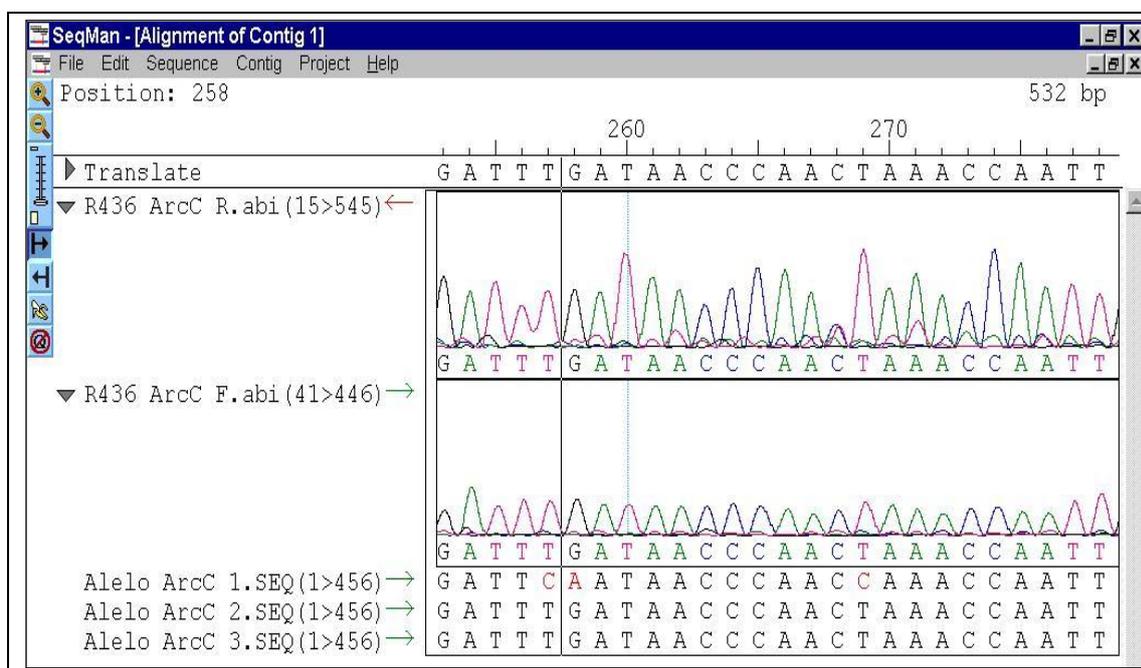


Figura 4.6: Eletroferograma editado, a partir do programa SeqMan, das seqüências nucleotídicas (5'-3' e 3'-5') do trecho 253-278 do gene *ArcC* (Carbamato quinase), obtido da cepa R436. Na linha superior (Translate), a seqüência consenso gerada, e nas três linhas inferiores, exemplos de alelos (1, 2 e 3) do gene *ArcC* utilizadas para alinhamento. Nas posições 258 (apontada com uma linha vertical), 259 e 269, sítios polimórficos do gene *ArcC*.

Tabela 4.4: Correlação entre características moleculares e fenotípicas dos isolados de *S. aureus* do Rio de Janeiro/RJ, em função do perfil alélico (RTF).

RFT	Sensibilidade à oxacilina	SSCmec	MLST		Pulsotipo (PFGE)	PVL Positivo (47)	Perfil de Resistência	Isolamento				
			(ST), Alelos	CC								
BAAACAC (40)	R (40)	IIIA (38)	239, 2-3-1-1-4-4-3 (5)	CC8	A (3)	(1)	MDR (3)	Hosp. (3)				
					A1 (1)	(0)	MDR (1)	Hosp. (1)				
					A2 (2)	(0)	MDR (2)	Hosp. (2)				
					A3 (1)	(0)	MDR (1)	Hosp. (1)				
					A5 (2)	(0)	MDR (2)	Hosp. (2)				
					A6 (1)	(0)	Não-MDR (1)	Hosp. (1)				
					A7 (3)	(1)	MDR (3)	Hosp. (3)				
					C (1)	(0)	MDR (1)	Hosp. (1)				
					M1 (1)	(0)	MDR (1)	Amb. (1)				
					I (1)	(1)	MDR (1)	Hosp. (1)				
					M (1)	(0)	MDR (1)	Hosp. (1)				
					-	(0)	MDR (1)	Hosp. (1)				
					AAACCAA (20)	R (5)	IVa (3)	5, 1-4-1-4-12-1-10 (1)	CC5	I3 (2)	(0)	Não-MDR (2)
I2 (1)	(0)	Não-MDR (1)	Hosp. (1)									
I (1)	(0)	Não-MDR (2)	Hosp. (2)									
S (15)	NA	5, 1-4-1-4-12-1-10 (4)	CC5	D (1)		(2)	Não-MDR (11)	Hosp. (4); Amb (7)				
				-		(1)	MDS (4)	Hosp. (4)				
				-		(0)	Não-MDR (2)	Hosp. (2)				
CAFBCAB* (15)	R (4)	IVa (4)	643 (New), 19-122-12-2-13-89-15 (2)	Sgt 643	H (2)	(4)	Não-MDR (4)	Amb. (4)				
					S (11)	NA	643 (New), 19-122-12-2-13-89-15 (3)	Sgt 643	I1 (2)	(10)	Não-MDR ³ (10), MDS (1)	Amb (11)
									I2 (1)	(1)	Não-MDR ⁵ (1)	Amb. (1)
AAAAAAA* (12)	R (1)	IV (1)	1, 1-1-1-1-1-1-1 (1)	CC1	I (1)	(0)	Não-MDR (1)	Amb. (1)				
					S (11)	NA	1, 1-1-1-1-1-1-1 (3)	CC1	A4 (1)	(4)	Não-MDR (9)	Hosp. (4); Amb (5)
-	(0)	MDS (2)	Hosp. (2)									
BBBBBAB (9)	R (2)	IVa (1)	30, 2-2-2-2-6-3-2 (1)	CC30/36	H2 (1)	(1)	Não-MDR ² (1)	Hosp. (1)				
					S (7)	NA	30, 2-2-2-2-6-3-2 (1)	CC30/36	H2 (1)	(1)	Não-MDR ² (1)	Hosp. (1)
	F (1)	(5)	Não-MDR (5)	Amb. (5)								
	-	(1)	MDS (1)	Amb. (1)								
ABDBCAB (9)	S (9)	NA	45, 10-14-8-6-10-3-2 (2)	CC45	F1 (1)	(0)	Não-MDR (6)	Amb. (6)				
					-	(1)	MDS (3)	Hosp. (2); Amb (1)				

Continuação da Tabela 4.4:

RFT	Sensibilidade à oxacilina	SSCmec	MLST		Pulsotipo (PFGE)	PVL Positivo (47)	Perfil de Resistência	Isolamento
			(ST), Alelos	CC				
BBBBAAB (7)	S (7)	NA	74, 2-2-2-19-6-3-2 (1)	CC30/36	B1 (1)	(4)	Não-MDR (4)	Hosp. (1); Amb (3)
			74, 2-2-2-19-6-3-2 (1)		-	(2)	MDS (2)	Hosp. (1); Amb (1)
ACAACAA (4)	S (4)	NA	14, 1-13-1-1-12-11-13 (2)	CC15	G (1)	(0)	Não-MDR (3)	Hosp. (2); Amb (1)
						(0)	MDS (2)	Hosp. (1)
AAAACBC (1)	R (1)	IVa (1)	25, 4-1-4-1-5-5-4 (1)	CC25	H1 (1)	(0)	Não-MDR ² (1)	Hosp. (1)
AAACCAC (3)	S (3)	NA	72, 1-4-1-8-4-4-3 (1)	CC8	G1 (1)	(0)	Não-MDR ⁴ (3)	Hosp. (1); Amb (2)
AAACCBC (1)	S (1)	NA	12, 1-3-1-8-11-5-11 (1)	CC12 ⁶	E (1)	(1)	MDS (1)	Hosp. (1)
CAAAABC (2)	R (1)	IVa (1)	97, 3-1-1-1-1-5-3 (1)	CC97	II (1)	(0)	Não-MDR (1)	Hosp. (1)
						(0)	MDS (1)	Hosp. (1)
CAAACAC (2)	S (2)	NA	8, 3-3-1-1-4-4-3 (1)	CC8	A1 (1)	(0)	Não-MDR (2)	Hosp. (2)
CAABCBB (1)	S (1)	NA	182, 18-18-6-2-13-15-18 (1)	Sgt 182	L (1)	(1)	Não-MDR (1)	Amb. (1)
CAACAAA (3)	S (3)	NA	188, 3-1-1-8-1-1-1 (1)	CC1	I3 (1)	(1)	MDS (1)	Hosp. (1)
						(1)	Não-MDR (1)	Hosp. (1)
Outros ^{1*} (10)	S (10)	NA	NR	-	J1 – L1	(3)	Não-MDR (9)	Amb. (5), Hosp. (4)
						(0)	MDS (1)	Hosp. (1)
							MDS (1)	Hosp. (1)

RFT: "Restriction Fragment Type"

ST: "Sequence Type"

CC: Complexos clonais, definidos por Fiel e colaboradores (2003), de acordo com a relação filogenética entre os STs, nomeados com o número do ST ancestral.

Sgt: Singleton, grupo não definido especificamente em um Complexo Clonal, sendo classificado como grupo simples ou singleton.

PVL: Leucocidina Pantón-Valentine

NA: Não aplicável / NR: Não realizado / NT: Não tipável / ND: Não definido

SLV: "single locus variant" (variante em um único locus)

* RFTs que incluem amostras de casos de infecção comunitária.

¹ Inclui RFT-CAACBAA (3 amostras), -CAACCAA (2 amostras), -AABBAAAB, -CAAAAAA, -CAAABAA, -CAACCAB e -CAFCBAA (1 amostra cada).

² Amostras de MRSA Não-MDR, resistentes somente a Oxacilina/ β -lactâmicos

³ Amostras de MSSA Não-MDR, resistentes somente a Eritromicina

⁴ Amostras de MSSA Não-MDR, resistentes somente a agentes β -lactâmicos

⁵ Amostra isolada de infecção urogenital

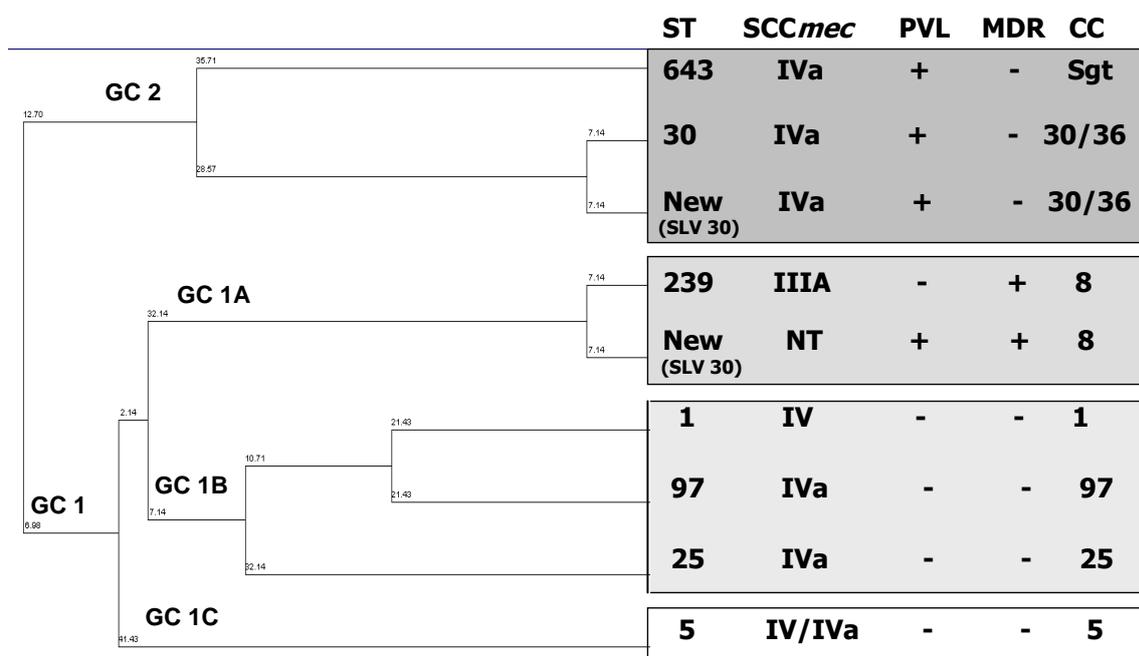
⁶ CC12 é considerado um grupo menor, alojado somente ST12 (ancestral) e ST-10.

3.3.6. Análise dos dados moleculares

Os resultados obtidos a partir do seqüenciamento por MLST das amostras de MRSA foram utilizados para análise, utilizando o algoritmo Burst (*Based Upon Related Sequence Type*), descrito especificamente para analisar dados de seqüências de MLST (Feil *et al.*, 2004). Foram analisados os nove STs que apresentaram cepas MRSA: ST-1, 5, 25, 30 (e um SLV 30), 97, 239 (e um SLV 239) e 643 (novo).

A combinação das abordagens MLST, tipagem do *SCCmec*, genes para PVL e perfil antimicrobiano, baseado no dendograma gerado através algoritmo e-Burst sob as seqüências nucleotídicas dos genes *house-keeping*, permitiu o agrupamento dos isolados em dois grupos clonais (GC) distintos, denominados GC1 e GC2 (Figura 4.7).

O primeiro grupo clonal (GC 1) pôde ser consistentemente dividido em três sub-grupos (GC 1A, 1B e 1C). O GC 1A corresponde a cepas nosocomiais BEC e é caracterizado pelo RFT-BAAACAC, ST-239, *SCCmec* IIIA, pulsotipo A, PVL-negativo e multirresistência antibiótica. Contudo, uma amostra deste grupo foi caracterizada como variante deste ST-239, apresentando presença para PVL e *SCCmec* não tipável, conforme citado no item anterior. Esse subgrupo apresentou cepas do CC8, conforme agrupamento proposto por Feil e colaboradores (2003).



GC- grupo clonal; CC- complexo clonal (definidos por Feil *et al.*, 2003); sgt- ST não agrupado em algum CC; ST- sequence type; SLV- “single locus variant” (variante de locus único); PVL- leucocidina Pantone-Valentine; MDR- multidroga resistente; NT- Não Tipável; ND- Não definido.

Figura 4.7: Dendrograma baseado nas seqüências nucleotídicas dos diferentes STs identificados em cepas MRSA do RFT-BAAACAC/ST-239 (clone BEC) e dos MRSA coletados na recente emergência de isolados não-multirresistentes no Rio de Janeiro/RJ, utilizando algoritmo Burst. Os dados de seqüenciamento por MLST confirmaram outras características genotípicas (*SCCmec* e genes para PVL) e fenotípicas, como perfil de sensibilidade antimicrobiana.

O GC 1B, também foi PVL-negativo, sendo caracterizado pela não-multirresistência e heterogeneidade por MLRFT, MLST (STs 1, 25 e 97) e PFGE. Os isolados agrupados no CG 1B foram coletados de infecções hospitalares e também comunitárias, caracterizando os primeiros isolados de MRSA associados à comunidade (CA-MRSA) no Rio de Janeiro/RJ. Esse subgrupo apresentou diversidade em relação à definição de complexos clonais (Feil *et al.*, 2003): CC1, CC25 e CC97.

O ST-5 foi incluído em um sub-grupo do GC1 (GC 1C), de acordo com o dendograma e pela sua associação com *SCCmec* IV ou IVa, sendo agrupado como ST ancestral do CC5 (Robinson & Enright, 2003).

O grupo clonal 2 (GC 2) mostrou cepas não-multirresistentes porém PVL-positivas, RFTs-CAFBCAB e -BBBBBAB, respectivamente ST-643 (novo) e ST-30/SLV 30 (CC30/36), portando *SCCmec* IVa. Essas são características de clones comunitários disseminados pelo mundo, porém foram detectadas em cepas de *S. aureus* Não-multirresistentes Oxacilina-Resistentes (NORSA), isoladas de hospitais. No entanto, o ST-30 foi encontrado no GC 2 e deveria ser considerado de fonte hospitalar, uma cepa com esse ST foi isolada de infecção comunitária.

4 DISCUSSÃO

A disseminação emergente de novos clones de MRSA, carreando *SCCmec* curtos e genes codificantes para PVL, em ambientes hospitalares e comunitárias é uma realidade mundial (Deresinski, 2005). Antes deste estudo, apenas um clone de MRSA associado às infecções havia sido amplamente caracterizado por métodos moleculares no Brasil (clone BEC), encontrando-se disseminado em todo país (Teixeira *et al.*, 1995).

A maioria das cepas de MRSA identificadas, 39 (72,2%) dos 54 MRSA, foram associadas principalmente à co-resistência a outros antibióticos não β -lactâmicos, conseqüentemente, cepas de MRSA resistentes à várias drogas (MDR), semelhantes às cepas BEC. Estas se encontravam disseminadas principalmente em ambientes hospitalares.

Apesar de infecções causadas pela cepa BEC ainda serem as predominantes no Brasil, como observado neste estudo e identificado por Teixeira e colaboradores (1995), foram detectadas infecções por clones de MRSA com perfis fenotípicos e moleculares diferentes do BEC.

A principal característica fenotípica das cepas de MRSA não-BEC é a sensibilidade múltipla a antibióticos não β -lactâmicos e resistência heterogênea à oxacilina, apresentando baixos níveis inibitórios mínimos (MRSA Não-MDR) (Figueredo *et al.*, 1991; Okuma *et al.*, 2002). Como provavelmente em alguns hospitais incluídos neste estudo, cepas como as descritas acima não haviam sido identificadas, pode-se evidenciar uma caracterização dúbia do real perfil de sensibilidade antimicrobiana à oxacilina.

Os isolados de *S. aureus* analisados neste estudo foram caracterizados somente como sensíveis (S), intermediários (I) e resistentes (R), sem a definição da concentração inibitória mínima (CIM) específica para cada cepa. Isso impediu uma discussão aprofundada sobre o fenômeno de resistência heterogênea, contudo, é provável que cepas de MRSA não-MDR deste estudo apresentem CIM mais baixo que as cepas de MRSA MDR (BEC).

Uma cepa identificada em um hospital do Rio de Janeiro/RJ, caracterizada somente por PFGE, denominada como GenS-MRSA (MRSA sensível à gentamicina) semelhante ao antes denominado clone NY/Japonês, também apresentou essa característica de identificação limítrofe de resistência à oxacilina pelo laboratório clínico responsável pelo isolamento (Melo *et al.*, 2004).

Em uma população bacteriana heterogênea, apesar de todas as células bacterianas serem portadoras dos determinantes genéticos de resistência à metilina, o fenótipo de resistência se manifesta apenas em uma pequena fração dessa população. A proporção da população que é resistente à altas concentrações de metilina é uma característica específica de cada amostra .

Isso pode ser considerado como um *fitness* econômico populacional, na qual uma fração da população dispende energia na expressão de genes de resistência que protegem toda a população heterogênea.

Portanto, recomenda-se que a definição específica da CIM à oxacilina deva ser realmente uma prática de rotina em laboratório clínicos do Brasil, devido à emergência de cepas de MRSA com perfil diferente da cepa BEC, minimizando equívocos na identificação de resistência e posteriores problemas na escolha terapêutica.

A estrutura populacional de bactérias clinicamente relevantes é um importante tópico epidemiológico, especialmente em casos que há envolvimento de mecanismos de virulência e de determinantes de resistência antibiótica (Martinez & Baquero, 2002). Se apenas um ou poucos clones estão envolvidos em infecção severa e resistência antibiótica, os esforços devem ser concentrados nesses clones. Adicionalmente, as estratégias preventivas podem ser delimitadas com maior facilidade se a prevalência e disseminação dos clones envolvidos com doenças severas são conhecidos (Foxman & Riley, 2001). Uma análise mais abrangente da infecção deve envolver o estudo de populações bacterianas com perspectivas ecológicas e evolutivas. Todas essas análises necessitam da utilização de ferramentas moleculares para determinar estrutura e evolução de patógenos bacterianos (Martinez & Baquero, 2002).

Portanto, no presente estudo, adicionalmente à pesquisa de fatores pontuais de virulência e resistência, três abordagens que analisam o *background* genético de espécies bacterianas foram utilizadas: MLRFT, MLST e PFGE. A análise de isolados de *S. aureus* por perfil de restrição de genes constitutivos (MLRFT) foi eleita como principal abordagem para definição dos grupos clonais, por ser uma metodologia relativamente simples, não necessitando de suplementos técnicos avançados e pela possibilidade de esclarecer questões epidemiológicas e evolutivas das cepas (Diep *et al.*, 2003). MLST e PGFE permitem uma avaliação mais refinada, com objetivos relativamente intrínsecos (Enright *et al.*, 2000). Os dados obtidos pelo sequenciamento de genes constitutivos (MLST) permitem análises evolutivas e populacionais com alto poder discriminatório, designando clones ancestrais e definindo a relação genética entre as cepas, além de permitir a análise de disseminação mundial de clones e determinação da característica de uma cepa emergente em um país, porém endêmica em outra região (Enright *et al.*, 2000). O perfil de restrição cromossômico analisado por PFGE permite particularmente a identificação e monitoramento de cepas de *S. aureus* envolvidas em surtos epidêmicos localizados, e a relação das cepas em ambientes restritos, caracterizando-as como epidemiologicamente relacionadas ou não, além de permitir a análise de transmissão cruzada entre hospitais geograficamente relacionados (Tenover *et al.*, 1995; Diep *et al.*, 2003).

Multilocus Sequence Typing, apesar dos bons resultados, é uma metodologia relativamente recente (Enright, 2000), por isso as duas abordagens têm sido utilizadas comparativamente para os ambos propósitos para estudar amostras de *S. aureus* de todo o mundo. PFGE era a única abordagem disponível até 2000 com bom poder discriminatório (Schartz & Cantor, 1984; Tenover *et al.*, 1995) e o real poder discriminatório de MLST ainda se mantém em discussão devido a resultados variáveis em diferentes estudos (Revazinshvili *et al.*, 2004).

Comparando-se as 37 amostras selecionadas para sequenciamento por MLST, as quais geraram 17 STs a partir do 15 RFTs analisados, pode se concluir que MLRFT capturou 88,2% da diversidade genética detectada por MLST nas amostras selecionadas. Esse índice pode ser considerado elevado, pois em um estudo de Diep e colaboradores (2003), analisando 155 isolados de *S. aureus*, demonstrou-se que MLRFT detectou apenas 60,2 % da diversidade caracterizada por MLST (32 RFTs *versus* 53 STs).

Em relação às mesmas 37 amostras analisadas por MLST, o PFGE detectou 25 diferentes pulstipos, oito genótipos a mais do que os fornecidos por MLST. Contudo, dependendo da estringência utilizada para definição de cepa epidemiologicamente relacionada, conforme Tenover e colaboradores (1995), que consideram como sendo do mesmo genótipo cepas com até seis bandas de diferença, desconsiderando um único evento genético que geraria duas ou três bandas diferenciais. Desse modo, PFGE caracterizaria então apenas 12 diferentes grupos/genótipos na amostragem deste estudo, capturando 70,6% da diversidade genética detectada pelo sequenciamento de genes constitutivos (MLST). Portanto, pelo estudo, observa-se que PFGE ainda apresenta uma característica peculiar de análise subjetiva, não sendo viável para estudos de populações inter-regionais, porém é um excelente métodos para estudos de surtos.

Outros estudos comparativos entre MLST e PFGE não apontaram diferenças entre perfis por PFGE com o ST relacionado. Em 144 amostras de *S. aureus* foram identificados 21 STs e 21 pulstipos relacionados (Peacock *et at.*, 2002). Grundmann e colaboradores (2002) encontraram números aproximados, porém utilizaram metodologias moleculares suplementares para correlação com os dados de PFGE e MLST, adicionando dados fenotípicos e epidemiológicos para agrupamento. Este estudo definiu que as abordagens de tipagem molecular em geral alcançam um alto grau de concordância, porém somente MLST permite definir grupos clonais sem ambiguidade, correlacionando fatores adicionais, genotípicos ou fenotípicos. PFGE, RAPD e fagotipagem apresentaram concordância filogenética com dados de MLST, mas com acurácia muito variável (Grundmann *et al.*, 2002). Isso foi confirmado pela análise dos dendogramas obtidos por dados de PFGE (Figura 4.5) e por MLST (Figura 4.7)

sobre as amostras de *S. aureus* deste estudo. O agrupamento por MLST correlacionou com fatores adicionais como presença de genes PVL, SCC*mec*s específicos e perfil de susceptibilidade antimicrobiana, o que não foi verificado no dendograma de agrupamento por dados de PFGE.

Inesperadamente, quatro amostras de MRSA que tiveram perfis de RFT e ST iguais e portanto poderiam ser consideradas como relacionadas, apresentando como única diferença a presença do cassete *mec*, mostraram pela análise por PFGE, perfis diferentes. Dois RFTs apresentaram cepas de MRSA e MSSA relacionadas, com cerca de 80% de similaridade, mesmo em diferentes pulsotipos: RFT-CAFBCAB, com os pulsotipos H e I2, respectivamente para MRSA e MSSA; RFT-BBBBBBAB, com os pulsotipos H2 e F. Contudo, essas duas amostras de MRSA foram mais relacionadas entre si do que propriamente entre seus MSSA precursores. Esta heterogeneidade apresentada por PFGE entre amostras de mesmo RFT/ST mas com diferenças entre cepas MRSA e MSSA pode ser devido à integração genômica do cassete *mec* nas amostras de MSSA gerando isolados MRSA. Algumas seqüências nucleotídicas do SCC*mec* IVa apresentam o sítio 5'-CCCGGG-3' de restrição específico para *Sma*I (www.ncbi.nlm.nih.org/GENBANK), o que diferencia as amostras. Contudo, não se pode ignorar a hipótese de terem evoluído separadamente, em um longo período de tempo, apresentando eventos genéticos adicionais, não relacionados simplesmente com a aquisição do cassete SCC*mec*.

De acordo com o rastreamento molecular realizado por MLRFT, 22 diferentes RFTs ou genótipos de *S. aureus* foram detectados dentre as 139 amostras de *S. aureus*. Dos 54 isolados de MRSA, 74,3% (34) foram amostras multidroga resistentes (MRSA MDR) hospitalares.

A análise da estrutura do SCC*mec* presente nas 54 cepas MRSA revelou que 70,4% dos MRSA foram IIIA, e 26,3% foram IV (sem subclassificação ou caracterizados como do subtipo IVa). Portanto, somente 3,2 % das amostras (3) não foram tipáveis pela abordagem utilizada, mesmo tendo positividade para gene *mecA*. Isso nos leva a definir que para estudos epidemiológicos no Brasil, principalmente no Rio de Janeiro, esta abordagem deveria ser revista. Sugerimos neste estudo que não há a necessidade da utilização de iniciadores específicos para os tipos I, IA, II e III rotineiramente. Contudo, existe a necessidade da inclusão de iniciadores específicos para o tipo IIIB, pois clones ST-239 na Europa apresentaram variação do SCC*mec* III. Ressalta-se que a cepa BEC apresenta SCC*mec* IIIA e pertence ao mesmo ST (239) da cepa européia (Aires *et al.*, 2001). Para ser mais precisos e considerando-se a atualidade dos dados de vigilância molecular de *S. aureus* resistentes, deve-se incluir iniciadores que tenham como alvo as seqüências dos recentemente descritos SCC*mec* IVc e V, respectivamente no Uruguai (Ma *et al.*, 2005) e na Austrália e Taipei (Ito *et al.*, 2004).

Possivelmente, as amostras não tipáveis de *SCCmec* são pertencentes a um desses dois tipos, especialmente ao IVc, pela proximidade geográfica e por estarem presentes em amostras de MRSA não-MDR. Contudo, existe a possibilidade destes isolados portarem novos cassetes ainda não descritos, havendo a necessidade de análises futuras. Doze nove variantes do *SCCmec* IV (IVe e IVf) foram recentemente descritos na Irlanda (Shore *et al.*, 2005) e um variante do *SCCmec* V em cepas de CA-MRSA multirresistentes foi identificado em Taiwan (*SCCmec* V_T) (Boyle-Vavra *et al.*, 2005).

As cepas MRSA com *SCCmec* IIIA, apresentaram-se como MDR, com o perfil genotípico (RFT) prevalente por MLRFT: RFT-BAAACAC (Tabela 4.4). O perfil completo desse clone, de acordo com todas as metodologias moleculares utilizadas (associando MLRFT / MLST / Tipagem de *SCCmec* / PFGE / Pesquisa de genes PVL), foi definido por: RFT-BAAACAC/ST-239/*SCCmec*-IIIA/pulsotipo-A/PVL-negativo. Com relação a PVL, apenas uma cepa diferenciou-se do grupo por se apresentar positiva para os genes *lukF/lukS* (*locus* PVL).

Essa cepa distinta passa a ter importância quando se considera o potencial de disseminação do fago ϕ PVL, carreador desses genes para leucocidina Panton-Valentine (Deresisnsky, 2005), para cepas de MRSA MDR que estão atualmente associadas de forma pouco frequente a genes PVL (Weber, 2005). Adicionalmente, essa distinção passa a ser preocupante quando cepas de MRSA endêmica em hospitais brasileiros (BEC), já multirresistentes, passam a ter a possibilidade de se tornar mais virulenta pela aquisição do fago ϕ PVL ou de outros fatores relacionados com invasão tecidual e evasão do sistema imune. Esta possibilidade se torna realidade quando exceções, como a descrita acima, passam a se evidenciar e se tornam predominantes.

Portanto, esse genótipo frequente de *S. aureus* evidenciado neste estudo pode ser analogamente associado à cepa BEC por PFGE e pelo perfil multirresistente. Adicionalmente, MLST confirmou que este clone brasileiro, isolado no Rio de Janeiro, também está incluído no ST-239 como observado em estudos que analisaram amostras BEC isoladas de outras regiões do Brasil, como os Estados de São Paulo e Paraíba, além dos isolados do clone BEC na Europa (Aires *et al.*, 2001).

Duas amostras pertencentes ao RFT-BAAACAC apresentaram cassetes *SCCmec* não tipáveis (Tabela 4.4), sendo que uma delas apresentou-se como variante de *locus* único (“single *locus* variant”, SLV) do ST-239, caracterizando um novo perfil alélico ou ST, associado à apresentação de outro fator genotípico diferencial ale do *SCCmec* atípico: foi PVL-positiva.

Portanto, uma recombinação pontual em um único gene constitutivo pode corroborar alterações no genoma bacteriano como a integração de genes associados à virulência e/ou

associação de diferentes *SCCmec*. Esse fenômeno abre a possibilidade de emergência e evolução de uma nova linhagem clonal a partir do ST-239. Esse novo clone se caracterizaria por ser PVL-positivo e por possuir um novo cassete de resistência à meticilina (a ser identificado oportunamente), como ocorrido com outros genótipos, como o exemplo do MSSA ST-8, o qual é ancestral do próprio MRSA ST-239 (Enright, 2003).

O perfil de PFGE desta cepa com *SCCmec* não tipável foi designado como pulsotipo I, com duas bandas de diferença do perfil clonal do genótipo. A evidenciação de bandas extras no PFGE pode representar um simples evento genético recombinatório sendo que não necessariamente o fenômeno que se observe por MLST (Tenover *et al.*, 1995). Essas sutis alterações genóticas não foram detectadas por MLRFT, contudo MLST e PFGE foram sensíveis para a caracterizar a variabilidade pontual.

Outro fator preocupante em relação a este grupo clonal (MRSA MDR hospitalar, ST-239) foi o isolamento em um paciente de ambiente ambulatorial (Tabela 4.4). Isso pode significar que o paciente teve alta hospitalar, assintomático, após ter sido colonizado com cepas nosocomiais MDR. Deve-se considerar também o fator de risco relacionado com o uso freqüente e às vezes inadequado de antibióticos, que pode ter promovido posterior colonização e/ou infecção por bactérias MDR, ao qual competiram eficientemente com a microbiota endógena do paciente (Martínez & Baquero, 2002). Esforços devem ser direcionados para o controle do uso adequado destes agentes, principalmente em relação a pacientes internados, normalmente imunocomprometidos, apesar da sua utilização ser inevitável em casos, por exemplo, de pacientes em leito acometidos por infecções bacterianas severas (Filho *et al.*, 1997).

Essa cepa não foi considerada como de infecção comunitária, de acordo com os fatores de risco expostos no item 4.1, porém pode vir a se tornar uma cepa disseminada em ambiente doméstico pela circulação do paciente colonizado por cepa de MRSA MDR.

Seis diferentes perfis de MRSA não-cepas BEC foram caracterizados por MLRFT: RFT-AAACCAA, -CAFBCAB, -AAAAAAA, -BBBBBAB, -AAAACBC e -CAAABC. Em seguida, esses RFT geraram sete STs relacionados que foram associados a seu tipo de *SCCmec* específico: ST-5/*SCCmec*-IV (3) ou IVa (2); ST-643/*SCCmec*-IVa (4), um novo ST; ST-1/*SCCmec*-IV (1), ST-30/*SCCmec*-IVa (1) e um SLV 30/*SCCmec*-IVa (1), ST-25/*SCCmec*-IVa (1) e ST-97/*SCCmec*-IVa (1). Portanto, nenhum desses genótipos apresentou qualquer outro cassete com mais de 25 kb (tipo I, II, III ou IIIA), característicos de cepas hospitalares multirresistentes (Weber, 2005). Todos esses genótipos apresentaram perfil Não-MDR, característicos de cepas de CA-MRSA ou NORSA hospitalares, recentemente descritos. Seis (42,9%) dessas 14 amostras não-MDR foram isoladas ambulatorialmente, e quatro dessas seis

apresentaram padrões de infecção comunitária por MRSA. Adicionalmente, 42,9% (6) das 14 amostras com os perfis acima mencionados foram positivas para genes PVL, outro marcador genético de possível cepa CA-MRSA (Vandenesch *et al.*, 2003; Weber, 2005).

Avaliando perfil de resistência e *background* genético dessas cepas, verificamos a evidência de compartilhamento dos clones emergentes em comunidade e hospitais no Rio de Janeiro/RJ, como nos casos do ST-643 e ST-30.

O ST-1, pertencente ao complexo clonal 1 (CC1), é um dos clones de CA-MRSA disseminados no mundo, principalmente EUA e Austrália (Okuma *et al.*, 2002). Neste estudo de Okuma e colaboradores (2002), nenhuma amostra do CC1 foi encontrada causando infecções hospitalares, contudo, no presente estudo, o isolado com perfil ST-1 foi definido como de origem nosocomial. Em contrapartida, quatro amostras de MSSA deste ST foram isoladas de infecções hospitalares, como observado endemicamente em hospitais da Inglaterra, Holanda e Canadá (Robinson & Enright, 2003), enquanto cinco MSSA foram amostras identificadas ambulatorialmente (Tabela 4.4). Poucas diferenças entre os genomas de MRSA e MSSA deste ST-1 foram identificadas após sequenciamento nucleotídico, se limitando a presença e ausência, respectivamente, do elemento *SCCmec* tipo IV (Ito *et al.*, 2003), conforme dados genotípicos das amostras do Rio de Janeiro/RJ. Portanto, a simples aquisição do elemento *mec* por uma cepa MSSA comunitária de ST-1 poderia desencadear surtos epidêmicos de CA-MRSA no Brasil. Por essa razão, estudos de vigilância molecular são importantes para o controle de rotas de disseminação entre cepas comunitárias e hospitalares.

A emergência de cepas de MRSA distribuídas e disseminadas mundialmente, como as pertencentes ao ST-1, levanta a seguinte questão: (i) essas cepas sofreram realmente disseminação mundial a partir de uma localidade de origem, sendo facilitada pelo progressivo aumento de viagens internacionais ou (ii) estamos testemunhando um esquema de evolução multilocal com os mesmos eventos recombinacionais em diferentes partes do mundo, devido à pressão antibiótica seletiva ser a mesma, uma vez que as recomendações de prescrição são reconhecidas mundialmente (Witte, 2004).

Outro importante complexo clonal de MRSA não-MDR relacionado com infecção comunitária e hospitalar é o CC30/36, representados neste estudo pelo STs 30 e uma cepa SLV 30. Amostras deste ST-30 foram primeiramente identificados na Austrália, em populações arborígenas sem contato com recursos hospitalares, quando se designou este ST como clone da Costa Oeste do Pacífico, sempre associadas à presença da leucocidina Panton-Valentine (Vandenesch *et al.*, 2003). Recentemente, esse clone, carregando *SCCmec* IVc, foi detectado em surtos epidêmicos de grande intensidade de infecções comunitárias por MRSA associadas a casos fatais no Uruguai (Ma *et al.*, 2005).

Dentre esses novos clones não-MDR identificados no Rio de Janeiro, a emergência do ST-5 é a mais preocupante. Este clone foi o primeiro MRSA relacionado com resistência intermediária à vancomicina (VISA) no mundo, isolada no Japão (Hiramatsu *et al.*, 1997), e no ano seguinte, foi o clone identificado como totalmente resistente à vancomicina (VRSA) nos EUA (Smith *et al.*, 1999). Adicionalmente, o ST-5 apresentou extrema facilidade de se adaptar a qualquer um dos quatro tipos de SCC*mec*s: I e II (designando o clone conhecido anteriormente como NY/Japonês, do qual emergiu a resistência a glicopeptídeos), III (caracterizando o antigo clone pediátrico) e IV (quando o ST-5 esteve relacionado com infecções comunitárias nos EUA) (Enright, 2003). Deve-se ressaltar que o uso extensivo de vancomicina no Estado de São Paulo favoreceu o surgimento de cepas de MRSA com resistência intermediária à vancomicina (Oliveira *et al.*, 2001a), situação analisada prospectivamente por pesquisadores locais (Oliveira *et al.*, 2000). A utilização de vancomicina como primeira escolha, de forma empírica, para tratamento de infecções por MRSA será discutido posteriormente. Esta questão que deve ser analisada pela possibilidade de emergência futura aos glicopeptídeos no Rio de Janeiro/RJ.

Um clone de MRSA Não-MDR, tipado como ST-25 pertencente ao CC25, teve como único representante a cepa de MRSA R283. Duas amostras genotipicamente iguais foram isoladas do mesmo paciente em tempos distintos. Inicialmente se tratava de colonização nasal e posteriormente foi responsável por óbito por sepse/bacteremia do paciente de 50 anos com insuficiência renal aguda. Esse caso reflete outros estudos onde o número de casos de bacteremia por MRSA Não-MDR tem aumentado progressivamente (Ferguson *et al.*, 2005; Trindade *et al.*, 2005). Estudos mais detalhados sobre a etiologia de sepses, infecções cutâneas e de tecidos moles, quadros mais comumente causados por MRSA não-MDR, devem ser realizados sob amostras do Rio de Janeiro, caracterizando de forma apropriada os seus perfis fenotípicos para facilitar a decisão empírica de tratamento para infecções estafilocócicas.

O único clone de MRSA não descrito no banco de dados de MLST, que também incluem isolados de MSSA, foi caracterizado neste estudo como ST-643, do qual seqüências relacionadas foram depositadas no banco de dados de MLST e no *Genbank*. Os exemplares MRSA deste ST foram não-MDR com SCC*mec* tipo IVa, sendo todos PVL-positivos, incluindo as amostras de MSSA (Tabela 4.4). Essa cepa apresentou dois *locus* variantes (DLV) em relação ao ST-59, um clone PVL-positivo recentemente identificado em pacientes ambulatoriais e em presidiários da cidade de São Francisco, Califórnia, sendo caracterizadas como MRSA não-MDR (EUA) (Carleton *et al.*, 2004).

De forma semelhante, isolados do ST-59 foram também evidenciados em Taipei, Taiwan em pacientes pediátricos com infecções comunitárias e hospitalares. As cepas de

MRSA do ST-59 de Taiwan apresentaram resistência à mais de 4 antibióticos não β -lactâmicos, caracterizando o único clone comunitário de MRSA MDR (Boyle-Vavra *et al.*, 2005).

Esse fato levanta as seguintes questões:

- (i) definitivamente está ocorrendo uma larga distribuição de clones comunitários MRSA não-MDR com cassetes *mec* pequenos;
- (ii) a presença destes cassetes *mec* menores facilitam a transmissão do determinante *mec* de resistência à meticilina para cepas MSSA;
- (iii) estes isolados acabam por atingir ambientes hospitalares como MRSA não-MDR aonde a antibioticoterapia é disseminada, aumentando a frequência de resistência à meticilina, favorecendo a seleção hospitalar de cepas MDR com maior capacidade de transmissão comunitária;
- (iv) em conseqüência temos o aparecimento emergente de cepas MRSA MDR com limitadas opções terapêuticas;
- (v) e por fim, estes isolados cursam como PVL-positivas com maior potencial invasivo e de evasão do sistema imune aumentando a morbidade dos quadros infecciosos.

Todas as amostras deste novo clone (ST-643) foram isoladas ambulatorialmente, de ICTM (principalmente de secreção ocular e lesão cutânea), com alguns casos que evoluíram para bacteremia, e apresentaram 100 % de positividade para os genes PVL, como o seu DLV relacionado, o ST-59 (Carleton *et al.*, 2004; Boyle-Vavra *et al.*, 2005).

Uma amostra de MRSA não-MDR exemplar deste ST foi coletada de um hospital, isolada de secreção ocular com evolução para sepse/bacteremia, em um paciente que é constantemente submetido à hemodiálise devido à insuficiência renal crônica. Este paciente, um jovem adulto do sexo masculino, foi tratado com vancomicina após a identificação ocular de MRSA, conforme sugestão da NCCLS (2000). Por ser não-MDR outras opções terapêuticas menos agressivas poderiam ser recomendadas ao invés da vancomicina.

Esses fatos levantam a questão da implicação da terapia empírica em casos de infecção cutânea e de tecidos moles (ICTMs) identificadas em pacientes sem possíveis fatores de risco para aquisição de MRSA caracteristicamente hospitalar, portanto MDRs. Estudos demonstram que a proporção de casos de ICTM causados por MRSA não-MDR, comunitários ou nosocomiais, tem aumentado significativamente (Moran *et al.*, 2005). A maioria dos casos, principalmente em ambientes hospitalares, é tratada com oxacilina, vancomicina ou cefalexina. Em áreas com freqüente prevalência MRSA não-MDR, o tratamento empírico com clindamicina, rifampicina ou trimetoprima/sulfametoxazol são perfeitamente apropriados (Moran *et al.*, 2005).

Apesar de termos identificado algumas amostras de MRSA isoladas ambulatorialmente, não se pode excluir a hipótese que a sua origem seja eventualmente hospitalar. Atribuímos fatores de riscos para minimizar possíveis equívocos. Mesmo assim encontramos quatro cepas de MRSA provenientes da comunidade com a presença de pequenos *SCCmecs* (IV ou IVa), não-MDR e genes para PVL, associados a casos de infecção cutânea e de tecidos moles. Pode-se caracterizar estas amostras como os primeiros isolados de CA-MRSA do sudeste brasileiro.

Os únicos isolados de CA-MRSA identificadas no Brasil foram no estado do Rio Grande do Sul, onde três casos isolados foram devidamente estudados (Ribeiro *et al.*, 2005).

A correlação dos nossos resultados com outros estudos moleculares de *S. aureus* no Rio de Janeiro/RJ fica dificultada pela análise somente por PFGE e por restrição do gene *mecA* nos estudos prévios, sem a identificação de grupos clonais por MLST.

Um estudo envolvendo um hospital maternidade privado do Rio de Janeiro revelou que 48,7% dos recém-nascidos que necessitaram de internação eram portadores assintomáticos de MRSA MDR (colonização nasal) (Loureiro *et al.*, 2000). Estes isolados foram analisados molecularmente, identificando 14% das cepas com diferentes perfis de PFGE circulantes no hospital, distintos do clone BEC. Outros estudos também desenvolvidos no Rio de Janeiro também relataram a ocorrência de poucas amostras (entre 6 e 23%) apresentando genótipos de PFGE não relacionados ao BEC, mesmo apresentando-se como MRSA MDR (Teixeira *et al.*, 1995; Santos *et al.*, 1999). Contudo, as amostras analisadas nesses estudos não foram caracterizadas por MLST, impossibilitando a determinação do clone ou grupo clonal ao qual pertenceriam. Sendo assim, não é possível determinar se amostras de MRSA emergentes atualmente já circulavam quando esses estudos prévios foram realizados, ou se seriam variações genotípicas da cepa BEC.

A predominância de mais de doze anos de amostras de MRSA pertencentes ao clone BEC (MRSA MDR) em todo o território nacional, inclusive no Rio de Janeiro (Teixeira *et al.*, 1995; Aires *et al.*, 2001), parece estar sendo ameaçada em função da emergência de MRSA não-MDR.

Esse tipo de substituição de clones previamente predominantes vem ocorrendo em outras localidades no mundo, como na Alemanha (Wisplinghoff *et al.*, 2005), Polônia (Krzyszton-Russjan *et al.*, 2005) e Suíça (Berglund *et al.*, 2005), evidenciando ser um outro fenômeno evolutivo com característica pandêmica.

Em relação aos isolados de MSSA, observamos que estão disseminados principalmente em infecções comunitárias com perfil de múltipla sensibilidade antibiótica, devido à ausência de pressão seletiva de antibióticos. Cinco RFTs com amostras de MSSA foram analisados quando comentado sobre os clones de MRSA com mesmo RFT. Contudo, foram identificados

15 RFTs que apresentaram somente isolados de MSSA (Tabela 4.4). Esse número tende a diminuir com a emergência de *SCCmecs* de fácil transmitibilidade, descritos no Rio de Janeiro/RJ.

Das 85 amostras de MSSA, 48 % (38) foram positivas para genes PVL, um número preocupante pois foi observada uma migração de cepas hospitalares para a comunidade e vice-versa, facilitando a introdução da leucocidina PVL em hospitais.

Para uma completa caracterização de um clone de *S. aureus* envolvido com doenças e epidemias/endemias, principalmente de cepas MRSA, outras abordagens moleculares que analisem não somente o *background* genético da cepa, mas a presença e estrutura de elementos genéticos específicos relacionados à virulência devem também ser implementadas (Lina *et al.*, 1999). Através de uma simples reação de PCR, possibilita-se a detecção de genes codificadores da leucocidina PVL, por exemplo, uma toxina relacionada com destruição leucocitária e necrose tecidual, associada principalmente a infecções do tipo ICTM e pneumonias severas (Etienne, 2005).

Deve-se considerar que 33,8% das 139 amostras analisadas neste estudo apresentaram positividade para genes da PVL, semelhante à Califórnia, EUA (33,5% de 671 amostras) (Diep *et al.*, 2004), números considerados altos se comparado com levantamentos realizados em outros países, como Suíça, (2% PVL-positivas) (Berglund *et al.*, 2005), França (0,4 – 1,0%) (Robert J *et al.*, 2005) e Alemanha (0,5 % de PVL-positivas) (Witte *et al.*, 2004).

Em concordância com os resultados moleculares gerados neste estudo e a correlação fenotípica, considerando-se também índices mundiais relacionados aos estudos populacionais de *S. aureus*, propomos um esquema de tipagem adequado para assistência contínua do sistema de vigilância regional de *S. aureus*, para avaliações de surtos epidêmicos e apropriada prescrição de antibioticoterapia, customizado para as condições regionais do Estado:

- Definição do perfil de sensibilidade antimicrobiana em todos os isolados de *S. aureus*, com a determinação específica da CIM;
- Detecção molecular do gene *mecA* em todos os isolados;
- Detecção molecular de genes codificadores de PVL em todos isolados;
- Tipagem de *SCCmec* em todos os isolados de MRSA;
- MLRFT, sob isolados de *S. aureus* consecutivos de períodos determinados no ano;
- MLST, sob amostras representativas de cada um desses RFTs, com associação de fatores genotípicos e fenotípicos para seleção;
- PFGE deve ser realizado prontamente em estudos de surtos epidêmicos, em associação com as abordagens citadas.

Este estudo fornece uma base de dados informativa para auxílio de estudos consecutivos de investigação epidêmica de infecções estafilocócicas no Rio de Janeiro/RJ, revelando, portanto, novas informações sobre clonalidade e emergência de cepas de *S. aureus* no Estado, possibilitando a condução do esquema de tipagem proposto extensivo a outras regiões no país.

Considerando a atual necessidade de uma acurada vigilância epidemiológica sobre as infecções estafilocócicas no Estado, propomos ainda a criação de um banco de dados *in silico*, com disponibilidade pública, para o depósito das informações provenientes das metodologias citadas no esquema acima.

O sistema de vigilância nacional sobre infecções hospitalares ainda é frágil. As tendências progressivas das infecções estafilocócicas e as principais características dos isolados de *S. aureus* envolvidos, como perfil de sensibilidade antimicrobiana e padrão genético-molecular, deveriam ser informados à população médico-científica através de sistemas de vigilância setoriais (Bax *et al.*, 2001). Complementarmente, para a garantia de um sistema eficiente de vigilância, as notificações ao sistema gerador deveriam ser prática comum entre os profissionais de saúde.

A vigilância epidemiológica de *S. aureus* tem como objetivos primordiais o reconhecimento de surtos epidêmicos, monitoramento de métodos bem-sucedidos de controles de infecções e, ultimamente, visa reduzir o número de casos por MRSA e indiretamente, minimizar o seu custo inerente (Bax *et al.*, 2001).

A análise desses relatos é geralmente dificultada pelas diferenças ou ausência de denominadores comuns. Em alguns países desenvolvidos, todos os dados referentes a infecções hospitalares causadas por *S. aureus* são notificados aos sistemas de vigilância nacionais, enfatizando principalmente casos de infecções por MRSA. Nos EUA, o CDC abriga um programa de vigilância sobre infecções nosocomiais chamado NNISS (*Nacional Nosocomial Infections Surveillance System*), baseado na participação voluntária de 315 hospitais (www.cdc.gov/incidod/hip/surveil/nnis). Na Finlândia, o monitoramento das infecções estafilocócicas envolve a coleta de todas as amostras do país (Salmenlinna & Vuopio-Varkila, 2001).

Existem sistemas de vigilâncias internacionais autônomos, como o SENTRY (Diekema *et al.*, 2000), que buscam monitorar os patógenos predominantes, incluindo *S. aureus*, e seus perfis de resistência em infecções dos países. Contudo, a coleta de informações é feita de maneira aleatória, tendo um caráter amostral, normalmente gerando lacunas entre as análises.

No Brasil, a Lei nº 9.431, de 6 de janeiro de 1997 (Brasil, 1997), dispõe sobre a obrigatoriedade da manutenção de programa de controle de infecções hospitalares pelos hospitais do país, porém não oferece condições totais para a efetividade deste controle. Dados

sobre vigilância não são coletados constitutivamente, não existindo a disponibilidade de informações sobre infecções hospitalares.

Os laboratórios de microbiologia associados à hospitais possivelmente emitem relatórios diários de cultura e antibiograma à CCIH, na qual tem a oportunidade de analisar os perfis de susceptibilidade antimicrobiana. Essa informação fenotípica pode ser insuficiente para o desenho de medidas eficientes para o controle de surtos epidêmicos. Portanto, a análise molecular das amostras se faz necessário (Foxman & Riley, 2001).

Em resumo, este é o primeiro estudo que avalia a estrutura molecular de uma forma ampliada de amostras de MSSA do Brasil e revela a emergência de novas cepas de MRSA no Rio de Janeiro/RJ.

6 CONCLUSÕES

- Vinte de dois genótipos (RFTs) foram identificados entre os isolados de *S. aureus* estudados. Dois RFTs apresentaram somente isolados de MRSA sendo que em um deles se encontrou alocado o RFT mais prevalente (BAAACAC – 28,8%). Este clone apresentou padrão de PFGE (pulsotipo A) igual ao clone endêmico brasileiro MDR (BEC). Outros métodos moleculares o caracterizaram como ST-239, SCC $_{mec}$ IIIA e PVL-negativo.
- A maioria dos MRSA (70,4%) apresentou SCC $_{mec}$ IIIA, sendo todas pertencentes ao genótipo predominante: RFT-BAAACAC/ST-239. Os isolados de MRSA que apresentaram SCC $_{mec}$ menores totalizaram 20,4% e 5,6% referentes aos tipos IVa e IV, respectivamente, sendo todos não-MDR;
- Cinco RFTs apresentaram isolados de MRSA e MSSA. Os MRSA destes grupos apresentaram-se como não-MDR, apresentando heterogeneidade por MLST: ST-1, ST-5, ST-30 (com uma cepa SLV) e um novo genótipo PVL-positivo (ST-643), associado à infecções oculares e bacteremia.
- A possível emergência do ST-5, segundo genótipo mais frequente (14,4%), é preocupante devido a sua associação com resistência à vancomicina em outros países;
- Portanto, foram detectadas infecções por outros clones de MRSA distintos do clone BEC no Rio de Janeiro, caracterizando amostras multiclonais de MRSA não-MDR hospitalares (NORSA) e 4 casos de CA-MRSA associados a ICTM;
- Este é um importante estudo que avalia a estrutura molecular de amostras de MSSA do Brasil. Foram observados 15 distintos RTFs agrupando somente MSSA; A presença de genes PVL foi detectada em 33,8% dos isolados, sendo que 80% das amostras positivas foram MSSA e os 20% restantes encontraram-se nos MRSA não-MDR.
- Os dados moleculares obtidos por MLST geraram agrupamentos associados a dados fenotípicos como perfil de sensibilidade antimicrobiana e outros genotípicos, como presença de SCC $_{mec}$ específicos e genes para PVL, fato não observado por agrupamento de cepas por dados de PFGE.
- Avaliando perfil de resistência e *background* genético, verificamos a evidência de compartilhamento de clones entre comunidade e hospitais no Rio de Janeiro/RJ.

7 REFERÊNCIAS

1. Aires DS, Miragaia M, Sanches IS, Avila S, Adamson I, Casagrande ST, *et al.* **Three-year assessment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America from 1996 to 1998.** J Clin Microbiol. 2001; 39: 2197 - 2205.
2. Aucken HM & Westwell K. **Reaction difference rule for phage typing of *Staphylococcus aureus* at 100 times the routine test dilution.** J Clin Microbiol. 2002; 40: 292-293.
3. Baba T, Takeuchi F, Kuroda M, Yuzawa H, Aoki K, Oguchchi A, *et al.*, **Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA.** Lancet. 2002; 359:1819-1827.
4. Bannerman TL. ***Staphylococcus, Micrococcus, and other Catalase-Positive Cocci that grow Aerobically.*** In: Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, and Tenover FC. **Manual of Clinical Microbiology.** 8^a edição, ASM Press Washington DC: 384 – 404; 2003.
5. Bax, R., R. Bywater, G. Cornaglia, H. Goossens, P. Hunter, V. Isham, V. Jarlier, R. Jones, I. Phillips, D. Sahm, S. Senn, M. Struelens, D. Taylor, and A. White. **Surveillance of antimicrobial resistance - what, how and whither?** Clin Microbiol Infect. 2001; 7:316-25.
6. Berglund C, Molling P, Sjoberg L & Soderquist. **Predominance of staphylococcal chromosome cassette *mec* (SCC*mec*) type IV among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a Swedish county and presence of unknown SCC*mec* types with Panton-Valentine leukocidin genes.** Clin Microbiol Infect. 2005; 11: 447-456.
7. Brasil, Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. Lei nº 9451, de 06 de janeiro de 1997. Diário Oficial da União, Brasília, de 1997. **Seção I.** Dispõe sobre a obrigatoriedade da manutenção de programa de controle de infecções hospitalares pelos hospitais do país.
8. Bignardi GE, Woodford N, Chapman A, Johnson AP, & Speller DC. **Detection of the *mecA* gene and phenotypic detection of resistance in *Staphylococcus aureus* isolates with borderline or low-level methicillin resistance.** J Antimicrob Chemother. 1996; 37: 53 - 63.
9. Bohach GA, Fast DJ, Nelson RD, & Schlievert PM. **Staphylococcal and streptococcal pyrogenic toxins involved in toxic shock syndrome and related illnesses.** Crit Rev Microbiol. 1990; 17: 251 – 272.

10. Boerlin P. **Applications of multilocus enzyme electrophoresis in medical microbiology.** J Microbiol Methods. 1997; 28: 221 - 231.
11. Boyle-Vavra S, Ereshefsky B, Wang CC & Daum R. **Successful multiresistant community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineage from Taipei, Taiwan, that carries either the novel staphylococcal chromosome cassette mec (SCCmec) type V_T or SCCmec type IV.** J Clin Microb. 2005; 43 (9): 4719-4730.
12. Bradley SF. **Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in nursing homes. Epidemiology, prevention and management.** Drugs Aging. 1997; 10: 185 - 198.
13. Carleton HA, Diep AD, Charlebois ED & Sensabaugh GF. **Community-adapted methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): population dynamics of an expanding community reservoir of MRSA.** J Infect Dis. 2004; 190: 1730-1738.
14. Centers for Disease Control and Prevention CDC. **Nosocomial infection rates for interhospital comparison: limitations and possible solutions.** A report from the National Nosocomial Infection Surveillance (NNIS) System. Infect Control Hosp Epidemiol. 1991; 12:609-621.
15. Centers for Disease Control and Prevention CDC. **Four pediatric deaths from community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* – Minnesota and North Dakota, 1997-1999.** JAMA.1998; 272829:1123-1125.
16. Centers for Disease Control and Prevention. **Vancomycin resistant *Staphylococcus aureus*-Pennsylvania.** J Am Med Assoc. 2002; 288: 2116 –2118.
17. Center for Disease Control and Prevention. **National Nosocomial Infection Surveillance (NNIS) System.** Disponível em: (www.cdc.gov/incidod/hip/surveil/nnis). Acesso em 18/05/2005.
18. Chambers HF. **Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications.** Clin Microbiol Rev. 1997; 10: 781 - 791.
19. Chambers HF. **The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*?** Emerg Infect Dis. 2001; 7: 178 - 182.

20. Corne P, Marchandin H, Jonquet O, Campos J, Bañuls AL. **Molecular evidence that nasal carriage of *Staphylococcus aureus* plays a role in respiratory tract infections of critically ill patients.** J Clin Microbiol. 2005; 43: 3491-3493.
21. Corso A, Santos SI, Aires DS, Rossi A, & de Lencastre H. **Spread of a methicillin-resistant and multiresistant epidemic clone of *Staphylococcus aureus* in Argentina.** Microbial Drug Resist. 1998; 4: 277 - 288.
22. Cosgrove SE, Sakoulas G, Perencevich EN, Schwaber MJ, Karchmer AW & Carmeli Y. **Comparison of mortality associated with methicillin resistant and methicillin susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a metaanalysis.** Clin Infect Dis. 2003; 36: 53-59.
23. Deresinski, S. **Methicilin-Resistant *Staphylococcus aureus*: an evolutionary, epidemiologic, and therapeutic odyssey.** Clin Infect Dis. 2005; 40: 562-573.
24. De la Fuente R, Suarez G, & Schleifer KH. ***Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius* subsp. nov., the causal agent of abscess disease of sheep.** Int J Syst Bacteriol. 1985; 35: 99 - 102.
25. Diekema DJ, Pfaller MA, Schmitz FJ, Smayevsky J, Bell J, Jones RN, & Beach M. **Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999.** Clin Infect Dis 2001; 32 Suppl 2:S114 - S132.
26. Diep BA, Perdreau-Remington F, & Sensabaugh GF. **Clonal characterization of *Staphylococcus aureus* by multilocus restriction fragment typing, a rapid screening approach for molecular epidemiology.** J Clin Microbiol. 2003; 41: 4559 - 4564.
27. Diep BA, Sensabaugh GF, Somboona NS, Carleton HA & Perdreau-Remington F. **Widespread skin and soft-tissue infections due to two methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains harboring the genes for Panton-Valentine leucocidin.** J Clin Microbiol. 2004; 42: 2080 - 2084.
28. Doebbeling BN. **Nasal and hand carriage of *Staphylococcus aureus* in healthcare workers** J Chemother. 1994; 6:7-11.

29. Dominguez MA, de Lencastre H, Linares J, & Tomasz A. **Spread and maintenance of a dominant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clone during an outbreak of MRSA disease in a Spanish hospital.** J Clin Microbiol. 1994; 32: 2081 - 2087.
30. Donnio PY, Oliveira DC, Faria NA, Wilhelm N, Coustumier AL & Lencastre H. **Partial excision of the chromosomal cassette containing the methicillin resistance determinant results in methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*.** J Clin Microb. 2005; 43 (8): 4191-4193.
31. Enright MC. **The evolution of a resistant pathogen – the case of MRSA.** Curr Opin Pharmacol. 2003; 3: 474-479.
32. Enright MC, Day NP, Davies CE, Peacock SJ & Spratt BG. **Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*.** J Clin Microbiol. 2000; 38: 1008 - 1015.
33. Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H & Spratt BG. **The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA).** Proc Natl Acad Sci U S A. 2002; 99: 7687 – 7692.
34. Etienne J. **Panton-Valentine Leukocidin: a marker of severity for *Staphylococcus aureus* infection?** Clin Infect Dis. 2005; 41: 591-593.
35. Euzéby JP. **List of prokaryote names with standing in nomenclature.** Disponível em: <http://www.bacterio.cict.fr/>. Acesso em 15/08/2005.
36. Feil, E.J., Cooper, J.E., Grundmann, H., Robinson, D.A., Enright, M.C., Berendt, T., Peacock, S.J., Smith, J.M., Murphy, M., Spratt, B.G., Moore, C.E., & Day, N.P. **How clonal is *Staphylococcus aureus*?** J Bacteriol. 2003; 185: 3307-3316.
37. Feil EJ, Li CB, Aanensen DM, Hanage WP & Spratt BG. **eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data.** J Bacteriol. 2004; 186 (5): 1518-1530.
38. Ferguson CA, Saunders D & Gibb Ap. **Are MRSA bacteraemias all hospital acquired?** J Hosp Infec. 2005; 10: 1016-1017.

39. Figueiredo, A.M., Ha, E., Kreiswirth, B.N., de Lencastre, H., Noel, G.J., Senterfit, L., & Tomasz, A. **In vivo stability of heterogeneous expression classes in clinical isolates of methicillin-resistant staphylococci.** J Infect Dis. 1991; **164**: 883-887.
40. Filho MBA, Ferrari ACS & Zaroni EMS. **Berçário.** In: Rodrigues EAC, Mendonça JS, Amarante JMB, Filho MBA, Grinbaum RS, Richtmann R. ed. *Infecções hospitalares. Prevenção e controle.* Sarvier, São Paulo, Cap. 2, p-236-247, 1997.
41. Foxman B & Riley L. **Molecular epidemiology: focus on infection.** 2001; 153 (12): 1135-1140.
42. Frenay HM, Bunschoten AE, Schouls LM, van Leuwen WJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Verhoef J & Mooi FR. **Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on the basis of protein A gene polymorphism.** EurJ Clin Microbiol Infect Dis. 1996; 15:60-64.
43. Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, Horan TC & Hughes JM. **CDC definitions for nosocomial infections, 1988.** Am J Infect Control. 1988; 16: 128 - 140.
44. Gosbell IB, Neville SA, Mercer JL, Fernandes LA, Fernandes CJ. **Detection of intrinsic oxacillin resistance in non-multiresistant, oxacillin resistant *Staphylococcus aureus* (NORSA).** J Antimicrob Chemother. 2003; 51: 468-470.
45. Grundmann H, Hori S, Enright MC, Webster C, Tami A, Feil EJ & Pitt T. **Determining the genetic structure of the natural population of *Staphylococcus aureus*: a comparison of multilocus sequence typing with pulsed-field gel electrophoresis, randomly amplified polymorphic DNA analysis, and phage typing.** J Clin Microbiol. 2002; 40: 4544 - 4546.
46. Hao W & Golding GB. **Patterns of bacterial gene movement.** Mol Biol Evol. 2004; 21 (7): 1294-1307.
47. Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, Yabuta K, Oguri T, & Tenover FC. **Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility.** J Antimicrob Chemother. 1997; 40: 135 - 136.
48. Howey RT, Lock CM & Moore LV. **Subspecies names automatically created by Rule 46.** Int. J. Syst. Bacteriol. 1990; 40: 317 - 319.

49. Ito T, Ma XX, Takuchi K, Okuma K, Yuzawa H & Hiramatsu K. **Novel type V staphylococcal cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccrC***. Antimicrob Agents Chemother. 2004; 48: 2637-2651.
50. Ito T, Katayama Y, Asada K, Mori N, Tsutsumimoto K, Tiensasitorn C, & Hiramatsu K. **Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus***. Antimicrob Agents Chemother. 2001; 45: 1323 - 1336.
51. Ito T, Okuma K, Ma XX, Yuzawa H & Hiramatsu K. **Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from whole genome: genomic island SCC**. Drug Resist Uptodate. 2003; 6: 41 - 52.
52. Jarraud S, Mougel C, Thioulouse J, Lina G, Meugnier H, Forey F, *et al.* **Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, *agr* groups (alleles) and human disease**. Infect Immunity. 2002; 70(2): 631-641.
53. Jevons MP. **Celbenin-resistant staphylococci**. Br Med J. 1961; 1: 14-125.
54. Katayama Y, Ito T & Hiramatsu K **A new class of genetic element, *Staphylococcus* cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus***. Antimicrob Agents Chemother. 2000; 44: 1549 - 1555.
55. Kloos W & Bannerman T. ***Staphylococcus* and *Micrococcus***, p. 264-282. In Murray P, Baron E, Pfaller MA, Tenover F & Tenover FC (ed.), Manual of clinical microbiology. 1999, ASM Press, Washington DC.
56. Krzysztoń-Russjan J, Empel J, Leski T, Gniadkowski M & Hrybiewicz. **Clonal structure of the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) population in Poland: Revision and Update**. Microb Drug Resist. 2005; 11 (2): 127-136.
57. Kuroda M, Ohta I, Uchiyama T, Baba H, Yuzawa I, Kobayashi L, *et al.* **Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus***. Lancet. 2001, 357:1225-1240.
58. Lapage SP, Sneath PHA, Lessel EF & Skerman VDB. **International code of nomenclature of bacteria**. American Society for Microbiology, Washington. 1992; 94.

59. Lina G, Piemont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter MO, Gauduchon V, Vandenesch F & Etienne J. **Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia.** Clin Infect Dis. 1999; 29: 1128 - 1132.
60. Lindsay JA & Holden MTG. ***Staphylococcus aureus*: superbug, supergenome?** Trends in Microbiol. 2004; 12: 378-385.
61. Loughman A, Fitzgerald JR, Brennan MP, Higgins J, Downer R, Cox D & Foster T. **Roles for fibrinogen, immunoglobulin and complement in platelet activation promoted by *Staphylococcus aureus* clumping factor A.** Mol Microbiol. 2005; 57: 804-818.
62. Loureiro MM, Moraes BA, Quadra MRR, Pinheiro GS, Suffys PN & Asensi MD. **Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from newborns in a hospital in Rio de Janeiro, Brazil.** Mem Inst Oswaldo Cruz. 2000; 95: 777-782.
63. Lowy FD. ***Staphylococcus aureus* infections.** N Engl J Med. 1998; 339:520-532.
64. Lowy FD. **Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*.** J Clin Invest. 2003; 111: 1265-1273.
65. Ma XX, Ito T, Tiensasitorn C, Jamklang M, Chongtrakool P, Boyle-Vavra S, Daum RS & Hiramatsu K. **Novel type of staphylococcal cassette chromosome *mec* identified in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains.** Antimicrob Agents Chemother. 2002; 46:1147 - 1152.
66. Ma XX, Galiana A, Pedreira W, Mowsszowicz M, Christophersen I, Machiavello S, *et al.* **Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Uruguay.** Emerg Infect Dis. 2005; 11 (6): 973-976.
67. Martínez & Baquero. **Interactions among strategies associated with bacterial infection: pathogenicity, epidemicity and antibiotic resistance.** Clin Microb Rev. 2002; 15 (4): 647-679.
68. Melo MCN, Silva-Carvalho MC, Ferreira RL, Coelho LR, Souza RR, Gobbi CN, Rosenbaum R, Solari CA, Ferreira-Carvalho BT & Figueiredo AMS. **Detection and molecular characterization of a gentamicin-susceptible, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus***

(MRSA) clone in Rio de Janeiro that resembles the New York-Japanese clone. J Hosp Infect. 2004; 58: 276-285.

69. Mendes C, Marin ME, Quiñones F, Sifuentes-Osornio J, Siller CC, Castanheira M, Zoccoli CM, *et al.* **Antibacterial resistance of community-acquired respiratory tract pathogens recovered from patients in Latin America: results from the PROTEKT surveillance study (1999-2000).** 2003. Braz J Infect Dis; 7 (1): 44-61.

70. Moore PC & Lindsay JA. **Molecular characterisation of the dominant UK methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains, EMRSA-15 and EMRSA-16.** J Med Microbiol. 2002; 51:516-521.

71. Moran GJ, Amii RN, Abrahamian FM & Talan DA. **Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in community-acquired skin infections.** Emerg Infect Dis. 2005; 11 (6): 928-930.

72. Multilocus Sequence Typing (MLST). ***Staphylococcus aureus* database of MLST.** Disponível in: (<http://saureus.mlst.net/>). Acesso em 15/02/2004.

73. Musser JM & Kapur V. **Clonal analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from intercontinental sources: association of the *mec* gene with divergent phylogenetic lineages implies dissemination by horizontal transfer and recombination.** J Clin Microbiol. 1992; 30: 2058 - 2063.

74. Mylotte JM, Goodnough S & Tayara A. **Antibiotic-resistant organisms among long-term care facility residents on admission to an inpatient geriatric unit: retrospective and prospective surveillance.** Am J Infect Control. 2001; 29: 139-144.

75. Mylotte JM, McDermott C & Spooner JA. **Prospective study of 114 consecutive episodes of *Staphylococcus aureus* bacteremia.** Rev Infec Dis. 1987; 9:891-907.

76. National Center for Biotechnology Information. **Genbank.** Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/GenbankSearch.html>. Acesso em 12/08/2004.

77. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility; approved standard – Seventh Edition.** NCCLS, 2000. Wayne, Pennsylvania, USA.

78. Nouwen JL, van Belkum & Verbrug HA. **Determinants of *Staphylococcus aureus* nasal carriage.** Neth J Med. 2001; 59:126-133.
79. Oliveira GA, Levy CE & Mamizuka EM. ***Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin: mechanisms of resistance, laboratory detection and perspectives of appearance in Brazil.** J Bras Pat. 2000; 36: 96-102.
80. Oliveira GA, Dell'Aquila AM, Masiero RJ, *et al.* **The first isolation of multiple *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin from the same hospital in Brazil.** Infect Control Hosp Epidemiol. 2001a; 22: 443-448.
81. Oliveira GA, Faria JB, Levy CE & Mamizuka EM. **Characterization of the Brazilian endemic clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from hospitals throughout Brazil.** Braz J Infec Dis. 2001b; 5: 163-170.
82. Oliveira DC & de Lencastre H. **Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** Antimicrob Agents Chemother. 2002; 46:2155-2161.
83. Okuma K, Iwakawa K, Turnidge JD, Grubb WB, Bell JM, O'Brien FG, Coombs GW, Pearman JW, Tenover FC, Kapi M, Tiensasitorn C, Ito T & Hiramatsu K. **Dissemination of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in the community.** J Clin Microbiol. 2002. 40: 4289 - 4294.
84. Pannuti CS & Grinbaum RS. **An overview of nosocomial infection control in Brazil.** Infect Control Hosp Epidemiol. 1995; 16: 170-174.
85. Paradisi F, Corti G & Messeri D. **Antistaphylococcal (MSSA, MRSA, MSSE, MRSE) antibiotics.** Med Clin North Am. 2001; 85: 1 - 17.
86. Parker M. **Phage-typing of *Staphylococcus aureus*.** Academic Press, London, 1972 Vol 7B.
87. Patti JM, Allen BL, McGavin MJ, HOOK M. **MSCRAMM- mediated adherence of microorganism to host tissue.** Annu Rev Microbiol. 1994; 48:585-617.

88. Peacock SJ, de Silva GDI, Justice A, Cowland A, Moore CE, Winearls CG & Day NPJ. **Comparison of multilocus sequence typing and pulsed field gel electrophoresis as tools for typing *Staphylococcus aureus* isolates in a microepidemiological setting.** J Clin Microb. 2002; 40 (10) 3767-3770.
89. Powers JH, Ross DB, Lin D & Soreth J. **Linezolid and vancomycin for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nosocomial pneumonia: the subtleties of subgroup analyses.** Chest. 2004; 126:314 – 315.
90. Pujol M, Pena C, Pallares R, Ayats J, Ariza J & Gudiol F. **Risk factors for nosocomial bacteremia due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1994; 13:96 - 102.
91. Reagan DR, Doebbeling BN, Pfaller MA, Sheetz CT, Houston AK, Hollis RJ, Wenzel RP. **Elimination of coincident *Staphylococcus aureus* nasal and hand carriage with intranasal application of mupirocin calcium ointment.** Ann Intern Med.1991; 114:101-106.
92. Revazinshvili T, Kotetishvili, Stine OC, Kreger AS, Morris JG & Suçakvelidze A. **Comparative analysis of multilocus sequene typing and pulsed field gel electrophoresis for characterizing *Listeria monocystogenes* strains isolated from environmental and clinical sources.** J Clin Microb. 2004; 42 (1): 276-285.
93. Ribeiro A, Dias C, Silva-Carvalho MC, Berquó L, Ferreira FA, Santos RNS, Ferreira-Carvalho BT & Figueiredo AM. **First report of infection with community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in South America.** J Clin Microbiol. 2005; 43 (4): 1985-1988.
94. Robert J, Etienne J, Bertrand X & grupo ONEBRA. **Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* producing Panton-Valentine leukocidin in a retrospective case series from 12 French hospital laboratories, 2000-2003.** Clin Microbiol Infect; 2005; 11: 585-587.
95. Roberts RB, de Lancastre A, Einsner W, Severina EP, Shopsin B, Kreiswirth BN, Tomaz A. **Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in 12 New York hospitals. MRSA Collaborative Study Group.** J Infect Dis. 1998; 178:164-171.
96. Robinson AD & Enright MC. **Evolutionary models of the emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** Antim Agents Chemother. 2003; 47 (12): 3926-3934.

97. Sader HS, Gales AC, Pfaller MA, Zoccoli C, Barth A & Jones RN. **Pathogens frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program.** Brazil J Infect Dis. 2001; 5: 200 - 214.
98. Sader HS, Pignatari AC, Hollis RJ & Jones RN. **Evaluation of interhospital spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Sao Paulo, Brazil, using pulsed-field gel electrophoresis of chromosomal DNA.** Infect Control Hosp Epidemiol. 1994; 15: 320 – 323.
99. Safdar N & Maki DG. **The commonality of risk factors for nosocomial colonization and infection with antimicrobial-resistant *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus*, gram-negative bacilli, *Clostridium difficile* and *Candida*.** Ann Intern Med. 2002; 136:834-844.
100. Saiman L, O’Keefe M, Graham III PL, Wu F, Said-Salim B, Kreiswirth B, *et al.* **Hospital transmission of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among postpartum women.** Clin Infect Dis. 2003; 37:1313-1319.
101. Sa-Leao R, Santos SI, Dias D, Peres I, Barros RM & de Lencastre H. **Detection of an archaic clone of *Staphylococcus aureus* with low-level resistance to methicillin in a pediatric hospital in Portugal and in international samples: relics of a formerly widely disseminated strain?** J Clin Microbiol. 1999; 37: 1913 – 1920.
102. Sanches IS, Saraiva ZC, Tendeiro TC, Serra JM, Dias DC & de Lencastre H. **Extensive intra-hospital spread of a methicillin-resistant staphylococcal clone.** Int J Infect Dis. 1998; 3: 26 - 31.
103. Santos KR, Teixeira LM, Leal GS, Fonseca LS & Gontijo-Filho PP. **DNA typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: isolates and factors associated with nosocomial acquisition in two brazilian university hospitals.** J Med Microbiol.1999; 48: 17-23.
104. Salmenlinna S & Vuopio-Varkila J. **Recognition of two groups of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* strains based on epidemiology, antimicrobial susceptibility, hypervariable-region type, and ribotype in Finland.** J Clin Microb. 2001; 39 (6): 2243-2247.
105. Saulnier P, Bourneix C, Prevost G & Andremont A. **Random amplified polymorphic DNA assay is less discriminant than pulsed-field gel electrophoresis for typing strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** J Clin Microbiol. 1993; 31: 982 - 985.

106. Scanvic A, Denic F, Gaillon S, Giry P, Andremont A & Lucet J. **Duration of colonization by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* after hospital discharge and risk factors for prolonged carriage.** Clin Infect Dis. 2001; 32: 1393-1398.
107. Schwartz DC & Cantor CR. **Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis.** Cell. 1984; 37:67-75.
108. Shore A, Rossney AS, Keane CT, Enright MC, Coleman DC. **Seven novel variants of the staphylococcal chromosomal cassette mec in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Ireland.** Antimicrob Agents Chemother. 2005; 49 (5): 2070-2083.
109. Skerman VBD, McGowan V & Sneath PHA. **Approved lists of bacterial names.** Int J Syst Bacteriol. 1980; 30:225-420.
110. Smith, TL, Pearson ML, Wilcox KR, Cruz C, Lancaster MV, Robison-Dunn B, Tenover FC, Zervos MJ, Band DJ, White E & Jarvis WR. **Emergence of Vancomycin Resistance in *Staphylococcus aureus*. Glycopeptide-Intermediate *Staphylococcus aureus* working group.** N Engl J Med. 1999; 340: 493-501.
111. Selander RK, Caugant DA, Ochman H, Musser JM, Gilmour MN, Whittam. **Methods multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics.** Appl Environ Microbiol. 1986; 51:873-874.
112. Teixeira LA, Resende CA, Ormonde LR, Rosenbaum R, Figueiredo AM, de Lencastre H & Tomasz A. **Geographic spread of epidemic multiresistant *Staphylococcus aureus* clone in Brazil.** J Clin Microbiol. 1995; 33:2400-2404.
113. Tenover FC, Arbeit R, Archer G, Biddle J, Byrne S, Goering R, *et al.* **Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*.** J Clin Microbiol. 1994; 32: 407 – 415.
114. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing, DH & Swaminathan B. **Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing.** J Clin Microbiol. 1995; 33: 2233-2239.

115. Trindade PA, Pacheco RL, Costa SF, Rossi F, Barone AA, Mamizuka EM & Levin AS. **Prevalence of SCCmec type IV in nosocomial bloodstream isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus***. J Clin Microb. 2005; 43 (7) 3435-3537.
116. Tomasz A, Nachman S & Leaf H. **Stable classes of phenotypic expression in methicillin-resistant clinical isolates of staphylococci**. Antimicrob Agents Chemother. 1991; 35: 124-129.
117. van Belkum A, Riewarts-Eriksen NH, Sijmons M, van Leuwen W, Van den Bergh, Kluytmans J, Espersen F, Verbrugh H. **Are variable repeats in the *spa* gene suitable targets for epidemiological studies of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains?** Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1996;15:768-770.
118. Vandenesch F, Naimi T, Enright MC, Lina G, Nimmo GR, Heffernam H, *et al.* **Community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence**. Emer Infect Dis. 2003; 9 (8): 978-984.
119. Weber JT. **Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus***. Clin Infect Dis. 2005; 41 (4) 269-272.
120. Weems JJJ. **The many faces of *Staphylococcus aureus* infection. Recognizing and managing its life-threatening manifestations**. Postgrad Med. 2001; 110: 24 - 36.
121. Weller TMA. **Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* typing methods: which should be the international standard?** J Hosp Infect. 2000; 44: 160-172.
122. Wey SB. **Infection control in a country with annual inflation of 3,600%**. Infect Control Hosp Epidemiol. 1995; 16: 175-178.
123. Wisplinghoff H, Ewertz B, Wisplinghoff S, Stafanik D, Plum G, Perdreau-Remington F & Seifert H. **Molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the metropolitan area of Cologne, Germany, from 1984 to 1998**. J Clin Microb. 2005; 43 (11): 5445-5451.
124. Witte W. **International dissemination of antibiotic resistant strains of bacterial pathogens**. Infec Genet Evol. 2004; 4: 187-791.

125. Witte W, Braulke C, Cuny C, Strommenger B, Werner G, Heuck D, *et al.* **Emergence of methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* with Panton-Valentine genes in central Europe.** Eur J Clin Microb Infec Dis. 2004; 10: 1262-1268.