

Cristiana Ossaille Beltrame

Avaliação do teste Restrição Modificação (teste RM) para a identificação das principais linhagens de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) isoladas de hospitais do Rio de Janeiro



Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia)

Orientadora: Agnes Marie Sá Figueiredo



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PROF PAULO DE GÓES  
RIO DE JANEIRO  
JULHO, 2010

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

## FICHA CATALOGRÁFICA

Beltrame, Cristiana Ossaille

Avaliação do teste Restrição Modificação (teste RM) para a identificação das principais linhagens de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) isoladas de hospitais do Rio de Janeiro/ Cristiana Ossaille Beltrame – Rio de Janeiro, 2010.

82

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas).

Universidade Federal do Rio de Janeiro/ Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, 2010.

Orientador: Agnes Marie Sá Figueiredo

Referências bibliográficas: 54-66

1. MRSA. 2. complexo clonal. 3. genotipagem. 4. teste RM. 5. *loci* diagnósticos 6. antibiograma. I. Figueiredo, Agnes Marie Sá. II. UFRJ, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Mestrado em Ciências Biológicas. III. Avaliação do teste Restrição Modificação (teste RM) para a identificação das principais linhagens de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) isoladas de hospitais do Rio de Janeiro.

Avaliação do teste Restrição Modificação (teste RM) para a identificação das principais linhagens de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) isoladas de hospitais do Rio de Janeiro

Cristiana Ossaille Beltrame

Orietadora: Agnes Marie Sá Figueiredo

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências (Microbiologia), do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada por:

---

Agnes Marie Sá Figueiredo, orientador, prof. associado, IMPPG .

---

Sérgio Eduardo Longo Fracalanza, presidente, prof. associado, IMPPG.

---

Beatriz Meurer Moreira, prof. associado, IMPPG.

---

Vânia Lúcia Carreira Merquior, prof. adjunto, Faculdade de Ciências Médicas, UERJ.

---

Bernadete Teixeira.Ferreira Carvalho, revisor, prof. associado, IMPPG.

**Rio de Janeiro**  
**Julho , 2010**

Trabalho realizado no laboratório de Biologia Molecular de Bactérias, do Departamento de Microbiologia Médica, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob a orientação da Prof<sup>a</sup> Agnes Marie Sá Figueiredo.

## Agradecimentos

- Aos meus pais, Rodolfo e Nicole pelo amor e dedicação, por sempre terem me apoiado em minhas escolhas. Obrigada pelos ensinamentos, pelos “puxões de orelha”, pelas noites em claro, pelo carinho, enfim, por terem cuidado tão bem de mim ao longo desses meus 25 anos. Eu não poderia ter tido pais melhores. Devo a vocês tudo que sou hoje. Deus me abençoou muito ao ter colocado vocês e a Dri em minha vida!
- À minha irmã, Adriana, pela amizade e companheirismo. Você é a melhor amiga que alguém pode ter, essencial em minha vida. Te amo muito.
- Ao meu namorado Leonardo. Agradeço muito pelo apoio e pelos excelentes conselhos, que muitas vezes me reergueram em momentos que eu estava desesperançosa. Obrigada por ser o melhor namorado do mundo, companheiríssimo de todas as horas!!!
- À professora Agnes, pela excelente orientação, pelo apoio e ao voto de confiança depositado em mim!
- Aos meus queridos companheiros do Laboratório de Biologia Molecular de Bactérias: Mari, Fabi, Bia, Rosinha, Aninha, Carol, Leo, Marina, Isidório, Amada, Deborah, Lígia, Cicina, Márcia, Solange, Raquel, Marquinhos e professoras Bernadete e Raquel Bonelli. Vocês tornam o meu dia-a-dia no laboratório extremamente agradável!
- Aos membros da banca por terem aceitado o meu convite e pelas questões que serão levantadas.
- Às minhas grandes amigas da graduação, especialmente à Bianca, Renata e Sarah. Vocês são uns dos maiores presentes que ganhei ao entrar na UFRJ. Obrigada pela amizade, pelos conselhos e pela alegria que vocês me proporcionam.
- À minha grande amiga de infância Carolina. Vinte e dois anos de amizade e não me canso nunca de você! Obrigada por tudo, por estar presente em todos os momentos da minha vida.
- Às minhas amigas Isabel e Tatiana. Obrigada por serem sempre tão especiais atenciosas e companheiras.
- Ao corpo docente e funcionários do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, pela excelente manutenção deste instituto, o qual tem sido minha casa há dois anos.
- Aos órgãos financiadores: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT/Pronex) e Ministério da Saúde do Brasil, pelo suporte financeiro.

Dedico esta dissertação aos meus pais e à minha irmã, que sempre foram e serão meus maiores incentivadores, e a todos que contribuíram, de alguma forma, com a concretização deste trabalho.

## RESUMO

Cristiana Ossaille Beltrame

Avaliação do teste Restrição Modificação (teste RM) para a identificação das principais linhagens de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) isoladas de hospitais do Rio de Janeiro

Orientadora: Agnes Marie Sá Figueiredo

Resumo da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Os *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) apresentam uma população com estrutura altamente clonal, o que torna muito complexa a identificação de linhagens circulantes, devido à necessidade de se usar métodos sofisticados, envolvendo tecnologias de DNA. Recentemente, técnicas simples e rápidas de genotipagem têm sido desenvolvidas e, geralmente, envolvem PCR. Um exemplo é o método conhecido como teste de Restrição e Modificação (RM), proposto para identificar as principais linhagens de MRSA circulantes em hospitais, incluindo os complexos clonais (CC) de MLST CC1, CC5, CC8, CC22, CC30 e CC45. Neste trabalho, objetivamos avaliar o teste RM, utilizando como padrão de comparação uma combinação de métodos clássicos de tipagem de MRSA, incluindo a técnica de pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) e tipagem SCC*mec*. Além disso, procuramos definir marcadores fenotípicos (antibiotipo) e detecção molecular de *loci* diagnósticos, que pudessem validar os resultados obtidos através do teste RM. Ao final de nossas análises, concluímos que o teste RM apresentou alta sensibilidade, alocando 129 das 131 amostras analisadas em algum CC, e especificidade de 100%, alocando corretamente nos CC todas as 126 amostras que apresentavam perfis de PFGE conhecidos analisadas (BEC, USA 100, USA 400, USA 600 e USA 1100). Achamos também interessante acrescentar ao teste alguns marcadores, de forma a confirmar os resultados obtidos. Nossos estudos indicaram como um marcador interessante o padrão de susceptibilidade a quatro antimicrobianos (ciprofloxacina, Cip; sulfametoxazol trimetoprim SxT; eritromicina, Eri; e tetraciclina, Tet). A maioria das amostras testadas puderam ser alocadas em um número restrito de 4 antibiótipos predominantes, designados AT1 (Cip<sup>R</sup> Sxt<sup>R</sup> Eri<sup>R</sup> TT<sup>R</sup>), AT4 (Cip<sup>S</sup> Sxt<sup>S</sup> Eri<sup>S</sup> Tet<sup>S</sup>), AT5 (Cip<sup>S</sup> Sxt<sup>S</sup> Eri<sup>R</sup> Tet<sup>S</sup>) e AT8 (Cip<sup>R</sup> Sxt<sup>S</sup> Eri<sup>R</sup> Tet<sup>S</sup>). Adicionalmente, para validarmos o teste RM para aquelas amostras de diferentes CC que apresentaram o mesmo antibiótipo, ou amostras que apresentaram antibiótipos não predominantes, acrescentamos a detecção de *loci* diagnósticos como SCC*mec*III (para amostras apresentando CC8, antibiótipo predominante: AT1), *lukSFpv* (para diferenciar amostras CC30, antibiótipo predominante: AT4), das amostras CC5-SCC*mec*IV, antibiótipo predominante: AT5; *seh* e *agrII* (para diferenciar amostras CC1, CC5-SCC*mec*II e CC45, as quais apresentam o antibiótipo: AT8). Desta forma, propomos um novo esquema de genotipagem de amostras de MRSA, baseada na determinação dos CC através do teste RM, em paralelo com a análise dos antibiótipos para (Cip, SxT, Eri e Tet), associada à detecção

de quatro marcadores moleculares específicos (*SCCmecIII*, *lukSFpv*, *seh* e *agrII*). Acreditamos que esse esquema torna o teste RM mais robusto e será bastante útil para triagens iniciais de patógenos de MRSA envolvidos em infecções associadas aos cuidados à saúde (IACS).

Palavras-chave: MRSA, complexo clonal, genotipagem, teste RM, *loci* diagnósticos, antibiograma

**Rio de Janeiro  
Julho de 2010**

## ABSTRACT

Cristiana Ossaille Beltrame

Avaliação do teste Restrição Modificação (Teste RM) para a identificação das principais linhagens de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) isoladas de hospitais do Rio de Janeiro

Orientador: Agnes Marie Sá Figueiredo

Resumo da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates display a very tight clonal population structure that makes very sophisticated the identification of the circulating lineages, due to the need of using DNA methodologies for MRSA typing in the occurrence of outbreaks. Recently, rapid and simple genotyping techniques have been developed and, generally, PCR based. For instance, the restriction modification test (RM test) was proposed for the identification of the main circulating MRSA lineages, including the clonal complex (CC) of MLST CC1, CC5, CC8, CC22, CC30 e CC45. In this work, we aim to evaluate the RM test, using gold standard a combination of classic typing methods, including pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and SCCmec typing. In addition, we tried to define phenotype marker (based on antimicrobial susceptibility) and the detection of diagnostic *loci* to validate the results obtained here by using RM test. After the analysis, we could conclude that RM test shows a sensibility of 98% (grouping in CC 129 from 131 isolates analyzed), and 100% of specificity, correctly classifying in the CC all of 126 strains that display known PFGE patterns (BEC, USA 100, USA400, USA 600 and USA 1100. We also thought it would be interesting to add some markers, in order to confirm the results of RM test. Our studies indicated that the susceptibility to four antimicrobial drugs (ciprofloxacin, Cip; trimethoprim-sulphamethoxazole, SxT; erythromycin, Eri; and tetracycline, Tet) would be an interesting phenotypic mark. The majority of isolates tested could be allocated in a restrictive number of 4 predominant antibiotypes, called AT1 (Cip<sup>R</sup> Sxt<sup>R</sup> Eri<sup>R</sup> Tet<sup>R</sup>), AT4 (Cip<sup>S</sup> Sxt<sup>S</sup> Eri<sup>S</sup> Tet<sup>S</sup>), AT5 (Cip<sup>S</sup> Sxt<sup>S</sup> Eri<sup>R</sup> Tet<sup>S</sup>) e AT8 (Cip<sup>R</sup> Sxt<sup>S</sup> Eri<sup>R</sup> Tet<sup>S</sup>). In addition, to validate the RM test for that isolates displaying the same antibiotype, or for isolates having non-predominant antibiotypes, we added the detection of diagnostic *loci*, including SCCmecIII (for isolates displaying CC8, predominant antibiotype: AT1), *lukSFpv* (for differing CC30 isolates - predominant antibiotype AT4 - from the isolates CC5-SCCmecIV - predominant antibiotype AT5), *seh* e *agrII* (to differentiate isolates CC1, CC5-SCCmecII and CC45, which display AT8). Thus, we propose a novel genotyping scheme for MRSA isolates, based on determination of CC using RM test, concomitant with the analysis of antibiotypes, associated to the detection of 4 molecular specific diagnostic markers (SCCmecIII, *lukSFpv*, *seh* e *agrII*). We believe that this scheme makes the RM test more

robust and will be very useful for initial screening of MRSA lineages involved in health care associated infections (HCAI).

Palavras-chave: MRSA, genotyping, RM test, clonal complex, diagnostic *loci*, antibiotic

**Rio de Janeiro  
Julho de 2010**

## ÍNDICE

<b>1. <u>Introdução</u></b>	<b>17</b>
1.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	17
1.1.1. <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à meticilina (MRSA)	18
1.1.2. Clones de <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à meticilina associados aos hospitais (HA-MRSA)	22
1.1.3. MRSA associados a infecções na comunidade (CA-MRSA)	25
1.2. Tipagem molecular de MRSA	27
1.2.1. PFGE	28
1.2.2. MLST	29
1.2.3. Tipagem do SCCmec	30
1.2.4. Tipagem spa	31
1.2.5. Detecção do <i>agr</i>	31
1.2.6. Detecção de linhagens internacionais de MRSA baseada em ampliações por multiplex PCR de genes do sistema de restrição e modificação de <i>S. aureus</i>	32
<b>2. <u>Justificativa:</u></b>	<b>35</b>
<b>3. <u>Objetivos</u></b>	<b>36</b>
3.1. Objetivos específicos:	37
<b>4. <u>Material e Métodos</u></b>	<b>38</b>
4.1. Amostras bacterianas e testes de susceptibilidade	37
4.2. Extração de DNA total	37
4.3. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	38
4.4. Eletroforese convencional de DNA	38
4.5. Tipagem do SCCmec através de PCR	39
4.6. Detecção do <i>loci lukSF-pv</i> através de PCR	40
4.7. Detecção do locus <i>seh</i> através de PCR	41
4.8. Detecção do polimorfismo <i>agr</i> tipo II através de PCR	41
4.9. Genotipagem das amostras de MRSA através do teste RM	42
4.10. Tipagem através do sequenciamento de multilocus enzimáticos (MLST)	42
4.10.1. Purificação dos produtos de PCR	43
4.10.2. Sequenciamento de DNA	43
4.11. Eletroforese em gel sob campos elétricos alternados ( <i>Pulse-Field Gel Electrophoresis</i> ; PFGE)	44

<b>5. <u>Resultados</u></b>	<b>45</b>
5.1 Análise da diversidade genômica das amostras MRSA através da técnica de PFGE	45
5.2. Teste RM	45
5.3. Tipagem do SCC $mec$	46
5.4. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos	47
5.5. Detecção da PVL ( <i>lukSF-pv</i> )	48
5.6. Detecção da enterotoxina H ( <i>seh</i> )	48
5.7. Tipagem do locus <i>agr</i> tipo II	48
5.8. MLST	49
<b>6. <u>Discussão</u></b>	<b>59</b>
<b>7. <u>Bibliografia</u></b>	<b>70</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Elementos genéticos móveis inseridos no SCC $mec$ e fenótipo de resistência aos antimicrobianos.	<b>21</b>
<b>Tabela 2.</b> Principais clones de MRSA disseminados no mundo e importantes características moleculares a eles associadas.	<b>34</b>
<b>Tabela 3.</b> Proteínas codificadas pelos genes utilizados na tipagem MLST. Adaptado de Cockfield e colaboradores, 2000.	<b>30</b>
<b>Tabela 4.</b> Complexo clonal (CC) e tamanho esperado dos produtos de amplificação (pb) no teste RM (adaptado de Cockfield e colaboradores, 2007).	<b>33</b>
<b>Tabela 5.</b> Sequência dos iniciadores utilizados no multiplex PCR, descrito por Boye e colaboradores, 2007.	<b>40</b>
<b>Tabela 6.</b> Iniciadores diretos ( <i>dir</i> ) e reversos ( <i>rev</i> ) que foram utilizados no teste RM, segundo Cockfield e colaboradores, 2007.	<b>42</b>
<b>Tabela 7.</b> Análises moleculares e padrão predominante de susceptibilidade a antimicrobianos das 126 amostras relacionadas ao clone BEC, USA 400, USA 100, USA 600, USA 800 e USA 1100 deste estudo.	<b>50</b>
<b>Tabela 8.</b> Resumo da metodologia proposta para triagem genotípica de amostras de MRSA isoladas no Rio de Janeiro baseada no Teste RM	<b>69</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Desenho esquemático dos SCC <i>mec</i> tipo I ao VIII encontrados em amostras de MRSA. Os principais elementos estão representados (genes <i>ccr</i> , <i>IS431</i> , <i>mecA</i> , <i>mec1/R1</i> , <i>orfx</i> , pI258, pT181, pUB111 e Tn554). Adaptada de Deurenberg & Stobberingh, 2008.	<b>21</b>
<b>Figura 2A.</b> PFGE de amostras representativas dos principais clones internacionais e de amostras deste estudo.	<b>52</b>
<b>Figura 2B.</b> PFGE de amostras representativas dos principais clones internacionais e de amostras deste estudo.	<b>53</b>
<b>Figura 3.</b> Resultados obtidos com o teste RM, utilizando amostras padrão.	<b>54</b>
<b>Figura 4.</b> Tipagem através do teste RM das quatro amostras de MRSA deste trabalho pertencentes ao clone USA 600.	<b>55</b>
<b>Figura 5.</b> Resultados da tipagem SCC <i>mec</i> para as amostras padrão.	<b>56</b>
<b>Figura 6.</b> Tipagem do SCC <i>mec</i> das amostras relacionadas ao clone USA 600.	<b>57</b>
<b>Figura 7.</b> Detecção do <i>agr</i> tipo II em amostras CC45 e CC5	<b>58</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

AIP	Peptídio autoindutor do sistema <i>agr</i> (do inglês: <i>autoinducing peptide</i> )
Agr	Sistema sensor de densidade populacional dos <i>S. aureus</i> (do inglês: <i>accessory gene regulator</i> )
AT	Antibiotipo
BEC / CH	Clone epidêmico brasileiro / Húngaro
CA-MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à meticilina associados a infecções comunitárias (do inglês: <i>community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i> )
CC	Complexo clonal
CCIH	Comissões de controle de infecção hospitalar
CI	Clone ibérico
CP	Clone pediátrico
Cip	Ciprofloxacina
DNA	Ácido desoxirribonucléico (do inglês: <i>deoxyribonucleic acid</i> )
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês: <i>ethylenediamine teraacid</i> )
EMRSA 15 e 16	Clone epidêmico MRSA 15 e 16 (do inglês: <i>epidemic methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i> )
Eri	Eritromicina
HA-MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à meticilina associados a infecções hospitalares (do inglês: <i>hospital-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i> )
IACS	Infecções associadas aos cuidados à saúde
MLST	Tipagem por seqüenciamento de multilocus enzimáticos (do inglês: <i>multilocus sequence typing</i> ).

MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à meticilina (do inglês: <i>methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i> )
PBP2a	Nova proteína de ligação à penicilina (do inglês: <i>penicillin binding protein 2a</i> )
PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês: <i>polymerase chain reaction</i> )
PFGE	Eletroforese submetido a campos elétricos alternados (do inglês: <i>pulsed-field gel-electrophoresis</i> )
PVL	Leucocidina de Panton-Valantine (do inglês <i>Panton-Valantine Leukocidin</i> )
SCC <sub>mec</sub>	Elemento <i>mec</i> ou cassete cromossômico estafilocócico <i>mec</i> (do inglês: <i>staphylococcal cassette chromosome mec</i> )
SEH	Enterotoxina H (do inglês: <i>staphylococcal enterotoxin H</i> )
ST	Sequência tipo
RM	Restrição Modificação
SxT	Sulfametoxazol -Trimetoprim
TSA	Meio de cultura com ágar (do inglês: <i>tryptic soy agar</i> )
TSB	Meio de cultura em caldo (do inglês: <i>tryptic soy broth</i> )
TAE	Tris Acetato EDTA
TBE	Tris Borato ETDA
TE	Tris ETDA
Tet	Tetraciclina
VRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à vancomicina (do inglês: <i>vancomycin-resistant Staphylococcus aureus</i> )

## **1. Introdução**

### 1.1. *Staphylococcus aureus*

As bactérias do gênero *Staphylococcus* possuem forma cocóide, são Gram-positivas, catalase-positivas, imóveis, facultativas e não formam esporos, sendo classificadas como componentes da família *Staphylococcaceae* (GUSMÁN, ROMEO & GARCIA-VALLVE, 2008). A espécie *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (mais conhecida como *S. aureus*) agrupa um dos microrganismos mais amplamente estudados, por estarem envolvidos em uma gama de processos infecciosos, representando uma das principais causas de infecções associadas aos cuidados à saúde (IACS). Adicionalmente, esses microrganismos apresentam elevada capacidade para desenvolver resistência antimicrobiana, contribuindo assim para o aumento dos índices de morbidade e mortalidade (APPELBAUM, 2006; PLATA, ROSATO & WEGRZYN, 2009). Sua distribuição no corpo humano é ampla, podendo colonizar mucosas nasais, períneo, axilas, boca, orofaringe, vagina, glândulas mamárias e trato intestinal (CHILLER, SELKIN & MURAKAWA, 2001; PEACOCK *et al.*, 2001; FRANK *et al.*, 2010).

As infecções por *S. aureus* podem ser classificadas com base em dois tipos distintos: processos infecciosos agudos e doenças causadas por toxinas. As infecções agudas podem ser simples e localizadas, como os furúnculos e impetigos, ou mais graves e invasivas, incluindo as endocardites, osteomielites, pneumonias, meningites, dentre outras, podendo algumas se apresentar sob forma disseminada, como as bacteremias e as infecções generalizadas (CHANG *et al.*, 2003, BAMBERGER, 2007). Doenças causadas por toxinas também apresentam diferentes espectros de manifestações clínicas, como a síndrome da pele escaldada, síndrome do choque tóxico e as intoxicações alimentares (LE LOIR, BARON & GAUTIER, 2003).

A extraordinária plasticidade dos *S.aureus* para infectar diferentes tecidos e órgãos de humanos tem sido atribuída aos seus inúmeros fatores de virulência, os quais podem estar ancorados à superfície celular bacteriana ou ser secretados para o meio extracelular. Além disso, outra característica importante deste microrganismo é sua facilidade em adquirir genes que conferem resistência aos antimicrobianos (KATAYAMA, ITO & HIRAMATSU, 2000; DEURENBERG & STOBBERINGH, 2008).

Outra importante característica dos *S.aureus* e que também está envolvida na patogenicidade é sua capacidade de sobreviver por longos períodos em superfícies inanimadas, formando uma espécie de filme biológico, ou biofilme (KRAMER *et al.*, 2006). Acredita-se que a formação de biofilme seja um dos principais fatores bacterianos relacionados a infecções hospitalares associadas aos biopolímeros, as quais são geralmente graves (GÖTZ, 2002). Dentre essas infecções incluem-se as bacteremias primárias associadas ao uso de cateteres endovenosos centrais, as pneumonias associadas à ventilação mecânica, as infecções urinárias relacionadas aos cateteres vesicais e o uso de próteses ortopédicas e válvulas cardíacas. Um fator complicador é que o tratamento dessas infecções associadas ao biofilme leva, na maioria dos casos, à remoção do dispositivo médico, não raramente através de cirurgia, visto que, muitas vezes, o antimicrobiano não consegue atingir as camadas mais internas do filme biológico e, desta forma, não é possível eliminar toda a massa estafilocócica (WILCOX *et al.*, 2001; PARSEK & SINGH, 2003). Além disso, a formação de biofilme pelas bactérias confere uma série de vantagens ao microrganismo, tais como capacidade de resistir aos antimicrobianos, à fagocitose e à ação do sistema complemento, além de aumentar sua habilidade para capturar e concentrar nutrientes do ambiente (BEVERIDGE *et al.*, 1997). Recentemente estudos de nosso grupo revelaram que o biofilme parece ser um fator que contribui para a aquisição de resistência aos antimicrobianos, por promover o contato célula-célula e, assim, aumentar a taxa de transferência gênica (DE ARAÚJO *et al.*, 2006).

#### 1.1.1. *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA)

A introdução da penicilina em 1940 resultou em uma redução drástica dos índices de morbidade/mortalidade das infecções por *S. aureus*. No entanto, em 1942, foram observadas cepas estafilocócicas resistentes a esta droga, sendo este fenótipo resultante da aquisição de um plasmídeo que codificava uma enzima ( $\beta$ -lactamase ou penicilinase) capaz de hidrolisar o anel  $\beta$ -lactâmico das penicilinas naturais. Em 1960, 80% de todas as amostras de *S.aureus* haviam adquirido resistência à penicilina. A descoberta das penicilinas semi-sintéticas (como a meticilina e a oxacilina) representou, na época, uma perspectiva de controle das cepas resistentes à penicilina. Entretanto, já na década de 60, foram detectadas as primeiras cepas de *S. aureus* apresentando um novo mecanismo de resistência a essas novas penicilinas (JEVONS, 1961). Estas amostras são hoje

conhecidas pela sigla MRSA, do inglês *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*. A resistência à metilina em *S. aureus* ocorreu através da aquisição do gene *mecA*, que codifica uma proteína de ligação à penicilina (PBP2` ou PBP2a, do inglês: *Penicilin Binding Protein*), e confere resistência à metilina e a outros  $\beta$ -lactâmicos. A PBP2a é uma transpeptidase alternativa, a qual possui baixa afinidade pelos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (BERGER-BACHI & ROHRER, 2002). É sabido que as transpeptidases são importantes na formação de pontes transversas da parede celular bacteriana. Assim, a síntese do peptídeoglicano pode ocorrer normalmente nas amostras resistentes (portadora do gene *mecA*), através da ação enzimática desta PBP modificada e, desta forma, as bactérias resistentes podem sobreviver mesmo na presença das penicilinas.

O gene *mecA* está localizado em um elemento genético móvel, designado de cassete cromossômico estafilocócico *mec* (SCC*mec*, do inglês: *Staphylococcal Cassette Chromosome mec*). O SCC*mec* está integrado ao cromossomo dos MRSA, em um sítio específico (*attB<sub>scc</sub>*), localizado próximo à origem de replicação e flanqueado por seqüências diretas e repetidas. Este segmento de DNA, que pode variar de 21 a 67 Kb, carrega o chamado “complexo gene *mec*”, o qual corresponde às regiões do gene *mecA* e de seus reguladores, *mecRI* e *mecI*, e o “complexo *ccr*”. Neste complexo se encontram os genes que codificam para recombinases (*genes ccr*), as quais são responsáveis pela mobilidade do SCC*mec*. Os genes *mecI* e *mecRI* apresentam atividade repressora e anti-repressora, respectivamente, sobre o gene *mecA* (ARCHER & NIEMEYER., 1994).

Até o momento, 8 tipos de SCC*mec* foram descritos (tipo I -VIII), cada qual carregando uma combinação característica dos complexos *ccr*, *mec* e do repertório de determinantes de resistência (Figura 1; adaptada de DEURENBERG & STOBBERINGH, 2008). Os SCC*mec* dos tipos I, IV e V, VI, VII e VIII carregam o *mecA* como único gene de resistência (HIRAMATSU *et al.*, 2002; HIGUCHI *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2009) . Em contraste, os SCC*mec* tipo II e III determinam multiresistência, uma vez que carregam elementos genéticos móveis como plasmídeos (pUB110, pI258, pT181) e transposons (Tn554), os quais podem conter genes de resistência a antimicrobianos e metais pesados (HIRAMATSU *et al.*, 2000). Os cassetes *mec* também podem carrear elementos de inserção, como o IS431 e IS257 (Tabela 1).

Cepas contendo SCC*mec* tipo I foram primeiramente isoladas no Reino Unido, em 1961, dois anos após a introdução da metilina na indústria farmacêutica. Os tipos II e III de SCC*mec* (53 Kb e 67Kb, respectivamente) foram associados a cepas

predominantes na década de 1980. Esses três tipos de *SCCmec* tem sido predominantemente isolados em cepas de MRSA associadas a infecções nosocomiais (ITO *et al.*, 2001). Já o *SCCmec* tipo IV (21-24,3Kb) tem sido encontrado, principalmente, em cepas de MRSA que vem emergindo em infecções na comunidade (CA-MRSA, do inglês *community acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus*), em diversos países, incluindo os EUA, França, Suíça, Portugal, Holanda, Austrália, Nova Zelândia, Brasil, Itália, dentre outros (ITO *et al.*, 2001; DAUM *et al.*, 2002; VANDENECH *et al.*, 2003 RIBEIRO *et al.*, 2005). Além disso, este tipo de elemento também pode ser encontrado em clones de MRSA associados a infecções hospitalares, conhecidos como clone pediátrico e EMRSA-15 (AIRES DE SOUZA *et al.*, 2005; CONCEIÇÃO *et al.*, 2010). Já o *SCCmec* tipo V apresenta cerca de 28Kb e foi detectado em algumas amostras de CA-MRSA (COOMBS *et al.*, 2004; ITO *et al.*, 2004; O'BRIEN *et al.*, 2005). O *SCCmec* tipo VI (21Kb) apresenta um *ccrAB* alotipo 4, diferente de todos os descritos. Até o momento, este tipo de *SCCmec* só foi encontrado em amostras pertencentes ao clone pediátrico isoladas em hospitais de Portugal e da França (OLIVEIRA, MILHEIRIÇO & LENCASTRE, 2006; DAUWALDER *et al.*, 2008). O *SCCmec* tipo VII (35,9Kb) foi encontrado em amostras de MRSA associadas a infecções comunitárias em Taiwan e pertencentes ao ST59 (ST, seqüência tipo; do inglês: *sequence-typing*). Este novo tipo é homólogo ao *SCCmecV*, porém com certas modificações e inserções de elementos genéticos (HIGUCHI *et al.*, 2008). Recentemente, foi descrito um novo tipo de *SCCmec*, denominado *SCCmecVIII* (32 kb). Este tipo foi encontrado em amostras epidêmicas tipicamente hospitalares, isoladas no Canadá e possui uma combinação única dos complexos *mecA* e *ccr* (ZHANG *et al.*, 2009). Variantes dos tipos principais de *SCCmec* têm sido descritas. As variações são baseadas principalmente na presença ou ausência de elementos genéticos móveis no cassete (OLIVEIRA & LENCASTRE, 2002; SHORE *et al.*, 2005; MILHEIRIÇO, OLIVEIRA & LENCASTRE, 2007).



Estudos de sequenciamento de *S. aureus* vem revelando a presença de profagos em seu genoma (HOLDEN *et al.*, 2005; BABA *et al.*, 2008; PLATA, ROSATO & WEGRZYN, 2009). Alguns desses vírus bacterianos carregam genes que codificam para toxinas como a estafiloquinase, enterotoxina A e para a leucocidina de Pantón-Valantine (PVL), esta última, normalmente ocorre em cepas de MRSA relacionadas a infecções comunitárias (CA-MRSA) e tem sido associada a casos de infecções estafilocócicas graves, como fascite necrozante e quadros de pneumonia hemorrágica com necrose (VOYICH, 2006; LAMBADEIRA-REY *et al.*, 2007). A PVL leva à formação de poros nas membranas dos leucócitos, sendo também citotóxica para outros tipos celulares (LAMBADEIRA-REY *et al.*, 2007). Esta leucocidina é formada por duas subunidades: LukS-*pv* e LukF-*pv*, as quais são codificadas por dois genes denominados *lukS-pv* e *lukF-pv*, que estão localizados em um profago ( $\Phi$ Sa2mw) inserido no cromossoma dos *S. aureus* (KANEKO & KAMIO, 2004). Apesar de vários trabalhos atribuírem um papel para a PVL em casos graves de infecções por amostras de CA-MRSA, seu papel na virulência em modelos experimentais é controverso (VOYICH *et al.*, 2006; BUBECK *et al.*, 2008).

1.1.2. Clones de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina associados aos hospitais (HA-MRSA)

A multiresistência adquirida pelos *S. aureus* emergiu de forma acelerada. Estima-se que na década de 1970 somente 2% destes microrganismos eram MRSA. Já em 2004, nos EUA, 60% dos *S. aureus* isolados em unidades de terapia intensiva eram MRSA (NNIS, 2004). A literatura aponta que a partir do início da década de 1990 ocorreu uma rápida e crescente disseminação de amostras de *S. aureus* apresentando elevada multiresistência a antimicrobianos (AL-MASSAUD, DAY & RUSSEL, 1991; TEIXEIRA *et al.*, 1995; CHAMBERS, 1997). Acredita-se que esta acelerada evolução bacteriana seja resultante, principalmente, da pressão seletiva decorrente da imensa quantidade de agentes antimicrobianos que são utilizados na prática médica (OLIVEIRA, TOMASZ & LENCASTRE, 2001).

Os MRSA tornaram-se o principal patógeno hospitalar em termos de incidência e gravidade das infecções, sendo importantes agentes etiológicos de pneumonias e bacteremias nosocomiais (SCHABERG, CULVER & GAYNES, 1991; RODRÍGUEZ-

BAÑO *et al.*, 2008). É importante citar que a disseminação dos MRSA associados a infecções hospitalares (HA-MRSA; do inglês: *hospital-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus*) é de proporção mundial. Clones específicos de MRSA são capazes de se disseminar através dos continentes, podendo, desta forma, causar infecções nosocomiais de natureza pandêmica (TEIXEIRA *et al.*, 1995; SOUZA *et al.*, 1998; COIMBRA *et al.*, 2000; SOARES *et al.*, 2001; COIMBRA *et al.*, 2003; RODRÍGUEZ-BAÑO *et al.*, 2008).

Amostras de MRSA geneticamente muito semelhantes ou mesmo iguais (mesmo tipo clonal) quanto ao padrão de PFGE (do inglês: *pulsed-field gel electrophoresis*; TENOVER *et al.*, 1995, TENOVER *et al.*, 1997); MLST (do inglês: *multilocus sequencing typing*; ENRIGHT *et al.*, 2000), o qual define a sequência-tipo (ST) e complexo clonal (CC) da amostra analisada; tipo do SCC*mec* (BOYE *et al.*, 2007) e de polimorfismos dos genes que codificam para a proteína A, por exemplo (gene *spa*, FRENAY *et al.*, 1996), tem sido detectadas como agentes etiológicos de infecções nosocomiais em vários países do mundo. Essa semelhança genotípica ressalta uma característica evolucionária importante observada nas populações de MRSA, que é sua distribuição em uma estrutura altamente clonal (FENG *et al.*, 2008). Assim, vê-se que um grande número de infecções adquiridas em hospitais é causado por alguns poucos clones específicos de HA-MRSA, sendo estes reconhecidos como um sério problema de saúde pública (DEURENBERG & STOBBERINGH, 2008; KENNEDY *et al.*, 2008).

Os principais clones de MRSA relacionados a infecções nosocomiais pandêmicas são o clone Ibérico (CI ou USA500), o clone pediátrico (CP ou USA 800), o clone Nova Iorque/Japão (CNI/J ou USA 100), os clones EMRSA 15 e EMRSA 16 (este último também chamado USA 200), e o clone epidêmico brasileiro/húngaro (BEC/CH; Tabela 2). O clone húngaro, na realidade, é um variante do BEC, detectado inicialmente na Hungria, que se diferencia deste por possuir uma variação no SCC*mec* (o plasmídeo pT181 substituindo o plasmídeo pI258). Devido a essa diferença, o CH foi classificado como SCC*mec*III, enquanto o BEC foi considerado SCC*mec*IIIA (OLIVEIRA & LENCASTRE, 2002; DEURENBERG & STOBBERINGH, 2008).

O clone Ibérico, classificado como ST247-SCC*mec* IA (ST; do inglês: *sequence typing*) e, portanto, pertencendo ao complexo clonal (CC) 8 foi detectado, inicialmente, causando um surto num hospital de Barcelona, Espanha, em 1989 (DOMINGUEZ *et al.*, 1994; FERRY *et al.*, 2006). Posteriormente, o CI foi encontrado também em hospitais de

Portugal, Itália, Bélgica, Escócia, Alemanha, Áustria, República Tcheca, Dinamarca, França, Estados Unidos, entre outros (SANCHES *et al.*, 1995; OLIVEIRA *et al.*, 1998; SOUZA *et al.*, 1998; DEURENBERG & STOBBERINGH, 2008).

No ano de 1999, Sá-Leão e colaboradores descreveram a emergência de outro clone de MRSA, que foi denominado clone pediátrico ou USA 800 (ST5-SCC*mec*IV ou VI; CC5), causando infecções em crianças em hospitais localizados em Portugal, Polônia, Argentina, Colômbia e Estados Unidos. Amostras relacionadas ao USA 800 foram também isoladas de profissionais de saúde e pacientes infectados no Brasil (MELO *et al.*, 2004; MIRANDA *et al.*, 2007). O CP, diferentemente de outros HA-MRSA, não apresenta multiresistência aos antimicrobianos como uma das principais características envolvidas na sua dispersão no ambiente hospitalar, já que normalmente é susceptível aos antibióticos não  $\beta$ -lactâmicos

O clone Nova Iorque/Japão ou USA 100 (ST5-SCC*mec*II; CC5), geneticamente relacionado ao CP, foi detectado, inicialmente, nas cidades de Nova Iorque e Tóquio e, posteriormente, em vários hospitais nos EUA, Canadá, Portugal e no Brasil (COIMBRA *et al.*, 2003; FERRY *et al.*, 2006; AMORIM *et al.*, 2007; SOUSA-JUNIOR *et al.*, 2009).

Amostras pertencentes aos clones designados como EMRSA 15 (ST22- SCC*mec*IV; CC22) e EMRSA 16 (USA 200, ST36-SCC*mec*II, CC30), apresentam epidemiologia muito similar, sendo responsáveis por infecções nosocomiais em regiões européias como Reino Unido e em países como Portugal, Espanha, Alemanha, Bélgica, Dinamarca, Holanda, Austrália e México (MURCHAN *et al.*, 2003, AMORIM *et al.*, 2007; CUEVAS *et al.*, 2007). Em relação ao EMRSA 15, foi demonstrado em um estudo que o mesmo foi capaz de suplantar o clone epidêmico brasileiro (CEB ou BEC, do inglês *brazilian epidemic clone*), predominante em zonas portuárias de Portugal (AIRES DE SOUZA, *et al.*, 2005).

Finalmente, o BEC (ST239-SCC*mec* IIIA e CC8), que foi inicialmente detectado em hospitais de todo o Brasil (TEIXEIRA *et al.*, 1995), foi, posteriormente, encontrado em hospitais da Argentina, Uruguai, Paraguai, Chile, Portugal, Itália, República Tcheca, Austrália, Irlanda, Singapura, Coreia, Alemanha, Polônia, Espanha, Argélia, Áustria, Eslovênia, Estados Unidos, Finlândia, República da Geórgia, Grécia, Holanda, Indonésia, Índia, Mongólia, Reino Unido, Sri Lanka, Suécia, Tailândia e Vietnã, sendo

o clone de MRSA de maior disseminação em todo o mundo (OLIVEIRA *et al.*, 1998; MELTER *et al.*, 1999; COIMBRA *et al.*, 2003; SOUZA *et al.*, 2003; SHORE *et al.*, 2004; COOMBS *et al.*, 2005; LUCZAK- KADLUBOWSKA, SOO KO *et al.*, 2005; WISPLINGHOFF *et al.*, 2006; POTEL *et al.*, 2007; BARTELS *et al.*, 2008).

Devido ao fato da maioria dos clones de MRSA disseminados internacionalmente em hospitais apresentar, frequentemente, multiresistência a drogas, o antibiótico de escolha para o tratamento das infecções associadas a esses microrganismos ainda é a vancomicina. O uso dessa droga requer a internação do paciente, pois a mesma é administrada na forma intravenosa, o que aumenta os custos do tratamento (LYER & HITTINAHALLI, 2008). Porém, no final da década de 1980, foram encontradas as primeiras cepas de enterococos apresentando perfil de elevada resistência aos antimicrobianos glicopeptídeos, como a vancomicina e a teicoplanina. Esta resistência é adquirida normalmente através de plasmídios carreando um transposon conjugativo da família do Tn1546 e os genes *vanA* ou *vanB* (NICAS *et al.*, 1989; SIERADZKI & TOMASZ, 1997). A partir daí, surgiu, então, a preocupação de que os enterococos pudessem transferir tais genes de resistência para o MRSA (BRAKSTAD & MAELAND, 1997). De fato, nos anos de 2002 e 2004, foram descritas nos EUA as primeiras amostras de *S. aureus* resistente à vancomicina, denominadas VRSA (do inglês: *vancomycin-resistant Staphylococcus aureus* (CDC, 2004; TENOVER *et al.*, 2004; WHITENER *et al.*, 2004). Felizmente, a publicação de relatos sobre a emergência de VRSA em outros países têm sido rara (TIWARI & SEN, 2006; WEIGEL *et al.*, 2007 e SAHA *et al.*, 2008) e, até o momento, não houve registro de isolamento de amostras de VRSA no Brasil.

### 1.1.3. MRSA associados a infecções na comunidade (CA-MRSA)

No final dos anos de 1980-90, amostras de MRSA emergiram causando infecções tipicamente comunitárias, primeiramente na Austrália e posteriormente em outros países. Essas infecções inicialmente ocorreram em indivíduos imunocompetentes que não apresentavam riscos clássicos para infecção por MRSA, como por exemplo, história prévia de exposição a serviços de saúde. Amostras de CA-MRSA divergem fenotipicamente e genotipicamente das amostras comumente conhecidas como HA-MRSA. Diferente das HA-MRSA, a maioria das amostras de CA-MRSA é frequentemente susceptível a muitos antibióticos não  $\beta$ -lactâmicos (VANDENESH *et*

*al.*, 2003). Além disso, muitas dessas amostras produzem a leucocidina de Pantone-Valantine (PVL) e apresentam SCC*mec* tipo IV, V, VII e VIII (LABANDEIRA-REY *et al.*, 2007; DEURENBERG & STOBBERINGH, 2008; ZANG *et al.*, 2009).

O primeiro relato de uma cepa CA-MRSA foi publicado em 1993, no oeste australiano, em pacientes aborígenes de comunidades remotas (UDO, PEARMAN & GRUBB, 1993). Essas bactérias foram isoladas de indivíduos saudáveis que apresentavam simples infecções cutâneas, mas que não possuíam riscos conhecidos para infecções por MRSA. Assim, o chamado clone *Western Austrália 1* (WA-1; ST1-SCC*mec* IV, CC1 e geralmente PVL negativo) foi a primeira linhagem de CA-MRSA descrita naquele país (UDO, PEARMAN & GRUBB, 1993; DAILEY *et al.*, 2005). Em seguida, dois outros clones de CA-MRSA emergiram na Austrália: o clone *Queensland* (ST93-SCC*mec* IV, CC93; PVL positivo) e o clone USA 1100 ou OSPC (Tabela 2; do inglês: *Oceania southwest pacific clone*; ST30-SCC*mec*IV, CC30, PVL positiva). Posteriormente, amostras de MRSA comunitárias disseminaram-se para outros países, causando infecções bem documentadas nos Estados Unidos, Suíça, Japão, Taiwan, Espanha, Itália, Brasil, entre outros (CHEN & HUANG, 2005; HARBARTH *et al.*, 2005; RIBEIRO *et al.*, 2005; TAKIZAWA *et al.*, 2005; MANZUR *et al.*, 2008; VALENTINI *et al.*, 2008; SCRIBEL *et al.*, 2009).

Posteriormente, dois outros clones CA-MRSA emergiram na comunidade. Nos Estados Unidos, os chamados USA 300 (ST8-SCC*mec*IV; CC8; PVL positiva) e USA 400 (ST1-SCC*mec* IV; CC1; PVL positiva) foram associados a infecções estafilocócicas graves, incluindo fascite necrozante, pneumonia e sepsis (Tabela 2; GILLET *et al.*, 2002; ADEM *et al.*, 2005; MILLER *et al.*, 2005, TENOVER *et al.*, 2006).

Amostras pertencentes ao USA 300 já foram descritas causando surtos em diversas localidades dos Estados Unidos. Recentemente, foi detectada uma variante multirresistente, relacionada a este clone, causando predominantemente infecções de pele e tecidos moles em homossexuais do sexo masculino (DIEP *et al.*, 2008; KENNEDY *et al.*, 2008; O'HARA *et al.*, 2008). Além disso, foi observado que, aproximadamente, 50% das amostras de MRSA comunitárias isoladas de infecções de pele e tecido mole nos Estados Unidos pertenciam ao clone USA 300 (MORAN *et al.*, 2006). Já o clone USA 400 foi identificado, inicialmente, como responsável pelo óbito de quatro crianças, de localidades diferentes nos Estados Unidos, em 1999. Amostras pertencentes a este clone (anteriormente denominado MW2) foram responsáveis por

uma série de infecções no Canadá, em índios americanos e em surtos ocorridos na maternidade de um hospital em Nova Iorque (ROMAM *et al.*, 1997; SAIMAN *et al.*, 2003).

Atualmente, clones de CA-MRSA relacionados ao USA 300 e USA 400 continuam a ser detectados não apenas nos Estados Unidos, como também em vários outros países, como Austrália, Canadá, Bélgica, França, China, Uruguai, Alemanha, Suíça, Brasil entre outros (RIBEIRO *et al.*, 2005; DEURENBERG & STOBBERINGH, 2008). No Brasil, o primeiro relato de infecção por CA-MRSA foi feito pelo nosso grupo, em 1995, no estado de Porto Alegre. O principal CA-MRSA envolvido apresentava ST30-SCC*mec* IV e produção de PVL (RIBEIRO *et al.*, 2005).

Cabe ressaltar que representantes típicos de CA-MRSA estão sendo responsáveis também por infecções entre pacientes sob cuidados de serviços de saúde ou hospitalizados. Provavelmente, indivíduos com infecções comunitárias graves e que necessitam de hospitalização por longo período de tempo possam ser fontes de transmissão de clones de CA-MRSA, fazendo com que tais cepas se tornem endêmicas em instituições de saúde (GONZALES *et al.*, 2006). Relatos envolvendo amostras dos clones USA 300 e USA 400 causando infecções associadas aos serviços de saúde tem sido publicados periodicamente (SAIMAN *et al.*, 2003; SHELBURNE *et al.*, 2004; GONZALES *et al.*, 2006). No Brasil, um recente trabalho de nosso grupo aponta uma elevada incidência de amostras pertencentes ao clone USA 400 em hospitais do Rio de Janeiro (SILVA-CARVALHO *et al.*, 2009), sugerindo, assim, uma grande capacidade de disseminação e adaptação destas amostras. Assim, o que vem sendo observado na literatura é que a prevalência de amostras com características típicas de CA-MRSA vem crescendo consideravelmente e que estas cepas podem substituir as HA-MRSA em instituições de saúde (HUANG *et al.*, 2007; MAREE *et al.*, 2007; SCRIBEL *et al.*, 2009).

## 1.2. Tipagem molecular de MRSA

Como citado anteriormente, uma característica evolucionária importante de populações de MRSA é a sua distribuição em uma estrutura altamente clonal (FENG *et al.*, 2008). Com base nessa informação, para melhor se estudar a epidemiologia local ou global dos MRSA, diversos métodos de tipagem molecular vem sendo utilizados, sendo os mais utilizados o PFGE (do inglês: *pulsed-field gel electrophoresis*), o MLST (do

inglês: *multilocus sequence typing*) e as tipagens direcionadas para o *SCCmec*, o *spa* (gene que codifica para proteína A) e do *agr* (lócus regulador de um importante sistema de *quorum-sensing* de *S.aureus*). A tabela 2 relaciona os principais clones de MRSA às suas características moleculares, detectadas pelas técnicas de genotipagem citadas acima, com exceção da tipagem *spa*.

### 1.2.1. PFGE

O PFGE é uma das metodologias mais discriminativas (TENOVER, 1995; MCDOUGAL *et al.*, 2003) e consiste na digestão do cromossomo bacteriano por uma endonuclease de restrição de corte pouco freqüente (geralmente a *SmaI*). O DNA fragmentado é depositado em um gel e separado em um aparato de eletroforese de campos elétricos alternados. Os perfis de fragmentação do DNA são analisados, segundo Tenover e colaboradores (1995) tomando-se como base o perfil da amostra mais frequente no surto (amostra epidêmica). Neste esquema, as bactérias que gerarem o mesmo padrão da amostra epidêmica definem o tipo de PFGE (pulsotipo), representado por uma letra maiúscula. Aquelas que apresentarem de 1 a 6 diferenças no PFGE definem os subtipos, os quais são representados por índices numéricos subscritos após a letra que define o tipo. As amostras bacterianas diferindo em um único evento genético no sítio da *SmaI* (uma a três bandas diferentes) são consideradas como, provavelmente relacionadas ao surto em questão; amostras diferindo de quatro a seis bandas (representando duas alterações genéticas independentes em sítios da enzima) são consideradas possivelmente relacionadas, e amostras bacterianas contendo seis ou mais bandas (representativas de três ou mais alterações genéticas), são alocadas em outro pulsotipo de PFGE e, consideradas, como provavelmente não envolvidas no surto estudado (TENOVER *et al.*, 1995). Análises de PFGE podem ser também realizadas com o auxílio de softwares de bioinformática, principalmente se um grande número de amostras for analisado (MCDOUGAL *et al.*, 2003). Apesar desta técnica ser bastante discriminativa e muito utilizada em estudos de surtos e clonalidade, a mesma apresenta algumas desvantagens, como a dificuldade de correlacionar, de forma precisa, os diferentes perfis de fragmentação genômica obtidos em diferentes laboratórios, e o fato de ser laboriosa e de custo elevado.

### 1.2.2. MLST

O MLST (do inglês: *multilocus sequence typing*) é atualmente um método de tipagem molecular muito utilizado e fundamenta-se em *S. aureus* no sequenciamento de regiões internas de 7 genes metabólicos, constitutivamente expressos pela bactéria (*arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi* e *yqiL*). As proteínas codificadas por estes genes estão listadas na tabela 3. Para cada um desses genes, sequências diferentes (com pequenas variações de nucleotídeos) são referidas como alelos. O conjunto formado pelos diferentes alelos, de cada um dos 7 *loci*, fornece o perfil alélico que define, por sua vez, a sequência-tipo (ST) da amostra analisada. Amostras que apresentem o mesmo perfil alélico para 5 dos 7 *loci* são ditas como pertencentes ao mesmo complexo clonal (CC; ENRIGHT *et al.*, 2000).. A partir dessa nova abordagem, clones epidêmicos de MRSA, anteriormente nomeados de acordo com a região onde foram primeiramente detectados (como exemplo, o clone USA 100) ou de acordo com o grupo de pacientes dos quais foram isolados (como exemplo, o clone pediátrico) passaram a ser designados por sua ST e também pelo seu tipo de SCC $mec$  (ENRIGHT *et al.*, 2000).

Uma importante vantagem desta técnica é o fato de estar acoplada a um robusto banco de dados, com sequências submetidas de inúmeras instituições do mundo inteiro. No caso de obtermos um perfil de PFGE nunca observado para uma determinada amostra, o MLST pode definir com precisão se o mesmo é referente a algum clone já genotipado por esta técnica ou se representa um novo complexo clonal. No entanto, esta metodologia apresenta algumas desvantagens, primeiramente em relação ao fato de possuir custo elevado, já que envolve o sequenciamento automático de parte de 7 *loci* do genoma de *S.aureus*. Além disso, esta técnica, por si só, não pode diferenciar dois clones que pertençam ao mesmo ST e CC, como os clones USA 100 e USA 800, que fazem parte do ST5 e CC5. Portanto, é necessária, nestes casos, a adicção de uma ou mais metodologias de genotipagem, de forma que clones de MRSA diferentes, tanto sob o ponto de vista epidemiológico como genético, possam ser corretamente discriminados.

**Tabela 3.** Proteínas codificadas pelos genes utilizados na tipagem MLST. Adaptado de Cockfield e colaboradores, 2000.

Gene	Proteína
<i>arcC</i>	Carbonato quinase
<i>aroE</i>	Shiquimato desidrogenase
<i>glpF</i>	Glycerol quinase
<i>gmk</i>	Qualinato quinase
<i>pta</i>	Acetiltransferase fosfato
<i>tpi</i>	Triosefosfato isomerase
<i>ygiL</i>	Acetil coenzima A acetiltransferase

### 1.2.3. Tipagem do *SCCmec*

O *SCCmec* compreende o complexo *mec*, contendo o gene *mecA* e seus reguladores: *mecI* e *mecRI*; o complexo de genes *ccr*, que codifica para recombinases envolvidas na mobilidade deste cassete; e as regiões J (J1, J2 e J3), sendo que estas últimas não são componentes essenciais do cassete, mas podem, eventualmente, carrear algum gene que confere resistência a antimicrobianos. A região J1 está a montante do complexo *mec*; a região J2 está entre o complexo *ccr* e o complexo *mec* e por fim, a região J3, que está adjacente ao complexo *mec*.

Um dos primeiros métodos descritos para tipagem do *SCCmec* foi realizado em 2002, por Oliveira e de Lencastre. Este método baseia-se na amplificação de seis *loci* específicos dentro do complexo *mec* (*loci* A, B, C, D, E F; OLIVEIRA & DE LENCASTRE *et al.*, 2002). O *locus* A é específico para o *SCCmec* tipo I, o *locus* B específico para o tipo II; o *locus* C encontrado nos tipos II e III; o *locus* D presente nos tipos I, II e IV; o *locus* E encontrado no tipo III e, por fim, o *locus* F, também específico para o tipo III. Esta estratégia é bastante útil para classificação dos *SCCmec* do tipo I ao IV. Uma atualização desta técnica foi realizada em 2007, por Milheiriço e colaboradores para melhor caracterizar o *SCCmec* tipo IV, além dos tipos V e VI, que foram identificados recentemente. Além da amplificação de *loci* específicos do complexo *mec*, as regiões J e o complexo *ccr* também são amplificados, aumentando,

desta forma, a especificidade de identificação do SCC*mec*IV, V e VI (Milheiro *et al.*, 2007). Posteriormente, Chen e colaboradores descreveram um novo multiplex para tipagem rápida de SCC*mec*, de forma a incluir a detecção dos SCC*mec*VII e SCC*mec*VIII, recentemente descritos. (CHEN *et al.*, 2009).

#### 1.2.4. Tipagem *spa*

Esta técnica, desenvolvida por Frenay e colaboradores em 1996, determina os polimorfismos da região X do gene *spa* (2150 pb) que codifica para a proteína A. Esta proteína é bastante importante nos mecanismos de evasão dos *S. aureus*, visto que se liga à porção Fc de anticorpos da classe IgG, inibindo a opsonização da bactéria (FRENAY *et al.*, 1996). A proteína A é dividida em duas regiões principais: uma porção ligadora de Fc (denominada região X) e uma região no terminal carboxi, que fica exposta na parede celular deste patógeno. A região X, que é bastante polimórfica, é composta por repetições de 24 pb. Esta metodologia, baseada na detecção dos polimorfismos desta região, possui bom poder discriminativo, sendo rotineiramente utilizada em estudo sobre evolução molecular e surtos de infecções hospitalares por MRSA (FRENAY *et al.*, 1994, FRENAY *et al.*, 1996). Como esta técnica requer o sequenciamento de apenas um locus (o *spa*), é menos laboriosa e de menor custo quando comparada ao MLST, por exemplo. Mas, de qualquer forma, necessita de equipamentos caros para o sequenciamento de DNA.

#### 1.2.5. Detecção do *agr*

O locus *agr* codifica um sistema de *quorum sensing* que promove uma regulação negativa de proteínas de superfície envolvidas na colonização do hospedeiro, e modula positivamente a expressão de proteínas extracelulares envolvidas na agressão ao hospedeiro (NOVICK *et al.*, 1999; ZHANG *et al.*, 2002; BOLES & HORSWILL, 2008). A estrutura do locus *agr* é constituída de duas regiões divergentes de transcrição que codificam os RNA conhecidos como RNAII e RNAIII. O RNAIII é a molécula efetora do locus *agr* dos estafilococos, sendo responsável pela regulação em *trans* de diversos fatores de virulência. Já o RNAII compreende quatro genes: *agrB*, *D*, *C* e *A*. O gene *agrD* codifica para uma proteína que dá origem ao peptídeo autoindutor do sistema Agr, conhecido como AIP (AIP, do inglês: *autoinducing peptide*) ou peptídeo Agr

(JARRAUD *et al.*, 2000). Os peptídeos indutores, produzidos a partir do locus *agr*, possuem algumas variações na seqüência de aminoácidos e nos domínios histidinaquinase de seus receptores. A partir dessas diferenças foram determinados, até o momento, quatro tipos polimórficos de *agr*: *agr*I, II, III e IV (JARRAUD *et al.*, 2000).

A identificação do tipo de polimorfismos *agr* (I, II, III ou IV) em amostras de MRSA tem sido também muito utilizada como metodologia de genotipagem, já que determinados clones carregam um tipo específico de *agr*. Por exemplo, os clones BEC, Ibérico e EMRSA 15 carregam polimorfismo *agr* tipo I; os clones USA 100 e USA 800 carregam o tipo II; os clones USA 300, USA 400, USA 1100 e EMRSA 16 o *agr* tipo III e o USA 600 os tipos I ou IV (Tabela 2; JARRAUD *et al.*, 2000; STROMMINGER *et al.*, 2003; MONECKE *et al.*, 2007; ROSSNEY *et al.*, 2007).

#### 1.2.6. Detecção de linhagens internacionais de MRSA baseada em amplificações por multiplex PCR de genes do sistema de restrição e modificação de *S. aureus*

Recentemente, um teste rápido e menos dispendioso foi desenvolvido por Cockfield e colaboradores (2007) visando alocar os MRSA em complexos clonais (de acordo com o MLST). Este método foi chamado de teste RM (do inglês: *restriction modification test*) e baseia-se na amplificação de dois genes de *S. aureus* da família *hsdS*: os genes *sauIhds1* e *sauIhds2* (COCKFIELD *et al.*, 2007). Foi observado que esses genes são bastante conservados entre linhagens de *S. aureus* e que codificam para o sistema de restrição tipo I, desempenhando, portanto, um papel fundamental no controle de trocas genéticas entre esses microrganismos (WALDRON & LINDSAY, 2006). Assim, *sauIhds1* e *sauIhds2* são marcadores moleculares estáveis e qualquer variação no polimorfismo desses marcadores pode ser um indicativo de uma possível linhagem emergente. Cada gene contém uma região conservada 5' e uma região central e uma extremidade 3' com duas regiões polimórficas entre linhagens diferentes (COCKFIELD *et al.*, 2007). Três ensaios de PCR (testes RM 1, 2 e 3) foram desenvolvidos, sendo que cada um contém um iniciador direto e dois reversos. Portanto, cada reação poderá levar a três possíveis resultados (ausência de amplificação ou um dos produtos amplificados). Assim, uma correlação pode ser feita entre o produto obtido nessas reações de PCR e o complexo clonal (CC) no qual cada amostra analisada encontra-se inserido (Tabela 4). Estes CC são referentes aos clones de MRSA mais frequentes em hospitais no mundo todo (CC1, CC5, CC8, CC22, CC30 e CC45).

**Tabela 4.** Complexo clonal (CC) e tamanho esperado dos produtos de amplificação (pb) no teste RM (adaptado de Cockfield e colaboradores, 2007).

Complexo clonal (CC)/ ST (Sequence Typing)	Teste RM 1	Teste RM 2	Teste RM 3	posição dos iniciadores	
	iniciadores <i> fwd: AF,  rev: AR22, AR30</i>	iniciadores <i> fwd: AF,  rev: AR1, AR45</i>	iniciadores <i> fwd: BF  rev: BR5, BR8</i>	<i> sau1/hsdS1</i>	<i> sau1/hsdS2</i>
CC30 / ST36	203 pb	-	-		
CC22	990 pb	-	-		
CC45	-	722 pb	-		
CC1	-	1037 pb	680 pb		
CC8/239	-	-	680 pb		
CC5	-	-	1071 pb		

Como mostrado na tabela 4, amostras CC30 e CC22 devem apresentar um fragmento amplificado, no teste RM 1, de 203 e 990 pares de base, respectivamente. Amostras CC45 apresentarão um produto amplificado de 722 pb no teste RM 2. Cepas que apresentarem fragmentos amplificados em dois testes (RM 2 e RM 3) de 1037 pb e 680 pb, respectivamente, serão classificadas como CC1. Amostras CC8 e CC5 deverão apresentar segmentos amplificados pelo teste RM 3 de 680 pb e 1071 pb, respectivamente.

Estes testes apresentam como vantagens a rapidez com que são realizados, já que a identificação do complexo clonal das amostras é feita através de PCR, que é uma técnica mais rápida, quando comparada a um PFGE ou MLST, por exemplo. No entanto, estes testes, assim como o MLST, são incapazes de diferenciar linhagens de um mesmo complexo clonal. Como exemplo, podemos citar os clones USA 800 e USA 100 que são ST5 e CC5. Para diferenciá-los, é necessário a adição de outro método molecular, como por exemplo, a tipagem *SCCmec*. O USA 100 carrega o tipo II enquanto que o clone USA 800 carrega o tipo IV. Diferentemente do MLST, esta é uma técnica menos laboriosa e de custo mais acessível.

Assim, o teste RM apresenta claras vantagens no sentido de permitir uma triagem rápida de MRSA, principalmente, quando um número elevado de amostras necessita ser testado. A validação de técnicas como estas é de extrema importância dada a relevância dos MRSA como um patógeno hospitalar de disseminação global.

**Tabela 2.** Principais clones de MRSA disseminados no mundo e importantes características moleculares a eles associadas.

Clone <sup>a</sup>	Sequência-tipo (ST) <sup>b</sup>	Complexo Clonal (CC) <sup>b</sup>	SCCmec <sup>c</sup>	agr <sup>d</sup>
USA 100 (Clone Nova Iorque/Japão; NI/J)	5	5	II	II
USA 200 (EMRSA 16)	36	30	II	III
USA 300	8	8	IV	III
USA 400 (clone MW2)	1	1	IV	III
USA 500 (Clone Ibérico; CI)	247	8	I	I
USA 600 (Clone Berlin)	45	45	II/IV	I/IV
USA 800 (Clone Pediátrico; CP)	5	5	IV	II
USA 1100 ( <i>Oceania southwest pacific clone</i> ; OSPC)	30	30	IV	III
EMRSA 15	22	22	IV	I
BEC	239	8	III	I

<sup>a</sup>Neste trabalho, utilizamos preferencialmente as nomenclaturas iniciadas por USA, com exceção do BEC, do EMRSA 15 e 16.

<sup>b</sup>Perfil alélico baseado no sequenciamento de sete genes conservados (MLST; ENRIGHT *et al.*, 2000).

<sup>c</sup>Tipos polimórficos do SCCmec (BOYE *et al.*, 2007).

<sup>d</sup>Tipos polimórficos do agr (AIRES DE SOUZA *et al.*, 2005).

## **2. Justificativa**

Como citado anteriormente, MRSA estão entre os mais importantes patógenos hospitalares, em vários países, e mais recentemente, tem se destacado como agentes de doenças comunitárias. Esses microrganismos apresentam uma estrutura populacional altamente clonal. Tal clonalidade torna a identificação de linhagens circulantes extremamente complexa e dispendiosa, devido à necessidade de se utilizar métodos sofisticados, envolvendo tecnologias de DNA, quando da ocorrência de um surto por MRSA. Assim, na maioria das vezes, devido à ausência de uma estrutura laboratorial adequada para a realização de genotipagem, estudos epidemiológicos são realizados de forma incompleta ou, simplesmente, não são realizados, refletindo, certamente, em prejuízos para o controle da disseminação desse microrganismo, em nosso meio, e das doenças associadas. Mais recentemente, alguns métodos rápidos e simples para a genotipagem dos MRSA têm sido publicados e, geralmente, envolvem técnicas de PCR. Um desses métodos (teste RM) foi descrito por Cockfield e colaboradores em 2007. Este teste despertou nosso interesse, pois além de simples e rápido, detecta membros dos principais complexos clonais de MRSA circulantes no mundo (CC1, CC5, CC8, CC22, CC30 e CC45). O fato do PCR ser uma técnica relativamente simples, e do termociclador já existir, frequentemente, em laboratórios de microbiologia clínica, nos estimulou a analisar a acúrcia do teste RM, de forma a avaliarmos e validarmos esta simples metodologia, que permite a alocação dos principais clones circulantes de MRSA em complexos clonais, como definidos pelo MLST.

### **3. Objetivos:**

Os objetivos deste trabalho foram (i) avaliar a habilidade do método rápido de genotipagem descrito por Cockfield *et al.*, 2007 (teste RM), para detectar amostras de MRSA circulantes em nosso país, pertencentes aos CC1, CC5, CC8 e CC30, utilizando como padrão de comparação uma combinação de métodos clássicos de tipagem do MRSA (PFGE, tipagem do SCC*mec* e MLST), de forma a aferir a acurácia do primeiro. (ii) Analisar a adição de marcadores clonais, ao teste RM, como antibiograma e certos determinantes genéticos, na tentativa de aumentar a confiabilidade deste teste.

#### *2.1. Objetivos específicos:*

- a. Determinar o perfil de PFGE, após fragmentação do DNA genômico com a enzima *Sma*I, de todas as amostras estudadas, utilizando para comparação os pulsotipos de amostras padrões de MRSA circulantes em nosso país.
- b. Realizar a tipagem SCC*mec* para todas as amostras estudadas através de PCR.
- c. Realizar o MLST em representantes de MRSA de cada CC estudado.
- d. Determinar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos, de todas as amostras estudadas, visando o agrupamento das mesmas em antibiogramas.
- e. Realizar pesquisas *in silico* e na literatura científica visando a seleção de marcadores genéticos que poderiam ser utilizados para a confirmação dos resultados obtidos no teste RM.

## **4. Materiais e Métodos**

### 4.1. Amostras bacterianas e testes de susceptibilidade

As amostras clínicas de MRSA utilizadas neste trabalho fazem parte da coleção do laboratório de Biologia Molecular de Bactérias (IMPPG – UFRJ). Um total de 131 amostras bacterianas foram coletadas em 2007 e 2008, a partir de origens clínicas diversas, como sangue, fragmento de catéter, abscesso cutâneo e secreção traqueal, em hospitais do Estado do Rio de Janeiro.

As amostras padrão USA 100 (ST5-SCC*mec*II; CC5), USA 400 (ST1-SCC*mec*IV; CC1); USA500 (ST8-SCC*mec*I; CC8), foram gentilmente cedidas pelo Dr. Paul Dunman, University of Nebraska Medical Center. Já as amostras representativas do clone BEC (ST239-SCC*mec*III; CC8) e USA 1100 (ST30-SCC*mec*IV; CC30), designadas BMB9393 (TEIXEIRA *et al.*, 1995) e WB69 (RIBEIRO *et al.*, 2005), respectivamente, pertencem à coleção de nosso laboratório. Em relação à amostra referente ao clone USA 600, utilizamos como padrão a amostra 08-23, que foi genotipada neste trabalho como relacionada ao clone USA 600 (ST45-SCC*mec*II; CC45), através das técnicas de PFGE, teste RM, SCC*mec* e MLST.

O perfil de susceptibilidade a antimicrobianos foi determinado na tentativa de se identificar antibiótipos predominantes para os principais clones de MRSA estudados. O teste foi realizado através da técnica de difusão em meio sólido, a partir de discos impregnados com antimicrobianos, conforme recomendado pelo CLSI, 2010. Foram utilizados os seguintes discos: ciprofloxacina (5 µg), clindamicina (2 µg), trimetoprim (1,25 µg) + sulfametoxazol (23,75 µg), eritromicina (15 µg), gentamicina (10 µg), rifampicina (5 µg) e tetraciclina (30 µg). Os discos foram obtidos de Cecon Ltda. (São Paulo, SP, Brasil). A amostra padrão de *S.aureus* ATCC 25923 foi utilizada como controle nos testes de susceptibilidade.

### 4.2. Extração de DNA total

A extração de DNA total foi realizada através da técnica de lise térmica descrita por Pacheco e colaboradores (1997). Amostras foram semeadas através da técnica de esgotamento sobre a superfície de uma placa de petri contendo TSA (Tryptic Soy Agar).

Após incubação por 24 h, a 37°C, uma alçada leve do crescimento bacteriano foi obtida e uma suspensão foi realizada em 3 mL de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM [pH 8,0]). Para a determinação do volume da suspensão de células a ser utilizado na lise térmica (V), a densidade ótica a 600 nm (DO<sub>600</sub>) da suspensão bacteriana diluída a 1:10 foi determinada e aplicou-se a seguinte fórmula:  $V = 80/DO_{600}$ .

O volume calculado foi transferido para um tubo tipo Eppendorf e o sedimento bacteriano, obtido por microcentrifugação (rotação máxima/2 min), foi diluído com 200 µL de TE. Esta suspensão foi fervida por 10 min e, posteriormente, centrifugada por 1 min sob rotação máxima. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e estocado a -20°C, até o momento de uso (PACHECO *et al.*, 1997).

#### 4.3. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O DNA obtido por lise térmica foi amplificado pelo método da reação em cadeia da polimerase (PCR; do inglês: *polymerase chain reaction*), utilizando iniciadores específicos para um fragmento de DNA, correspondente a regiões internas dos genes de interesse. Foram utilizados os seguintes reagentes para as reações de PCR, com um volume final de 25µL: 2,0µL de uma mistura equivalente de dNTPs (250µM, concentração final de cada); 1µL de cada iniciador direto e reverso (as concentrações finais dos iniciadores variaram conforme a reação em questão), 0,625µL de Taq DNA polimerase (0,125U, Gibco); 5µL de DNA molde; 2,5µL do tampão da enzima 10x concentrado, 0,4µL de MgCl<sub>2</sub> (50µM) e 12,5 µL de H<sub>2</sub>O bidestilada estéril.

As ampliações foram realizadas no termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA/USA).

#### 4.4. Eletroforese convencional de DNA

A análise dos produtos de amplificação foi realizada pela migração dos fragmentos em gel de agarose a 1,5% em tampão TAE (Tris acetato 20mM, EDTA 0,5mM [pH 8,0]). A corrida eletroforética foi realizada em tampão TAE a 110V. Após o tempo de corrida, os géis foram tratados com solução contendo brometo de etídio a 0,5 µg/mL. Os produtos da amplificação foram observados em sistema de captação de imagem Bio Imaging System (BioAmerica, Flórida, EUA).

#### 4.5. Tipagem do SCC*mec* através de PCR

O método utilizado para a tipagem do SCC*mec* foi descrito por Boye e colaboradores em 2007. O DNA das amostras foi extraído conforme descrito no item 4.2 e submetido ao multiplex PCR utilizando-se 0,2 µM dos iniciadores β e α3; 0,25 µM dos iniciadores *ccrCF* e *ccrCR*; 0,08 µM dos iniciadores 1271F1 e 1271R1 e 0,01 µM dos iniciadores 5R431 e 5R*mecA* (Tabela 5). As condições para amplificação foram de uma desnaturação inicial de 94°C por 4 min, seguida de 30 ciclos de desnaturação por 30 s a 94°C, anelamento por 60 s a 55°C e extensão por 60 s a 72°C. Ao término dos ciclos, foi realizada uma extensão final de 72°C por 4 min (BOYE *et al.*, 2007). As sequências dos iniciadores utilizados estão listadas na tabela 5. Os amplicons foram visualizados em gel de agarose a 1,5% como descrito no item 4.4. As amostras USA 500, USA 100, BMB9393, USA 400 foram utilizadas como controles-positivo para os SCC*mec* I, II, III e IV.

**Tabela 5.** Sequência dos iniciadores utilizados no multiplex PCR, descrito por Boye e colaboradores, 2007.

Iniciador	Sequência	Tamanho esperado do fragmento (pb) <sup>a</sup>
$\beta$	5' ATTGCCTTGATAATAGCCYTCT 3'	937
$\alpha 3$	5' TAAAGGCATCAATGCACAAACACT 3'	
<i>ccrCF</i>	5' CGTCTATTACAAGATGTTAAGGATAAT 3'	518
<i>ccrCR</i>	5' CCTTTATAGACTGGATTATTCAAAATAT 3'	
1271F1	5' GCCACTCATAACATATGGAA 3'	415
1272R1	5' CATCCGAGTGAAACCCAAA 3'	
5R <i>mecA</i>	5' TATACCAAACCCACAACACTAC 3'	359
5R431	5' CGGCTACAGTGATAACATCC 3'	

<sup>a</sup>Amplificação do DNA das amostras pertencentes ao SCC*mecI* deverão resultar em um produto de 415 pb; das amostras SCC*mecII*, de 937 pb; das amostras do tipo III, de 518 pb; das amostras tipo IV, deverão resultar em dois produtos de 937 pb e de 415 pb, e amostras tipo V deverão também apresentar dois produtos, porém de 518 pb e de 359 pb.

#### 4.6. Detecção do *loci lukSF-pv* através de PCR

Um dos marcadores clonais escolhidos, neste estudo, para validação do teste RM foi a detecção dos genes que codificam para a leucocidina de Panton Valantine. Este teste foi realizado utilizando iniciadores específicos para as duas subunidades da PVL (*lukS-pv* e *lukF-pv*). A sequência nucleotídica do iniciador direto (PVL-1) utilizado foi 5'ATCATTAGGTAAATGTCTGGACATGATCCA3' e do reverso (NPVL-2) 5'GCATCAAGTATTGGATAGCAAAAAGC3' (JARRAUD et al., 2002). A

concentração utilizada de cada iniciador foi de 10µM. As condições de amplificação foram: uma desnaturação inicial de 94°C por 4 min, seguida de 30 ciclos de desnaturação por 30 s a 94°C, anelamento por 60 s a 55°C e extensão por 60 s a 72°C. Ao término dos ciclos, foi realizada uma extensão final de 72°C por 4 min. Os produtos da amplificação foram visualizados conforme descrito no item 4.4. DNA da amostra WB69 foi utilizado como controle positivo.

#### 4.7. Detecção do locus *seh* através de PCR

Outro marcador clonal escolhido foi a detecção do gene que codifica para a enterotoxina H (*seh*). Este teste foi realizado através de PCR, utilizando iniciadores específicos para amplificar o locus *seh*. A sequência do iniciador direto (SEH-1) utilizado foi 5' TCACTACATATGCGAAAGCAG 3' e reverso (SEH-2) 5' CATCTACCCAAACATTAGCAC 3'. O desenho dos iniciadores foi realizado utilizando o programa *primer-blast*, disponível no site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>, tendo como base a sequência do *seh* (GenBank: AB060536.1). A análise dos iniciadores foi realizada utilizando o programa *netprimer*, disponível no site <http://www.premirbiosoft.com>. Foram utilizados 10µM de cada iniciador e as condições para amplificação foram idênticas à descrita no item 4.6. O DNA da amostra USA 400 foi utilizada como controle positivo.

#### 4.8. Detecção do polimorfismo *agr* tipo II através de PCR

A detecção do locus *agr* com polimorfismo tipo II foi outro marcador escolhido e foi realizada através de PCR, utilizando iniciadores específicos para este locus. O desenho dos iniciadores foi realizado utilizando o programa *primer-blast*, tendo como base a sequência dos loci *agrB* e *agrD* da cepa seqüenciada de *S. aureus* Mu50 (NCBI Reference Sequence: NC\_002758.2), apresentando *agr* tipo II. A análise dos iniciadores foi realizada utilizando o programa *netprimer*. A sequência utilizada para o iniciador direto (*agr2F*) foi 5' ATGTGTGCTCATGCAAAGTCTT 3' para o iniciador reverso (*agr2r*) foi 5' CATGTGCATAAATAACAACGG 3'. Foram utilizados 10µM de cada iniciador e as condições para amplificação foram idênticas à descrita no item 4.6. O DNA da amostra USA 100 foi utilizado como controle positivo.

#### 4.9. Genotipagem das amostras de MRSA através do teste RM

O DNA utilizado nas reações de multiplex PCR para o teste RM foi obtido de acordo com o item 4.2. Três ensaios de multiplex PCR foram utilizados, cada um contendo um iniciador direto e dois diferentes iniciadores reversos (Tabela 4). Foram utilizados 0,5 mM de cada iniciador (Tabela 6). As condições para a amplificação foram de uma desnaturação inicial de 94°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 30s a 94°C, 30s a 55°C e 2 min a 72°C (COCKFIELD *et al.*, 2007). Os amplicons obtidos foram visualizados conforme descrito no item 4.4. As amostras BEC e WB69 serviram como controles-positivo dos CC8 e CC30, respectivamente. Já as amostras USA 400 e USA 800 foram utilizadas como controles para os CC1 e CC5, respectivamente. Em relação ao controle positivo do CC45, utilizamos como referência a amostra 08-23.

**Tabela 6.** Iniciadores diretos (*dir*) e reversos (*rev*) que foram utilizados no teste RM, segundo Cockfield e colaboradores (2007).

Iniciador	Tipo	Sequência
AF	( <i>dir</i> )	5' AGGGTTTGAAGGCGAATGGG 3'
AR30	( <i>rev</i> )	5' CAAACAGAATAATTTTTTAGTTC 3'
AR22	( <i>rev</i> )	5' TACGAGCTCAACAATGATGC 3'
AR45	( <i>rev</i> )	5' GGAGCATTATCTGGTGTTC 3'
AR1	( <i>rev</i> )	5' GGGTTGCTCCTTGCATCATA 3'
BF	( <i>dir</i> )	5' CCCAAAGGTGGAAGTGAAAA 3'
BR8	( <i>rev</i> )	5' CCAGTTGCACCATAGTAAGGGGTA 3'
BR5	( <i>rev</i> )	5' TCGTCCGACTTTTGAAGATTG 3'

#### 4.10. Tipagem através do sequenciamento de multilocus enzimáticos (MLST)

DNA das amostras (08-65, 07-39, 07-26, 08-09 e 08-23), apresentando no teste RM CC1, CC5, CC8, CC30 e CC45, respectivamente, foram obtidos de acordo com a metodologia descrita no item 4.2 e para amplificação dos fragmentos internos dos genes

*arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi* e *yqiL* (ENRIGHT *et al.*, 2000) e posterior sequenciamento. Todas as etapas da metodologia do MLST foram realizadas como descrita na página do MLST: <http://saureus.mlst.net/misc/info.asp>. O programa utilizado nas reações de amplificação foi o seguinte: desnaturação de 94°C por 4 minutos, seguido de 30 ciclos de uma desnaturação de 94°C por 30s, anelamento a 55°C por 30 s e uma extensão de 72°C por 90 s. Após o término dos ciclos, foi realizada uma extensão final de 72°C por 4 min. Os iniciadores utilizados foram aqueles descritos no site do MLST, e foram utilizados nas concentrações indicadas.

#### 4.10.1. Purificação dos produtos de PCR

A purificação do produto de PCR foi realizada, utilizando o kit GFX<sup>tm</sup> PCR DNA and Gel Band Purificatin (Amersham Biosciences/ GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido), de acordo com a recomendações do fabricante. O produto purificado foi visualizado por eletroforese em gel, como descrito no item 4.4. O DNA purificado foi quantificado visualmente, comparando-se a intensidade das bandas do marcador de tamanho *low mass* (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia) com as intensidades das bandas obtidas com as diluições realizadas com o DNA amplificado e purificado.

#### 4.10.2. Sequenciamento de DNA

O sequenciamento das duas fitas, direta e reversa, foram realizados no sequenciador automático MegaBACE 1000 (Amersham Biosciences/ GE) utilizando o kit ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequence Ready Reaction (PE Applied Biosystem). As sequências obtidas foram editadas utilizando o software Chromas Lite versão 2.0 ([http://www.technelysium.com.au/chromas\\_lite.html](http://www.technelysium.com.au/chromas_lite.html)) e, posteriormente, alinhadas com o locus ST correspondente, utilizando o programa de informática ClustalW (<http://aling.genome.ip/>) para alinhamentos múltiplos e, estas foram novamente editadas para se aparar a sequência obtida com o fragmento correspondente utilizado na tipagem ST do gene específico. Posteriormente, as sequências editadas dos sete *loci* foram submetidas ao site MLST para análise (<http://saureus.mlst/misc/info.asp>).

#### 4.11. Eletroforese em gel sob campos elétricos alternados (Pulse-Field Gel Electrophoresis; PFGE)

O método utilizado neste estudo foi previamente descrito por Soares e colaboradores em 2001. Resumidamente, o DNA bacteriano foi embocado em agarose de baixo ponto de geleificação e digerido com a endonuclease de restrição *Sma*I. Ao término da digestão enzimática do DNA, um bloco de cada amostra foi posicionado nas canaletas do gel de agarose, preparado a 1% em tampão TBE (Tris-Borato 0,045 M, EDTA 0,001 M, pH:8,0). Os discos contendo os marcadores de peso molecular *lambda ladder* foram colocados nas canaletas localizadas nas duas extremidades do gel (New England, Biolabs, Ipswich, Estados Unidos).

Terminada a aplicação dos discos, as canaletas foram seladas com agarose a 1% em TBE.. O gel foi submetido à eletroforese no sistema CHEF-DR III da BioRad (Richmond, Califórnia), com intervalos de pulsos de 1 a 30 s por 23 h, ângulo de 120°, temperatura de 11,3°C e voltagem de 6,0 volts/cm. O gel foi deixado em uma solução contendo brometo de etídio a 10µg/mL e os fragmentos de DNA visualizados como descrito no item 4.4. Foram utilizadas amostras padrão geneticamente relacionadas aos clones USA 400, USA 100/USA 800, USA 1100 e BEC.

Os padrões de PFGE das amostras foram analisados através de critério visual descrito por Tenover e colaboradores (1995). Desta forma, as amostras que apresentaram o mesmo tamanho e número de fragmentos foram identificadas como pertencentes a um único clone. As cepas apresentando até três bandas de diferença foram classificadas como estreitamente relacionadas; amostras diferindo de quatro a seis bandas foram designadas como possivelmente relacionadas e amostras bacterianas contendo sete ou mais bandas diferentes, representativas de três ou mais alterações genéticas, foram consideradas não correlacionadas (TENOVER *et al.*, 1995).

## **5. Resultados**

### 5.1 Análises da diversidade genômica das amostras de MRSA através da técnica de PFGE

Através da análise do PFGE, utilizando o critério visual descrito por Tenover e colaboradores (1995), 122 do total das 131 amostras estudadas puderam ser, inicialmente, relacionadas aos padrões internacionais de clones circulantes utilizados: 50 foram geneticamente relacionadas ao clone USA 400 norte-americano, o qual tem sido descrito como pertencente à linhagem ST1-SCC*mecIV* e, portanto, alocada no CC1 (Figura 2A, linhas 11, 12 e 14; Figura 2B, linhas 3, 8 e 14); 36 relacionadas ao BEC; clone descrito como pertencente à linhagem ST239-SCC*mecIII*, alocada também no CC8 (Figura 2B, linhas 2, 5, 12 e 13); 17 relacionadas aos clones USA 800 (Figura 2A, linhas 8, e 13; Figura 2B, linha 9) e 2 relacionadas ao clone USA 100, descritos como pertencentes às linhagens ST5-SCC*mecII/IV*, respectivamente, a qual é agrupada no CC5 (Figura 2A, linha 6); 17 amostras relacionadas ao USA 1100, descrito como pertencente à linhagem ST30-SCC*mecIV*, alocada no CC30 (Figura 2A, linhas 3, 5 e 9; e Figura 2B, linha 6). Posteriormente, outras 4 amostras que havíamos classificado como clones esporádicos, foram relacionadas ao clone USA 600, descrito como pertence às linhagens ST45-SCC*mecII/IV*, a qual é agrupada no CC45 (Figura 2A, linha 4; Tabela 7). Finalmente, 5 amostras apresentaram mais de 6 bandas diferentes quando comparadas com os padrões internacionais (07-37, 07-132, 08-17, 08-19 e 08-21). Desta forma, estas amostras foram agrupadas como perfis esporádicos.

### 5.2. Teste RM

O teste RM foi realizado para cada amostra clínica, conforme descrito no item 4.9. Através deste teste, a grande maioria das amostras (129/131, 98%) pode ser alocada em algum complexo clonal, conforme a seguir: CC1 (50 amostras), CC8 (36 amostras), CC5 (19 amostras), CC30 (17 amostras), CC45 (4 amostras, Tabela 7). Dentre as 5 amostras esporádicas, apenas duas não puderam ser tipadas no teste RM, enquanto que uma foi alocada ao CC5 e as outras duas alocadas ao CC8. A figura 3 mostra os resultados dos géis de DNA realizados com amostras padrões para os CC1, CC5, CC8, CC30 e CC45, os quais foram detectados neste trabalho. Todas as 50 amostras que apresentaram perfis

de PFGE compatíveis com o padrão de PFGE da amostra USA 400 norte-americana (menos que seis diferenças no PFGE) foram agrupadas no teste RM como CC1. Do mesmo modo, todas as 19 amostras que apresentaram padrões de PFGE semelhantes ao da representante das amostras USA 100/USA 800 foram alocadas no CC5 pelo teste RM. Similarmente, todas as 36 amostras que apresentaram padrão de PFGE similar ao da amostra BMB9393 (BEC) foram alocadas no CC8. Também observamos que as 17 amostras CC30 apresentaram padrões de PFGE semelhantes ao das amostras PVL positivas WB69, previamente classificadas como relacionadas ao clone USA 1100 (RIBEIRO *et al.*, 2005). Da mesma forma, todas as 4 amostras CC45 testadas apresentaram PFGE semelhante ao da USA 600 (Figura 4, Tabela 7).

### 5.3. Tipagem do SCC*mec*

Apesar de o PFGE ser uma técnica com excelente poder discriminativo, decidimos adicionar outros testes moleculares para aumentar a precisão e a confiabilidade de nossas análises. Além disso, amostras apresentando padrões de PFGE bastante semelhantes podem apresentar diferentes tipos de SCC*mec* e estar envolvidas em eventos epidemiológicos distintos. Um exemplo são as amostras relacionadas ao USA 100 (ST5-SCC*mec*II) e ao USA 800 (ST5-SCC*mec*IV). Deste modo, decidimos realizar a tipagem do SCC*mec*. A Figura 5 apresenta os resultados da tipagem do SCC*mec* para as amostras-padrão. Todas as 50 amostras que apresentaram CC1 (segundo teste RM) e relacionadas ao USA 400, segundo resultados do PFGE, apresentaram SCC*mec*IV. As 36 agrupadas no CC8 e que foram classificadas como BEC no PFGE, apresentaram SCC*mec*III. As 17 amostras classificadas como CC30 e relacionadas ao USA 1100 apresentaram como esperado SCC*mec*IV. Dentre as 19 amostras CC5 e relacionadas aos clones USA 100/800, 17 foram classificadas como SCC*mec*IV (USA 800) e somente 2 como SCC*mec*II (USA 100). As 4 amostras CC45, com padrões de PFGE semelhantes ao do USA 600, apresentaram SCC*mec*II (Tabela 7 e Figura 6). Três amostras apresentando padrões de PFGE esporádicos (1 RM CC5 ou 2 RM não tipáveis), apresentaram SCC*mec*IV. As outras duas amostras com padrões esporádicos e tipadas no teste RM como CC8 apresentaram e SCC*mec*I.

#### 5.4. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos

O perfil de susceptibilidade foi analisado para alguns antimicrobianos na tentativa de se encontrar marcadores que poderiam servir como indicativos da presença de determinados tipos clonais. De fato, a maioria das amostras CC8 (relacionadas ao BEC) apresentou resistência à ciprofloxacina (Cip<sup>R</sup>, 36/36 amostras), sulfametoxazol-trimetropim (SxT<sup>R</sup>, 35/36 amostras), tetraciclina (Tet<sup>R</sup>, 33/36 amostras) e à eritromicina (Eri<sup>R</sup>, 36/36). Sendo assim, o padrão de antibiograma Cip<sup>R</sup> SxT<sup>R</sup> Tet<sup>R</sup> Eri<sup>R</sup>, designado como antibiotipo 1 (AT 1), foi o padrão mais característico deste tipo clonal (32/36; 86%). Entretanto, outros antibiotipos (A2 e A3) foram observados, com menor frequência, para amostras BEC (Tabela 7). Ao contrário do BEC, a maioria das amostras CC30, relacionadas ao CA-MRSA USA 1100, foram mais sensíveis aos antimicrobianos em questão: Cip<sup>S</sup>, 17/17 amostras; SxT<sup>S</sup>, 16/17 amostras; Tet<sup>S</sup>, 17/17 amostras; e Eri<sup>S</sup>, 12/17 amostras, apresentando o padrão AT4 predominante (Cip<sup>S</sup> SxT<sup>S</sup> Tet<sup>S</sup> Eri<sup>S</sup>) e outros antibiotipos (AT5 e AT6) menos prevalentes (Tabela 7). Em relação às amostras CC5 relacionadas ao clone USA 800, foi observado que também apresentaram, da mesma forma que as relacionadas ao USA 1100, ampla susceptibilidade à ciprofloxacina (Cip<sup>S</sup>, 15/17), sulfametoxazol-trimetropim (SxT<sup>S</sup>, 17/17) e tetraciclina (Tet<sup>S</sup>, 15/17), porém essas amostras apresentaram de uma maneira geral resistência à eritromicina (Eri<sup>R</sup>, 13/17), sendo o padrão AT5 predominante (Cip<sup>S</sup> SxT<sup>S</sup> Tet<sup>S</sup> Eri<sup>R</sup>). Outros antibiotipos menos frequentes (AT4, AT7, AT8 e AT9) foram também observados para essas amostras (Tabela 7). As amostras CC1, CC5 e CC45 estudadas, relacionadas aos clones USA 400, USA 100 e USA 600, respectivamente, apresentaram padrões semelhantes de susceptibilidade para essas drogas. USA 400: ciprofloxacina (Cip<sup>R</sup>, 50/50 amostras), sulfametoxazol-trimetropim (SxT<sup>S</sup>, 49/50 amostras), tetraciclina (Tet<sup>S</sup>, 47/50 amostras) e eritromicina (Eri<sup>R</sup>, 47/50 amostras). USA 100: ciprofloxacina (Cip<sup>R</sup>, 2/2 amostras), sulfametoxazol-trimetropim (SxT<sup>S</sup>, 2/2 amostras), tetraciclina (Tet<sup>S</sup>, 2/2 amostras) e eritromicina (Eri<sup>R</sup>, 2/2 amostras), e finalmente USA 600: ciprofloxacina (Cip<sup>R</sup>, 4/4 amostras), sulfametoxazol-trimetropim (SxT<sup>S</sup>, 4/4 amostras), tetraciclina (Tet<sup>S</sup>, 4/4 amostras) e eritromicina (Eri<sup>R</sup>, 4/4 amostras), sendo o padrão principal designado AT8: Cip<sup>R</sup> SxT<sup>S</sup> Tet<sup>S</sup> Eri<sup>R</sup>. Na tabela 7, os dados desses indicadores estão apresentados juntamente com os métodos de tipagem molecular.

### 5.5. Detecção da PVL (*lukSF-pv*)

A PVL é considerada por muitos autores como um marcador genético de CA-MRSA (SAIMAN *et al.*, 2003; VANDENESH *et al.*, 2003; GONZALES *et al.*, 2006). Portanto, achamos interessante acrescentar a detecção da PVL como um marcador, por ser um simples teste de PCR que poderia ser útil para diferenciar amostras CC30 e CC5, apresentando, predominantemente, antibiótipos A2 e A3 (Cip<sup>S</sup> SxT<sup>S</sup> Tet<sup>S</sup> Eri<sup>S/R</sup>), com objetivo de validar os resultados da tipagem pelo teste RM para tais amostras. Ao final das nossas análises, confirmamos a detecção da presença da PVL apenas em amostras relacionadas ao clone USA 1100 (Tabela 7).

### 5.6. Detecção da enterotoxina H (*seh*)

Dados prévios de nosso laboratório demonstraram que todas as cerca de 70 amostras USA 400 testadas carregavam o gene *seh* e que nenhuma das 250 amostras BEC analisadas apresentavam tal gene (GUIMARÃES & FIGUEIREDO; 2010. Dados não publicados). Tendo em vista que amostras pertencentes ao CC1 (USA 400) e CC5 (USA 800) apresentam o mesmo antibiótipo predominante (A4: Cip<sup>R</sup> Eri<sup>R</sup> Tet<sup>S</sup> SxT<sup>S</sup>) e o mesmo tipo de SCC*mecIV*, achamos interessante analisar a possibilidade de utilizar a detecção de *seh* como um marcador para diferenciar amostras dessas duas linhagens, em adição ao teste RM. Para confirmarmos que este locus não era comumente encontrado em outros clones realizamos a detecção do mesmo nas amostras relacionadas ao clone USA 100, USA 600, USA 800 e USA 1100 e não detectamos a presença desse gene em nenhuma das amostras analisadas.

### 5.7. Tipagem do locus *agr* tipo II

Tendo em vista que a maioria das amostras relacionadas aos clones USA 100 e USA 600 apresentaram antibiótipo idêntico (A4), procuramos através de pesquisas *in silico* e na literatura científica de algum marcador molecular que pudesse diferenciar estes dois clones. Observamos que o locus *agr* tipo II é específico para linhagens pertencentes ao CC5, ou seja, englobando os clones USA 100 e USA 800. Para ratificarmos este dado, desenhamos iniciadores específicos para este locus e os testamos em todas as amostras pertencentes ao CC5 e CC45 analisadas neste trabalho, a fim de confirmarmos a

especificidade dos iniciadores. Observamos que para as amostras identificadas como CC5, obtivemos um produto de amplificação do tamanho esperado, de 160 pb, enquanto que para as amostras CC45 não foi observada nenhuma amplificação, como já era esperado, visto que apresentam *agr* tipo I ou IV (Figura 7).

## 5.8. MLST

Com objetivo de validar os resultados obtidos no teste RM, uma amostra de cada CC, como determinado pelo teste RM, foi aleatoriamente escolhida para a realização do MLST. O perfil alélico no MLST 2-3-1-1-4-4-3 obtido para a amostra 07-26 (PFGE semelhante ao BEC, *SCCmecIII* e RM = CC8) foi correspondente ao ST239 (CC8). Para a amostra 08-09 (relacionada ao USA 1100 pelo PFGE, *SCCmecIV* e RM = CC30), o padrão alélico obtido no MLST foi 2-2-2-229-6-3-2, correspondente a um novo ST, cujo número é 1752, pertencente ao CC30. Para a amostra 07-039, obtivemos um perfil alélico no MLST 1-4-1-4-12-1-10, correspondente ao ST5 (CC5). Esta amostra foi relacionada ao USA 800 através da técnica de PFGE, apresenta *SCCmecIV* e RM = CC5. A amostra 08-65 relacionada pelo PFGE ao clone USA 400, *SCCmecIV* e RM = CC1 apresentou um perfil alélico de MLST 1-1-1-1-1-1-1, correspondente ao ST1 (CC1). Finalmente, o padrão alélico 10-14-8-6-10-3-2 corresponde ao ST45 (CC45) e foi obtido para a amostra 08-23, a qual foi relacionada ao USA 600, pela técnica de PFGE, possui *SCCmec II* e RM = CC45. Assim, os resultados do MLST validaram os resultados obtidos através do teste RM.

**Tabela 7.** Análise molecular e padrão predominante de susceptibilidade a antimicrobianos das 126 amostras relacionadas ao clone BEC, USA 400, USA 100, USA 600, USA 800 e USA 1100 deste estudo

Clone <sup>a</sup>	Nº de amostras <sup>b</sup>	Antibiotipo <sup>c</sup>	CC <sup>d</sup>	<i>mec</i> <sup>e</sup>	PVL <sup>f</sup>	<i>seh</i> <sup>f</sup>	<i>agrII</i> <sup>f</sup>
BEC	36	<b>AT1 = Cip<sup>R</sup>, SxT<sup>R</sup> Tet<sup>R</sup> Eri<sup>R</sup></b> <b>(32/36; 89%)</b>	8	III	-	-	-
		AT2 = Cip <sup>R</sup> , SxT <sup>R</sup> Tet <sup>S</sup> Eri <sup>R</sup> (3/36; 8%)					
		AT3 = Cip <sup>R</sup> , SxT <sup>S</sup> Tet <sup>R</sup> Eri <sup>R</sup> (1/36; 3%)					
USA 1100	17	<b>AT4 = Cip<sup>S</sup>, SxT<sup>S</sup> Tet<sup>S</sup> Eri<sup>S</sup></b> <b>(11/17; 65%)</b>	30	IV	+	-	-
		AT5 = Cip <sup>S</sup> , SxT <sup>S</sup> Tet <sup>S</sup> Eri <sup>R</sup> (5/17; 29%)					
		AT6 = Cip <sup>S</sup> , SxT <sup>R</sup> Tet <sup>S</sup> Eri <sup>S</sup> (1/17; 6%)					
USA 800	17	<b>AT5 = Cip<sup>S</sup>, SxT<sup>S</sup> Tet<sup>S</sup> Eri<sup>R</sup></b> <b>(10/17; 59%)</b>	5	IV	-	-	+
		AT4 = Cip <sup>S</sup> , SxT <sup>S</sup> Tet <sup>S</sup> Eri <sup>S</sup> (3/17; 18%)					
		AT7 = Cip <sup>S</sup> , SxT <sup>S</sup> Tet <sup>R</sup> Eri <sup>R</sup> (2/17; 12%)					
		AT8 = Cip <sup>R</sup> , SxT <sup>S</sup> Tet <sup>S</sup> Eri <sup>R</sup> (1/17; 6%)					
		AT9 = Cip <sup>R</sup> , SxT <sup>S</sup> Tet <sup>S</sup> Eri <sup>S</sup> (1/17; 6%)					

**Tabela 7.** continuação

Clone <sup>a</sup>	N <sup>o</sup> de amostras <sup>b</sup>	Antibiotipo –AT <sup>c</sup>	CC <sup>d</sup>	<i>mec</i> <sup>e</sup>	PVL <sup>f</sup>	<i>seh</i> <sup>f</sup>	<i>agrII</i> <sup>f</sup>
		<b>AT8 = Cip<sup>R</sup> · SxT<sup>S</sup> Tet<sup>S</sup> Eri<sup>R</sup></b> <b>(44/50; 88%)</b>					
USA 400	50	AT1= Cip <sup>R</sup> · SxT <sup>R</sup> Tet <sup>R</sup> Eri <sup>R</sup> (1/50; 2%) AT3 = Cip <sup>R</sup> · SxT <sup>S</sup> Tet <sup>R</sup> Eri <sup>R</sup> (2/50; 4%) AT9= Cip <sup>R</sup> · SxT <sup>S</sup> Tet <sup>S</sup> Eri <sup>S</sup> (3/50; 6%)	1	IV	-	+	-
USA 100	2	AT8 = Cip <sup>R</sup> · SxT <sup>S</sup> Tet <sup>S</sup> Eri <sup>R</sup> (2/2; 100%)	5	II	-	-	+
USA 600	4	AT8 = Cip <sup>R</sup> · SxT <sup>S</sup> Tet <sup>S</sup> Eri <sup>R</sup> (4/4; 100%)	45	II	-	-	-

<sup>a</sup> Clones definidos pela técnica de *pulse-field gel electrophoresis* (PFGE)

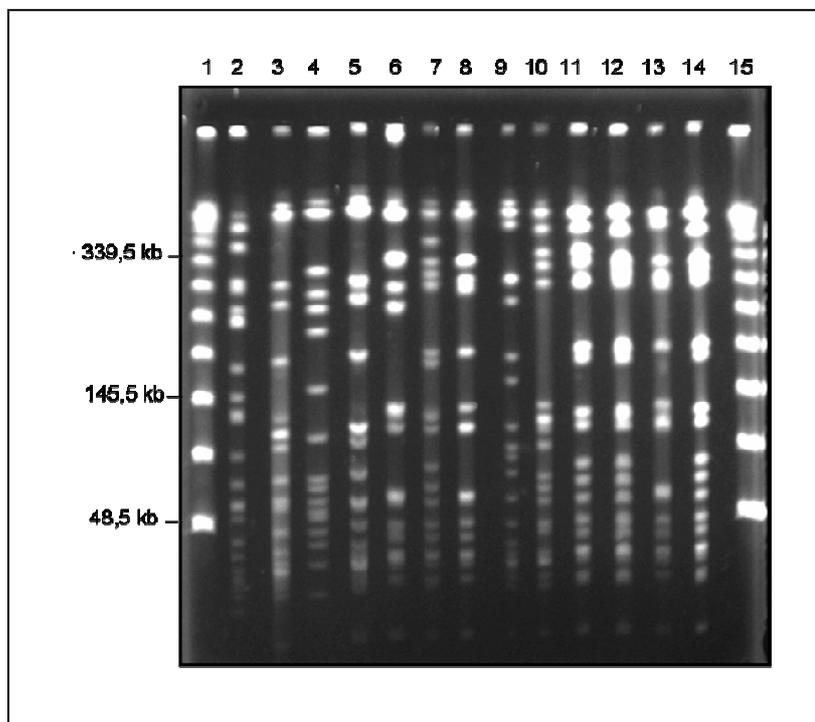
<sup>b</sup> As 5 amostras classificadas como esporádicas não foram incluídas nesta tabela.

<sup>c</sup> AT, antibiotipo. Ciprofloxacina, Cip; sulfametoxazol trimetoprim, SxT; tetraciclina, Tet e eritromicina, Eri. Foram marcados em negrito os antibiotipos predominantes.

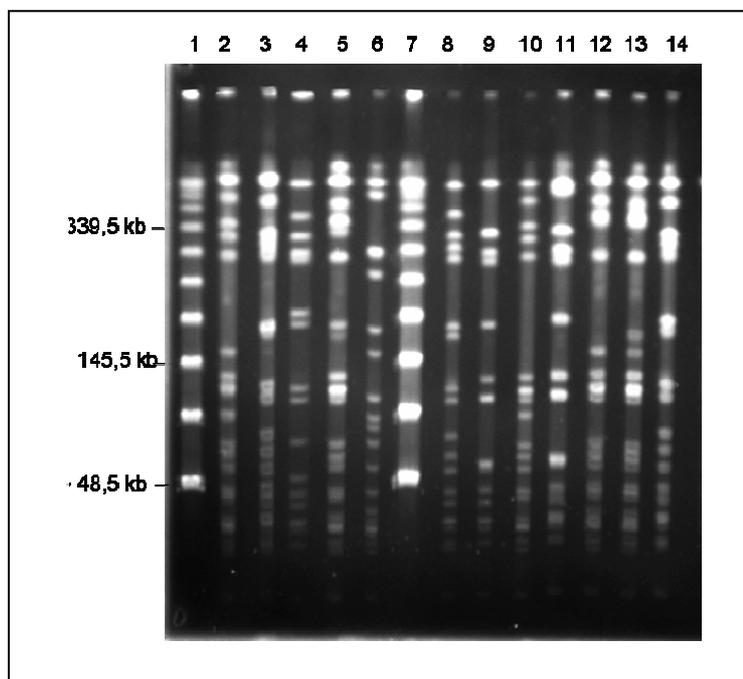
<sup>d</sup> CC, complexo clonal, como determinado pelo teste RM (COCKFIELD *et al.*, 2007).

<sup>e</sup> *mec*; tipagem de SCC*mec* (BOYE *et al.*, 2007)

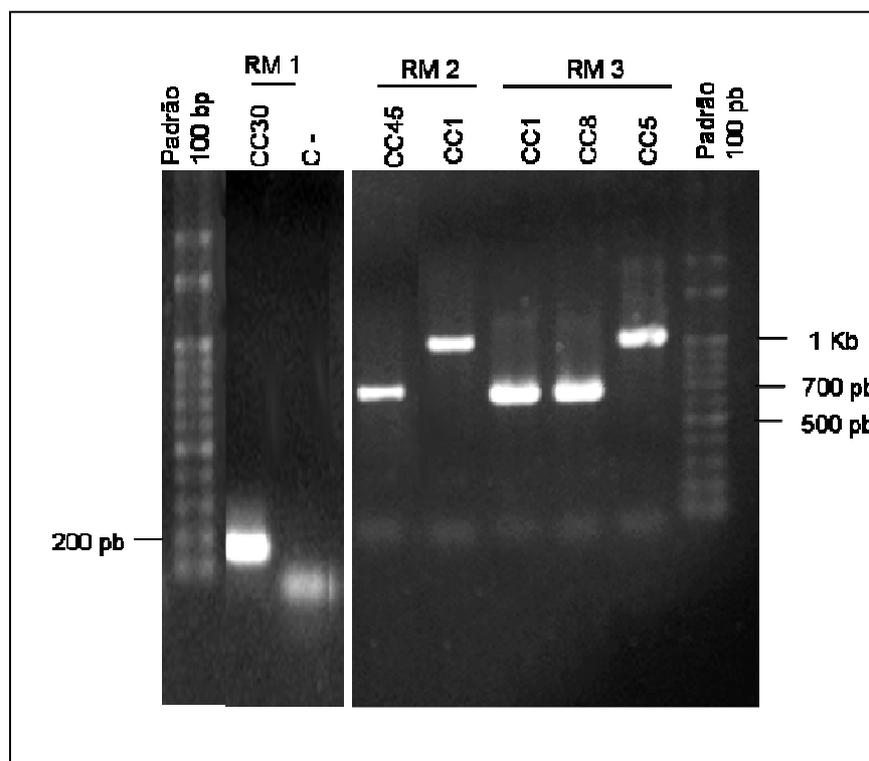
<sup>f</sup> Detecção dos genes que codificam para leucocidina de Panton-Valentine (PVL), enterotoxina H (*seh*) e para o *agr* tipo II (JARRAUD *et al.*, 2002, GUIMARÃES & FIGUEIREDO, 2010, dados não publicados).



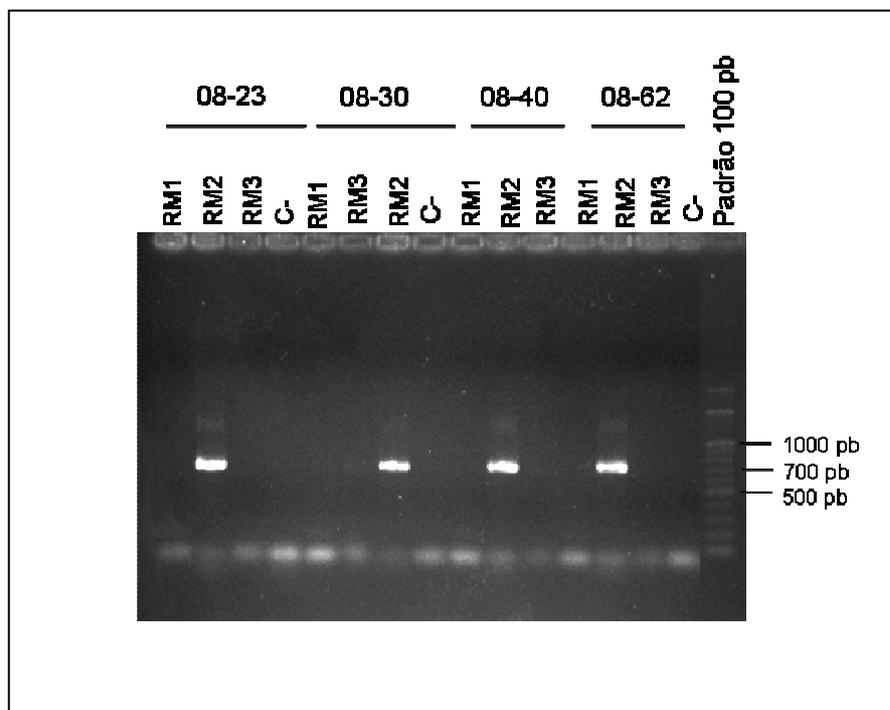
**Figura 2A.** PFGE de amostras representativas dos principais clones internacionais de MRSA e de amostras deste estudo. A. **Linha 1:** marcador de peso molecular  $\lambda$ -ladder; **2:** amostra 08-19 (clone esporádico); **3:** 08-20 (relacionada ao clone USA 1100); **4:** 08-23 (relacionada ao clone USA 600); **5:** 08-25 (relacionada ao USA 1100), **6:** 08-26 (relacionada ao USA 100); **7:** amostra padrão representativa do clone USA 400; **8:** amostra padrão representativa do clone USA 800; **9:** amostra padrão representativa do clone USA 1100; **10:** amostra padrão representativa do BEC; **11:** 08-28 (relacionada ao USA 400); **12:** 08-36 (relacionada ao USA 400); **13:** 08-40 (relacionada ao USA 800); **14:** 08-41 (relacionada ao USA 400) e **15:** marcador de peso molecular  $\lambda$ -ladder.



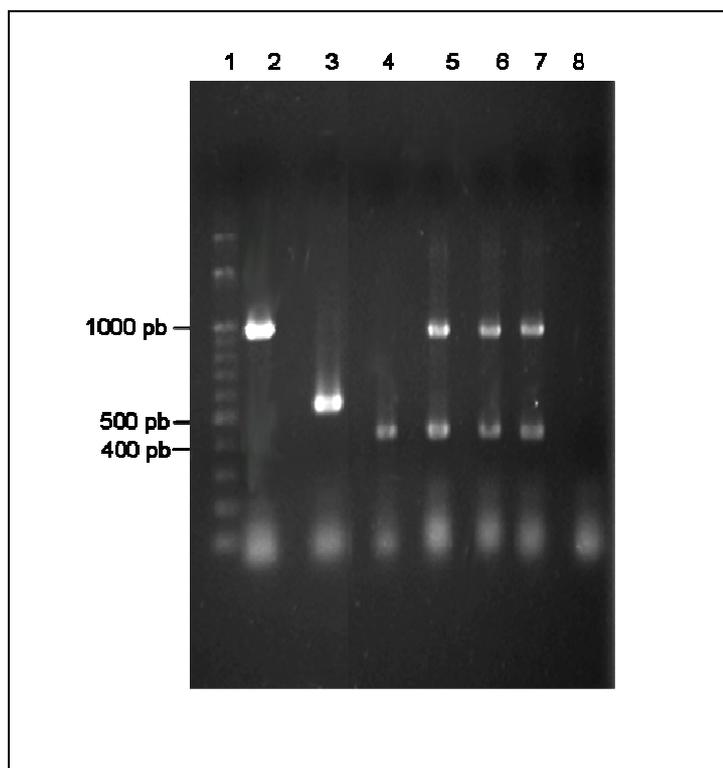
**Figura 2B. Linha 1:** marcador de peso molecular  $\lambda$  -*ladder*; **2:** 07-26 (relacionada ao clone BEC); **linha 3:** 07-29 (relacionada ao USA 400); **4:** 07-37 (esporádica); **5:** 07-38 (relacionada ao BEC); **6:** amostra representativa do clone USA 1100; **7:** marcador de peso molecular  $\lambda$ -*ladder*; **8:** amostra representativa do clone USA 400; **9:** amostra representativa do clone USA 800; **10:** amostra representativa do clone BEC; **linha 11:** 07-39 (relacionada ao clone USA 800); **12:** 07-63 (relacionada ao clone BEC); **13:** 07-76 (relacionada ao clone BEC); **14:** 07-127 (relacionada ao USA 400).



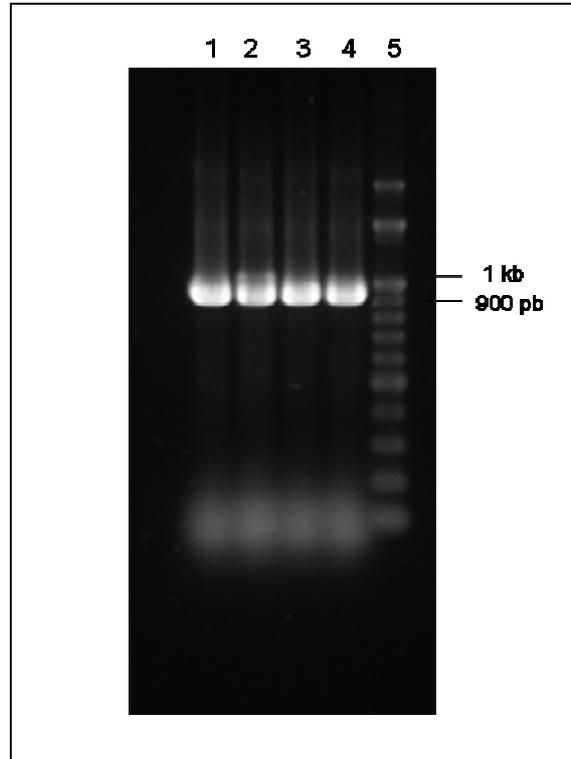
**Figura 3.** Resultados obtidos com o teste RM utilizando amostras padrão. **Linha 1:** Padrão de tamanho molecular 100 pb; **2:** CC30 (amostra WB69, representativa do clone USA 1100); **3:** C<sup>-</sup> (controle negativo); **4:** CC45 (amostra USA 600); **5:** CC1 (amostra USA 400); **6:** CC1 (amostra USA 400); **7:** CC8 (amostra BMB9393; representativa do BEC); **8:** CC5 (amostra USA 100); 8: Padrão de tamanho molecular 100pb.



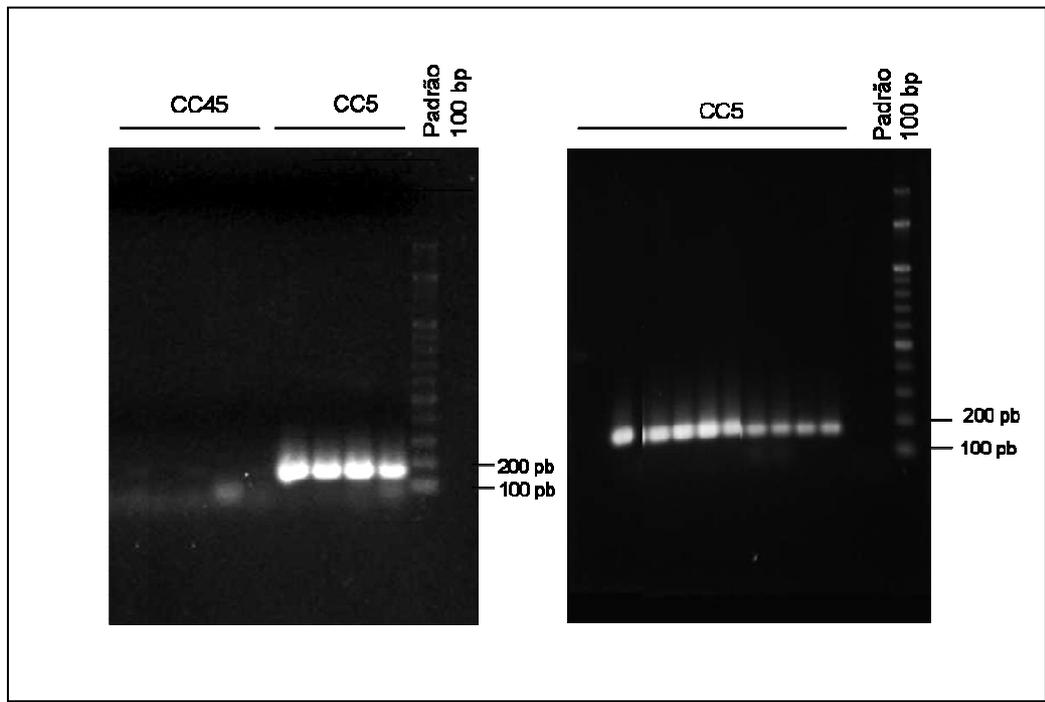
**Figura 4.** Tipagem através do teste RM das quatro amostras de MRSA deste trabalho pertencentes ao clone USA 600.



**Figura 5.** Tipagem *SCCmec* para as amostras padrão. **Linha 1:** padrão de peso molecular 100 pb; **2:** amostra USA 100 (*SCCmecII*); **3:** amostra BMB9393, representativa do BEC (*SCCmecIII*), **4:** USA 500, representativa do clone Ibérico (*SCCmec I*); **5:** amostra USA 800 (*SCCmecIV*); **6:** USA 400 (*SCCmecIV*); **7:** amostra WB69, representativa do USA 1100 (*SCCmecIV*); **8:** controle negativo.



**Figura 6.** Tipagem do *SCCmec* das amostras relacionadas ao clone USA 600. **Linha 1:** amostra 08-23; **2:** 08-30; **3:** 08-44; **4:** 08-62; **5:** padrão de peso molecular 100 pb.



**Figura 7.** Detecção do *agr* tipo II em amostras CC45 e CC5.

## **6. Discussão**

*Staphylococcus aureus* resistentes à metilina (MRSA) representam um grave problema de saúde pública. Tais microrganismos, além de estar entre os mais importantes agentes de infecções comunitárias, são, globalmente, os principais patógenos em infecções associadas aos cuidados à saúde - IACS (APEELBAUM, 2006; PLATA, ROSATO & WEGRZYN, 2009). Dados do Center for Disease Control and Prevention (CDC), dos EUA, relatam que em 2005, naquele país, foram registradas cerca de 100.000 infecções invasivas causadas por MRSA, resultando em um total de 19.000 mortes - número este superior ao de óbitos causados pelo vírus HIV, nos EUA, à época do estudo (TAUBES, 2008).

Desta forma, pesquisas visando o desenvolvimento de novos métodos de detecção de MRSA, através de técnicas de DNA, têm resultado no aumento da precisão e rapidez desses diagnósticos, o que é de extrema importância para a adoção de medidas terapêuticas e controles efetivos e imediatos das doenças associadas (HARBARTH, 2006). Paralelamente, métodos de genotipagem têm sido amplamente utilizados, com o objetivo de se rastrear linhagens específicas de MRSA, uma vez que estas podem apresentar características clinico-epidemiológicas e de resistência aos antimicrobianos bastante distintos (HARBARTH, 2006; OTTER & FRENCH, 2010). Dentre as técnicas mais utilizadas para este fim incluem-se o PFGE, a tipagem do gene *spa* e o MLST (TENOVER *et al.*, 1995; FRENAY *et al.*, 1996; ENRIGHT *et al.*, 2000). O PFGE é considerado um dos principais métodos de genotipagem molecular dos MRSA, em virtude do seu amplo poder discriminativo. No entanto, desvantagens em relação à utilização desta técnica não podem ser descartadas, dentre elas o fato de ser laboriosa, de levar em média uma semana para ser concluída e apresentar custo elevado (STRANDÉN, FREI & WIDMER, 2003). Além disso, muitas vezes a comparação dos pulsotipos de diferentes géis torna-se complexa, já que pequenas variantes podem acarretar em alterações na migração das bandas através das malhas do gel de agarose. Portanto, torna-se ainda mais difícil a análise de dados de laboratórios diferentes. As técnicas de SPA e de MLST, por sua vez, dependem de sistemas de seqüenciamento de DNA (FRENAY *et al.*, 1996; ENRIGHT *et al.*, 2000). Tal tecnologia é de certa forma laboriosa, demorada e apresenta custos ainda muito elevados para ser utilizada rotineiramente (DAVIS *et al.*, 2003).

Devido às desvantagens citadas, metodologias de genotipagem mais simples e rápidas, envolvendo, por exemplo, a técnica de PCR, vem sendo descritas (STRANDÉN, FREI & WIDMER, 2003; DIEP, PERDREAU-REMY & SENSABAUGH, 2003; STRUELENS & DENIS, 2006). O teste RM é um desses exemplos e visa à alocação de amostras de MRSA nos complexos clonais mais frequentemente disseminados no mundo, utilizando simples reações de PCR (COCKFIELD *et al.*, 2007). Cabe ressaltar que o termociclador já é um equipamento presente em laboratórios de muitos hospitais e seria bastante interessante se um teste simples, capaz de alocar amostras de MRSA até o nível de complexo clonal, pudesse ser utilizado rotineiramente, visto que poucos clones de MRSA fazem parte de um mesmo CC (ENRIGHT *et al.*, 2000; COCKFIELD *et al.*, 2007, DEURENBERG & STOBBERINGH, 2008). Devido à ausência, na maioria dos hospitais, de estrutura laboratorial para a realização de diagnósticos moleculares mais robustos, como o PFGE, a tipagem até o nível de clones das amostras clínicas de MRSA não é geralmente realizada e, desta forma, protocolos de terapia antimicrobiana empírica não são corretamente estabelecidos. Consequentemente, o paciente pode não receber prontamente o tratamento mais adequado para debelar sua infecção. Por outro lado, o conhecimento dos clones de MRSA circulantes em um hospital é de fundamental importância para o controle da disseminação desses microrganismos no ambiente hospitalar (HARBARTH, 2006; APPELBAUM, 2006).

Deste modo, achamos interessante aferir a sensibilidade, especificidade e confiabilidade do teste RM para estudos de genotipagem. Para tanto, utilizamos amostras de MRSA isoladas em hospitais no Rio de Janeiro, entre os anos de 2007 e 2008. Este método se fundamenta na utilização de marcadores moleculares (os genes *hds1* e *hds2*), os quais são conservados entre amostras de um mesmo CC, mas diferem entre amostras de CC diferentes (COCKFIELD *et al.*, 2007). Esta característica permite alocar amostras geneticamente semelhantes nos principais complexos clonais circulantes no mundo: CC1, CC5, CC8, CC22, CC30 e CC45.

Ao final da análise das 126 amostras de MRSA que apresentavam padrões de PFGE bem conhecidos, por serem clones circulantes em nosso país, concluímos que o teste RM mostrou-se bastante sensível e específico para a classificação dessas amostras em seus respectivos CC. Os resultados obtidos foram condizentes tanto com os perfis de restrição gerados pelo PFGE como com os dados da tipagem do *SCC<sub>mec</sub>* obtidos para cada amostra (TENOVER *et al.*, 1995; BOYE *et al.*, 2007). Ou seja, todas as 50 amostras que

apresentaram pulsotipos relacionados ao clone USA 400, ou seja, com até seis bandas de diferença no PFGE em relação à cepa padrão utilizada e carregavam SCC*mecIV* foram, corretamente, alocadas no CC1 pelo teste RM. Da mesma forma, as 17 amostras que apresentaram pulsotipos relacionados aos clones USA 1100 e presença do SCC*mecIV* foram alocadas no CC30. Similarmente, todas as 19 amostras relacionadas ao clone USA 100/USA 800 no PFGE e que apresentaram SCC*mecII/IV* foram corretamente classificadas como CC5. Por fim, as 36 amostras relacionadas ao clone BEC, quanto aos pulsotipos apresentados e que carregavam SCC*mecIII* foram alocadas no CC8 pelo teste RM. Tais resultados indicam 100% de especificidade para a identificação dos CCs relativos aos clones USA 100, USA 400, USA 800, USA 1100 e BEC, os quais já foram descritos como circulantes, não somente, em diversas regiões de nosso país, mas também em diversos países do mundo (TEIXEIRA *et al.*, 1995, RIBEIRO *et al.*, 2005; SOUSA-JUNIOR *et al.*, 2009; SILVA-CARVALHO *et al.*, 2009; CURY *et al.*, 2010; RODRÍGUEZ-NOBREGA *et al.*, 2010). O padrão de PFGE de 4 amostras não resultou em um perfil compatível com linhagens de MRSA circulantes em nosso país e por isso foram também consideradas, inicialmente, como clone esporádico. Entretanto, buscamos na literatura científica perfis de bandas de PFGE que se assemelhassem ao observado para essas amostras, as quais foram classificadas pelo teste RM no CC45. De fato, através da comparação entre os tamanhos dos fragmentos *SmaI* gerados chegamos à conclusão que tais amostras eram relacionadas ao clone USA 600 (ST45-SCC*mecII*), o qual tem sido denominado também, por alguns autores, como clone Berlim (McDOUGAL *et al.*, 2003, WANNET *et al.*, 2004). Portanto, o teste RM classificou corretamente essas amostras no CC45.

É interessante ressaltar que, até o momento, não havia sido relatada a presença deste clone em hospitais brasileiros. Amostras CC45 emergiram em Berlim, na Alemanha, em 1993, apresentando SCC*mecIV*. Por este motivo receberam o nome de clone Berlim. Hoje, porém, tais amostras estão amplamente disseminadas em diversos outros países europeus como Áustria, Bélgica, Holanda, Espanha, Reino Unido. Interessantemente, amostras CC45 encontradas nos EUA carregam SCC*mecII*, o qual foi também observado nas amostras CC45 detectadas neste estudo (McDOUGAL *et al.*, 2003, WANNET *et al.*, 2004, DEURENBERG & STOBBERINGH, 2008). Visando a confirmação desses resultados, realizamos o MLST para uma dessas amostras (08-23) e observamos que esta apresentou ST45, validando, mais uma vez, os resultados obtidos através do teste RM.

Outras 5 amostras (07-37, 07-132, 08-17, 08-19 e 08-21) também apresentaram pulsotipos considerados esporádicos e diferentes uns dos outros, com exceção das amostras 08-17 e 08-21 que apresentaram perfis idênticos. Em relação à detecção do CC pelo teste RM, a amostra 07-132 foi alocada no CC5 e as amostras 08-17 e 08-21 foram alocadas ao CC8, e as outras duas amostras foram não tipáveis. As amostras 07-132, 07-37 e 08-19 apresentaram SCC*mec*IV, enquanto que as amostras 08-17 e 08-21 apresentam SCC*mec*I.

Deste modo, concluímos que o teste RM demonstrou elevada especificidade (100%), alocando em CC todas as 126 amostras com perfis de PFGE conhecidos, e sensibilidade de cerca de 98,5 %, alocando 129 das 131 amostras analisadas aqui em complexos clonais. Realizamos o MLST para uma amostra representante de cada CC e obtivemos o mesmo resultado obtido pelo teste RM, validando, desta forma, tais análises.

Neste estudo, obtivemos amostras representativas de todos os complexos clonais passíveis de identificação pelo RM, com exceção do CC22. Um dos clones internacionais alocados no CC22 é o EMRSA 15. O mesmo é prevalente em hospitais no Reino Unido e vem sendo detectado em outras regiões europeias da Alemanha, Bélgica, Espanha e Portugal, além de ter sido encontrado também na Austrália e Nova Zelândia (MURCHAN *et al.*, 2003; O'BRIAN *et al.*, 2004; CONCEIÇÃO *et al.*, 2010). Um outro clone passível de identificação pelo teste RM e que também não foi identificado em nossas análises é o EMRSA 16 ou USA 200 (AMORIM *et al.*, 2007). Este clone também está disseminado em diversas regiões europeias e também vem sendo detectado no Canadá e no México. O EMRSA 16 pertence ao CC30, mas apresenta uma ST36, se diferenciado, deste modo, do USA 1100, que é ST30. Além disso, ambos diferem em relação ao SCC*mec*, visto que o USA 1100 carrega o tipo IV enquanto que o USA EMRSA 16 carrega o tipo II (AMORIM *et al.*, 2007, DEURENBERG *et al.*, 2009). A ausência do EMRSA 15 e do EMRSA16 em nossas análises está de acordo com o contexto epidemiológico brasileiro, visto que a presença destes clones não foi, ainda, observada em nossos hospitais (TEIXEIRA *et al.*, 1995, RIBEIRO *et al.*, 2005; SILVA-CARVALHO *et al.*, 2009; SOUSA-JUNIOR *et al.*, 2009; CURY *et al.*, 2010).

A fim de aumentarmos a confiabilidade dos resultados obtidos pelo teste RM, estudamos a possibilidade de se acrescentar alguns poucos marcadores. Apesar do número limitado de amostras aqui estudadas, uma vez que o antibiograma é um teste de rotina em laboratórios clínicos, achamos interessante acrescentar, como um dos primeiros parâmetros a serem analisados, o perfil de susceptibilidade aos

antimicrobianos (antibiotipo). Nossas análises indicaram que a susceptibilidade a quatro antimicrobianos (Cip, SxT, Tet e Eri) poderia ser extremamente útil para uma classificação inicial dos MRSA de acordo com os antibiótipos obtidos. Um total de oito antibiótipos diferentes foram detectados para todas as amostras testadas (Tabela 7). Entretanto, observamos que os clones de MRSA estudados puderam ser agrupados em 4 antibiótipos principais (AT1, AT4, AT5 e AT8), quanto à susceptibilidade concomitante a essas quatro drogas. Observamos que para o BEC, o perfil predominante encontrado (AT1) foi de resistência aos quatro antibióticos em questão - Cip<sup>R</sup> SxT<sup>R</sup> Tet<sup>R</sup> Eri<sup>R</sup> (32/36; 89%). Cabe ressaltar que este clone adquiriu uma série de genes que conferem resistência múltipla a diferentes classes de antimicrobianos (TEIXEIRA *et al.*, 1995; OLIVEIRA *et al.*, 2001). Estudos anteriores demonstraram o isolamento de amostras BEC apresentando-se susceptíveis somente à vancomicina e, na região Nordeste do país, já foi apontada a emergência de uma subpopulação, relacionada a este clone, apresentando resistência heterogênea à vancomicina e teicoplanina.(TEIXEIRA *et al.*, 1995, SOARES *et al.*, 2001, RODRÍGUEZ-NOBREGA *et al.*, 2010). Assim, a presença de susceptibilidade tipo AT1 (em nosso meio) seria forte indicativo de que a amostra analisada poderia ser relacionada ao BEC. Adicionalmente, para confirmação, além do teste RM (que alocaria essa amostra no CC8), sugerimos que fosse confirmada, através de PCR, a presença nessas amostras do SCCmecIII, visto que o BEC carrega este elemento e este não tem sido verificado em outras linhagens circulantes no mundo (Tabela 7 e 8; TEIXEIRA *et al.*, 1995; OLIVEIRA *et al.*, 2001; ENRIGHT *et al.*, 2002, RODRÍGUEZ-NOBREGA *et al.*, 2010).

A grande maioria das amostras relacionadas ao USA 1100 foram alocadas nos AT4 e AT5 (Tabela 7), sendo que a maior parte delas (11/17; 65%) no AT4, ou seja, apresentaram susceptibilidade a todas as quatro drogas (Cip<sup>S</sup> SxT<sup>S</sup> Tet<sup>S</sup> Eri<sup>S</sup>). Uma menor percentagem dessas amostras (5/17; 29%) foram alocadas no AT5 (Cip<sup>S</sup> SxT<sup>S</sup> Tet<sup>S</sup> Eri<sup>R</sup>). Ao contrário, as amostras relacionadas ao clone USA 800, foram classificadas em sua maioria como AT5 (10/17; 59%), apresentando resistência apenas à eritromicina e somente 18% (3/17) dessas amostras foram alocadas no AT4 (Tabela 7). Portanto, no caso de uma amostra apresentar AT4, este dado seria um bom indício de que esta poderia estar relacionada ao USA 1100. No entanto, 5 das amostras USA 1100 testadas apresentaram resistência à eritromicina e este fenótipo já foi observado em amostras deste clone isoladas em um hospital de Porto Alegre (SCRIBEL *et al.*, 2009). Portanto, o AT5, apesar de mais raro, também pode ser detectado, com relativa

frequência, entre amostras USA 1100. Adicionalmente, AT4 e AT5 foram, como relatamos acima, observados em amostras relacionadas ao clone USA 800, sendo porém AT5 o padrão predominante. Por outro lado, observamos que todas as amostras relacionadas ao clone USA 1100 (CC30) foram positivas para a presença do locus *luKSF-pv*. Desta forma, para que possamos distinguir, com mais certeza, amostras relacionadas ao USA 800 daquelas relacionadas ao USA 1100 sugerimos que além do teste RM, que deverá alocar as amostras como CC30 (se forem relacionadas ao USA 1100) ou CC5 (se forem relacionadas ao USA 800), seja também realizada a detecção por PCR do locus *lukSF*, que codifica a PVL (Tabela 7 e 8). Neste estudo, este locus foi encontrado apenas em amostras relacionadas ao clone USA 1100, tendo o mesmo sido observado nas amostras isoladas na região sul do Brasil (RIBEIRO *et al.*, 2005; SCRIBEL *et al.*, 2009) e nas isoladas em outras partes do mundo (OTTER & FRENCH, 2010). Assim, a detecção por PCR do locus *lukSF-pv* foi introduzido em nossas análises, para fornecer maior segurança à alocação de amostras pelo teste RM no CC30.

Vale a pena alertar que em outros países já foram observadas amostras CC5 carreando *lukSF*, como relatado na Argentina (SOLA *et al.*, 2008). Neste caso, um PCR alternativo poderia ser acrescentado no lugar da PVL, como por exemplo, a detecção do polimorfismo *agr*, uma vez que as amostras CC5 testadas, até o momento, foram descritas como apresentando polimorfismo *agrII*, enquanto que as ST30 apresentam polimorfismo *agrIII* (DE SOUZA *et al.*, 2005). Portanto, fica claro que a escolha do marcador a ser utilizado para validação do teste RM deverá depender das características específicas dos clones predominantes na área geográfica examinada.

Com relação ao antibiograma dos MRSA pertencentes aos clones USA 100 (CC5), USA 400 (CC1) e USA 600 (CC45), nossos resultados alocaram a maioria dessas amostras em um mesmo antibiograma AT8, ou seja, apresentaram resistências concomitantes a Cip e Eri e sensibilidades ao SxT e Tet. Apesar do número total de amostras estudadas relacionadas ao USA 100 e USA 600 ter sido pequeno (6 amostras), todas apresentaram padrão AT8, assim como 44 de 50 (88%) das amostras relacionadas ao USA 400 (Tabela 7). A tipagem do *SCCmec* (como marcador adicional) não seria, neste caso, muito elucidativa, visto que tanto o USA 100 quanto o USA 600, circulantes em nosso meio, carregam o *SCCmecII*. Porém, cabe acrescentar que este teste poderia ser introduzido caso desejássemos confirmar se o CC5 (de acordo com o teste RM) seria, realmente, um representante do clone USA 100 (ST5-*SCCmecII*), ou se não poderia ser uma amostra relacionada ao USA 800 (ST5-*SCCmecIV*), apresentando um padrão

atípico de resistência à Cip. Procuramos na literatura científica um marcador adicional que pudesse diferenciar amostras USA 100 das demais amostras agrupadas no AT8 e achamos útil introduzir a detecção do locus *agr II*, através de PCR, visto que o clone USA 600 carrega o *agr* tipo IV ou I, o USA 400 *agr III*, enquanto que destes somente o USA 100 carrega o tipo II (JARRAUD *et al.*, 2000, STROMMINGER *et al.*, 2003, DE SOUZA *et al.*, 2005). Desta forma, desenhamos iniciadores, tendo como base as sequências do *agrBD* da cepa Mu50, sabidamente pertencente ao CC5 e testamos para todas as nossas amostras genotipadas como CC5. Observamos que para todas elas houve uma amplificação de um fragmento de 160 pb, como esperado. Como controle negativo do set de *iniciadores*, testamos também para as amostras CC45 e não obtivemos produtos de amplificação, como já era esperado, visto que apresentam *agr* tipo I ou IV.

As enterotoxinas estafilocócicas (SE) são superantígenos e, portanto, se ligam à porção externa do complexo de histocompatibilidade de classe II (MHC de classe II), presente nas células apresentadoras de antígeno, ocasionando uma proliferação policlonal de células T, gerando, conseqüentemente, produção elevada de citocinas pró-inflamatórias, podendo levar à síndrome do choque tóxico (OMOE *et al.*, 2005). Um estudo anterior do nosso laboratório, realizado com amostras relacionadas ao clone USA 400, revelou que todas as amostras analisadas carregam o gene *seh* e, portanto, consideramos a presença deste gene um marcador molecular da presença de amostras relacionadas ao USA 400 em nosso país (GUIMARÃES *et al.*, dados não publicados). Igualmente, este locus também foi encontrado em amostras ST1-SCC*mecIV* isoladas nos Estados Unidos e na Coréia do Sul, não sendo, entretanto, comum em outros clones internacionais circulantes de MRSA (VANDENESCH *et al.*, 2003, CHA *et al.*, 2005, DE MIRANDA *et al.*, 2007). A SEH parece possuir elevada afinidade de ligação ao MHC de classe II, sendo considerada como o superantígeno mais potente (AGWU *et al.*, 2007). Sabe-se também que a SEH é muito detectada em casos de intoxicação alimentar (OMOE *et al.*, 2002; JORGENSEN *et al.*, 2005). Como todas as amostras relacionadas ao USA 400 (alocadas como CC1 no teste RM), estudadas até o momento, apresentam o gene *seh*, achamos interessante, por todos os motivos citados, adicionar a detecção deste gene, através de PCR, ao esquema de identificação proposto, visando diferenciá-las, principalmente das amostras USA 600, alocadas no AT8 juntamente com as USA 400 e USA 100 (estas últimas diferenciadas das demais pela presença do *agr II*), e diferenciá-las das amostras USA 800 alocadas (principalmente) no AT5 (Tabela 7). Os iniciadores

utilizados foram específicos e somente demonstraram ampliações para as amostras, deste trabalho, que foram alocadas no CC1.

O CC1 foi inicialmente observado na Austrália, em comunidades remotas, sendo denominado primeiramente como clone WA1 (ST1-SCC*mec*IV e PVL negativo). Nos EUA, o clone ST1-SCC*mec*IV, denominado então USA 400, aparece como agente causador de infecções comunitárias e, diferentemente do WA1, é produtor da PVL (UDO, PEARMAN & GRUBB, 1993; DAILEY *et al.*, 2005). A presença desta citolisina, juntamente com a presença do SCC*mec*IV, é considerada, por muitos autores, como características importantes de linhagens CA-MRSA, ou seja, marcadores moleculares encontrados na maioria dessas amostras (VANDENESH *et al.*, 2003). No entanto, um estudo realizado entre os anos de 2000 e 2005 com amostras relacionadas ao clone USA 400 isoladas no Canadá revelou que essas amostras CC1 apresentaram perfis tanto positivos como negativos para a presença dos genes que codificam para PVL, sendo o perfil negativo o prevalente (ZHANG *et al.*, 2008). Todas as amostras brasileiras analisadas relacionadas ao clone CC1 não apresentaram este locus.

Resumindo, amostras AT8 positivas para *seh* devem ser alocadas pelo teste RM no CC1 (geneticamente relacionadas ao USA 400). Por outro lado, esperamos que amostras AT8, que amplificaram com os iniciadores *agr* II e apresentaram SCC*mec*II, sejam classificadas pelo teste RM como CC5 e geneticamente relacionadas ao clone USA 100 ou, se apresentarem SCC*mec*IV, relacionadas ao USA 800. Já as amostras AT8, agrupadas como CC45 (relacionadas ao clone USA 600), devem ser tipicamente *agr* II e *seh* negativas (Tabela 7 e 8).

Apesar de não termos detectado amostras relacionadas ao CC22, Cockfield e coladores (2007), em seu trabalho original, citam, como um marcador adicional, o teste fenotípico da detecção da urease para distinguir amostras CC22, que normalmente são urease negativas, de amostras CC1, CC5, CC30 e CC45, que normalmente são urease positivas. Já em relação ao CC8, o teste da uréase mostrou-se variável (COCKFIELD *et al.*, 2007). O teste da urease já foi utilizado em outros estudos para a identificação rápida de amostras EMRSA 15 (CC22; RICHARDSON & REIT 1993; UDO, AL-SWEIH & NORONHA, 2006). Portanto, para distinguir amostras relacionadas ao EMRSA 15, das amostras relacionadas ao BEC, que não apresentam um padrão quanto à presença ou não da urease, poderia ser realizada a tipagem do SCC*mec*, visto que amostras relacionadas ao EMRSA 15 carregam o SCC*mec* tipo IV enquanto que amostras BEC carregam o tipo III (UDO, AL-SWEIH & NORONHA, 2006).

Não obstante termos ressaltado as vantagens do teste RM, como um método rápido e sensível para estudos epidêmico moleculares (cuja confiabilidade aumenta com o acréscimo de alguns poucos marcadores, aqui sugeridos), é importante ressaltar, mais uma vez, que seu uso se aplica apenas na identificação das principais linhagens de MRSA circulantes no mundo (CC1, CC5, CC8, CC22, CC30 e CC45). Obviamente, não podemos descartar técnicas como o MLST, que traça a história evolutiva das diferentes linhagens de MRSA, uma vez que é baseado em sequenciamentos de segmentos de 7 genes conservados dos *S. aureus*. Igualmente, no caso da avaliação de surtos fechados de curta duração, não é recomendado, da mesma forma, desconsiderar o PFGE, já que alterações nos perfis de bandas observadas em um gel poderiam indicar ocorrências de inserções ou deleções de elementos genéticos móveis, os quais podem conferir resistência aos antimicrobianos ou genes de virulência, sendo esta, portanto, uma técnica recomendada para um estudo temporal destas linhagens. (TENOVER *et al.*, 1995; ENRIGHT *et al.*, 2000; MCDUGAL *et al.*, 2003).

No entanto, não podemos deixar também de acrescentar que esta metodologia é útil, principalmente, para triagens iniciais, em estudos de genotipagem com números elevados de amostras, sobretudo quando a epidemiologia molecular das amostras circulantes na região é conhecida. Portanto, é aconselhável que após a realização do teste RM, amostragens de cada CC sejam selecionadas, aleatoriamente, de forma a serem confirmadas com outros métodos de tipagem molecular como, por exemplo, PFGE, *spa*, e/ou MLST, dependendo das finalidades do estudo proposto.

O acréscimo das modificações propostas no teste RM, visando á introdução de determinados marcadores com o objetivo de validar o teste, é, a nosso ver, extremamente, importante para acrescentar confiabilidade a este teste, principalmente, por ser um método baseado na técnica de PCR, a qual está sujeita a erros de conhecimento notório. Por outro lado, a escolha dos marcadores adequados dependerá do cenário epidemiológico regional, uma vez que o RM identifica complexos clonais e não linhagens de MRSA específicas. Os marcadores aqui escolhidos (SCC*mec*, PVL, polimorfismo *agr* II e *seh*) se enquadram no contexto epidemiológico observado em hospitais da cidade do Rio de Janeiro, e do Brasil (TEIXEIRA *et al.*, 1995; RIBEIRO *et al.*, 2005; SOUSA-JUNIOR *et al.*, 2009; SILVA-CARVALHO *et al.*, 2009, CURY *et al.*, 2010) e, provavelmente, de muitas cidades do mundo (Tabela 7 e 8; OTTER & FRENCH, 2010; RODRÍGUEZ-NOBREGA *et al.*, 2010). Porém, é provável que não sejam adequados para áreas geográficas onde clones diferentes dos encontrados aqui

sejam predominantes. Entretanto, linhagens internacionais específicas de MRSA têm sido bem caracterizadas, o que facilita a escolha de um marcador adicional (OTTER & FRENCH, 2010; RODRÍGUEZ-NOBREGA *et al.*, 2010).

Outra questão que não poderia deixar de ser abordada é o fato de que, apesar de determinados clones de MRSA apresentarem padrões de susceptibilidade semelhantes, a resistência a um ou outro antimicrobiano pode variar dependendo da região geográfica, e, portanto, tal variação tem que ser consideradas, mas não anula a utilidade das análises do antibiograma (CONCEIÇÃO *et al.*, 2010; OTTER & FRENCH, 2010; RODRÍGUEZ-NOBREGA *et al.*, 2010). A definição dos antibiogramas é de suma importância, visto que pode nos indicar qual o clone de MRSA provável, e assim servir como um marcador de validação dos resultados obtidos no teste RM.

Tendo em vista todos os aspectos analisados, sugerimos uma nova metodologia para triagem epidemiológico-molecular baseada no teste RM e na adição de marcadores específicos para os clones locais circulantes, de forma a validar o primeiro. Tal metodologia inclui técnicas simples, como antibiograma e PCR e, portanto, poderia ser utilizada em laboratórios clínicos hospitalares, uma vez que a maioria já realiza antibiograma e possui termocicladores. Deste modo, o uso dessa metodologia poderia fornecer, rapidamente, dados precisos às comissões de controle de infecção hospitalar (CCIH), com relação aos clones circulantes naquele nosocômio, o que seria, extremamente, importante para o controle e tratamento efetivo das infecções causadas pelos MRSA. Além disso, o uso dessa metodologia seria útil como uma triagem preliminar em estudos de epidemiologia molecular, principalmente quando um grande número de amostras for analisado, em regiões onde os CC1, CC5, CC8, CC22, CC30 e CC45 predominam.

**Tabela 8.** Resumo da metodologia proposta para triagem genotípica de amostras de MRSA isoladas no Rio de Janeiro tendo como base o teste RM.

Antibiótipo	Clone mais provável	RM <sup>b</sup>	Marcadores <sup>c</sup>
Cip <sup>R</sup> SxT <sup>R</sup> Tet <sup>R</sup> Eri <sup>R</sup> (AT1) <sup>a</sup>	BEC	CC8	SCC <i>mec</i> III
Cip <sup>S</sup> SxT <sup>S</sup> Tet <sup>S</sup> Eri <sup>S</sup> (AT4)	USA 1100	CC30	PVL <sup>+d</sup>
Cip <sup>S</sup> SxT <sup>S</sup> Tet <sup>S</sup> Eri <sup>R</sup> (AT5)	USA 800	CC5	PVL <sup>-e,f</sup>
Cip <sup>R</sup> SxT <sup>S</sup> Tet <sup>S</sup> Eri <sup>R</sup> (AT8)	USA 100	CC5	<i>agr</i> II <sup>+f</sup>
	USA 400	CC1	<i>seh</i> <sup>+</sup>
	USA 600	CC45	<i>agr</i> II <sup>-</sup> , <i>seh</i> <sup>-</sup>

<sup>a</sup> AT: Antibiótipo.

<sup>b</sup> RM: restriction modification test (COCKFIELD *et al.*, 2007).

<sup>c</sup> Marcadores: testes de PCR adicionais, sugeridos neste estudo, visando a tipagem do SCC*mec*, detecção dos genes *lukSF*, que codificam para a leucocidina de Pantone-Valentine (PVL), do polimorfismo *agr* tipo II e da presença ou ausência do gene *seh*, que codifica para a enterotoxina estafilocócica H (SEH).

<sup>d</sup> +: presença; -: ausência.

<sup>e</sup> Amostras CA-MRSA (ST5-SCC*mec*IV) isoladas na Argentina (Córdoba), portanto relacionadas ao USA 800, podem apresentar genes *lukSF* (SOLA *et al.*, 2008). Neste caso, o teste para o polimorfismo *agr* II poderia ser aqui acrescentado, além da PVL, visto que CC5 possui o polimorfismo *agr* II.

<sup>f</sup> A detecção do SCC*mec* pode ser desejável, visto que amostras CC5 apresentam, geralmente, SCC*mec*II (USA 100) ou SCC*mec*IV (USA 800).

## **7. Bibliografia:**

ADEM, P.V.; MONTGOMERY, C.P.; HUSAIN, A.N.; KOOGLER, T.K.; ARANGELOVICH, V.; HUMILIER, M.; BOYLE-VAVRA, S. & DAUM, R. S. ***Staphylococcus aureus* sepsis and the Waterhouse-friderichsen syndrome in children.** N. Engl. J. Med., 353, 1245-1251, 2005.

AGWU, A.; BRADY, K.M.; ROSS, T.; CARROLL, K.C. & HALSEY, N.A. **Cholera-like diarrhea and shock associated with community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (USA 400 clone) pneumonia.** *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 26, 271-3, 2007.

AIRES DE SOUSA, M.; MIRAGAIA, M.; SANTOS SANCHES, I.; HEITMAN, I. & DE LENCASTRE, H. **Three-year assessment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America from 1996 to 1998.** *J. Clin. Microbiol.*, 39, 2197-2205, 2001.

AIRES DE SOUSA, M.; CONCEIÇÃO, T.; SIMAS, C. & DE LENCASTRE, H. **Comparison of genetic backgrounds of methicillin-resistant and susceptible *Staphylococcus aureus* isolates from Portuguese hospitals and community.** *J. Clin. Microbiol.*, 43, 5150-5157, 2005.

AL-MASSAUD, S.B., DAY, M.J & RUSSEL, A.D. **Antimicrobial resistance and gene transfer in *Staphylococcus aureus*.** *J. Appl. Bacteriol.*, 70, 279-290, 1991.

AMORIM, M.L.; FARIA, N.A.; OLIVEIRA, D.; VASCONCELOS, CABEDA, J.C.; MENDES, A.C.; CALADO, E.; CASTRO, A.P.; RAMOS, M.H.; AMORIM, J.M. & DE LENCASTRE, H. **Changes in the clonal nature and antibiotic resistance Profiles of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with Spread of the EMRSA-15 Clone in a tertiary care portuguese hospital.** *J. Clin. Microbiol.*, 45, 2881-88, 2007.

APPELBAUM, P.C. **MRSA-the tip of the iceberg.** *Clin Microbiol Infec*, 12, 3-10, 2006.

ARCHER, G.L & NIEMEYER, D.M. **Origin and evolution of DNA associated with resistance to methicillin in staphylococci.** *Trends in Microbiol.*, 2, 243-247, 1994.

BABA, T.; BAE, T.; SCHNEEWIND, O.; TAKEUCHI, F. & HIRAMATSU, K. **Genome Sequence of *Staphylococcus aureus* Strain Newman and Comparative Analysis of Staphylococcal Genomes: Polymorphism and Evolution of Two Major Pathogenicity Islands.** *J. Clin. Microb* 190, 300-310, 2008.

BAMBERGER, D.M. **Bacteremia and endocarditis due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the potencial role of Daptomycin.** *Therap. Clin. Risk Manag.*, 3, 675-684, 2007.

BARTELS, M.D.; NANUASHVILI, A.; BOYE, K.; ROHDE, S. M. & JASHIASHZILI, N. **Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospitals in Tbilisi, the Republic of Georgia, are variants of the Brazilian clone.** *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 27,757-760, 2008.

BERGER-BACHI, B. & ROHER, S. **Factor influencing methicillin resistance in *Staphylooccci*.** *Arch. Microbiol.*, 178, 165-171, 2002.

BEVERIDGE, T.J.; MAKIN, S.A.; KADURUGAMUWA, J.L. & LI, Z. **Interactions between biofilms and the environment.** *FEMS Microbiol. Rev.*, 20, 291-303, 1997.

BOLES, B.R. & HORSWILL, A.R. ***agr*-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms.** *PLoS Pathog.*, 4, 1-13, 2008.

BORST, A.; BOX, A.T.A. & FLUIT, A.C. **False-positive results and contamination in nucleic acid amplification assays:suggestions for a prevent and destroy strategy.** *Eur.J. Microbiol. Infect. Dis.*, 23, 289-99, 2004.

- BOYE, K.; BARTELS, M.D.; ANDERSEN, I.S.; MOLLER, J.A. & WESTH, H. **A new multiplex PCR for easy screening of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* SCCmec types I-V.** J. Clin. Microol. Infect. Diseases.,13, 725-7, 2007.
- BRAKSTAD, O.G. & MAELAND, J.A. **Mechanisms of methicillin-resistance staphylococci.** APMIS, 105, 264-276, 1997.
- BUBECK J W.; PALAZZOLO-BALLANCE A. M.; OTTO, M.; SCHNEEWIND, O. & DELEO, F.R. **Panton-Valentine leukocidin is not a virulence determinant in murine models of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease.** J Infect Dis, 198, 1166-70, 2008.
- CAMPANILE, F.; CAFISO, V.; CASCONI, C.; GIANNINO, V.; DI MARCO, O. & STEFANI, S. **Clonal diffusion and evolution of *mecA* and Tn554 polymorphisms in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Italy.** Infect. Med., 9: 30-38, 2001.
- CDC (Centers of Disease Control and Prevention). **Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* – New York, 2004.** MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep., 53, 322-323, 2004.
- CHA, J.O.; LEE, J.K.; JUNG, Y.H.; PARK, Y.K.; KIM, B.S. & LEE, Y.S. **Molecular analysis of *Staphylococcus aureus* isolates associated with staphylococcal food poisoning in South Korea.** J.Applied.Microbiol., 101, 864-71, 2006.
- CHAMBERS, H. F. **Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications.** Clin. Microbiol. Rev., 10, 781-791, 1997.
- CHANG, F.Y.; MACDONALD, B.B. & PEACOCK, J.E. **A prospective multicenter study of *S.aureus* bacteremia. Incidence and endocarditis risk factors for mortality and clinical impact of methicillin resistance.** Medicine, 82 322-332, 2003.
- CHEN, C.J. & HUANG, Y.C. **Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Taiwan.** J. Microbiol. Immunol. Infect., 38, 376-382, 2005.
- CHEN, L.; MEDIIVILLA, J.R.; DUARTE C. OLIVEIRA, D.C.; WILLEY, B.M.; DE LENCASTRE, H. & KREISWIRTH, B.N. **Multiplex real-time PCR for rapid *Staphylococcal* cassette chromosome *mec* typing.** J. Clin. Microbiol, 47, 3692-3706.
- CHILLER, K.; SELKIN, B.A. & MURAKAWA, G. J. **Skin microflora and bacterial infections of the skin.** J. Investig. Dermatol. Symp. Proc., 6: 170-174, 2001.
- COIMBRA, M. V. S.; TEIXEIRA, L. A.; RAMOS, R. L. B.; PREDARI, S. C.; CASTELO, L. & FIGUEIREDO, A. M. S. **Spread of the brazilian epidemic clone of a multiresistant MRSA in two cities in Argentina.** J. Med. Microbiol., 49, 187-192, 2000
- COIMBRA, M.V.S.; SILVA-CARVALHO, M.C.; WISPLINGHOFF, H.; HALL, G. O.; TALLENT, S.; WALLACE, S.; EDMOND, M.B.; FIGUEIREDO, A.M.S. & WENZEL, R.P. **Clonal spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a large geographic area of the United States.** J. Hosp. Infect., 53: 103-110, 2003.
- COCKFIELD, J.D.; PATHAK, S.; EDGEWORTH, J.D. & LINDSAY, J.A. J. **Rapid determination of hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineages.** Medical Microb 56., 614-619, 2007
- CONCEIÇÃO, T.; TAVARES, A.; MIRAGAIA, M.; HYDE, K.; AIRES-DE-SOUZA, M. & DE LENCASTRE, H. **Prevalence and clonality of methicillin resistant *S.aureus* (MRSA) in the Atlantic Azores islands:predominance of SCC types IV, V e VI.** Eur.J.Clin.Infect.Dis, 29, 543-550, 2010.
- COOMBS, G. W.; NIMMO, G. R.; BELL, J. M.; HUYGENS, F.; O'BRIEN, F. G.; MALKOWSKI, M. J.; PEARSON, J.C.; STEPHENSON, A. J.; GIFFARD, P.M. & THE AUSTRALIAN GROUP FOR ANTIMICROBIAL RESISTANCE. **Genetic diversity among community methicillin-resistant**

***Staphylococcus aureus* strains causing outpatient infections in Australia.** J. Clin. Microbiol., 42: 4735-4743, 2004.

COOMBS, G.W.; NIMMO, G.R.; BELL, J.M.; HUYGENS, F.; O'BRIEN, F.G.; MALKOWSKI, M.J.; PEARSON, J.C. & STEPHENS, A.J.; GIFFARD, P.M. **Seven novel variants of the staphylococcal chromosomal cassette *mec* in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Ireland.** Antimicrob. Agents Chemother., 49, 2070-2083, 2005.

COOMBS, G. W.; PEARSON, J.C.; O'BRIEN, F.; MURRAY, R. J.; GRUBB, W. B. & CHRISTIANSES, K.J. **Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones, Western Australia.** Emerg Infect. Dis., 12, 2006.

CUEVAS, O.; CERCENADO, E.; BOUZA, E.; CASTELLARES, C.; TRINCADO, P.; CABRERA, R. & VIDEL, A. **Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Spain: a multicentre prevalence study (2002).** Clin. Microbiol. Infect., 13, 250-256, 2007.

CURY, G.G.; MOBILON, C.; STEHLING, E.G.; LANCELLOTI, M.; RAMOS, M.C.; MARTINER, R.; BROCCHI, M. & DA SIVEIRA, W.D. **Molecular typing of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains isolated in two metropolitan areas of São Paulo State, Southeast Brazil.** The Brazil, J. Infec. Dis., 13, 165-169, 2009.

DAILEY, L.; COOMBS, G. W.; O'BRIEN, F. G.; PEARMAN, J. W.; CHRISTIANSEN, K.; GRUBB, W.B. & RILEY, T. V. **Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Western Australia.** Emerg. Infect. Dis., 11, 1584-1590, 2005.

DAVIS, M. A.; HANCOCK, D. D.; BESSER, T. E. & CALL, D. R. **Evaluation of pulsed-field gel electrophoresis as a tool for determining the degree of genetic relatedness between strains of *Escherichia coli* O157:H7.** J. Clin. Microbiol. 41, 1843-1849, 2003.

DAUM, R.S.; ITO, T.; HIRAMATSU, K.; HUSSAIN, F.; MONGKOLRATTANOTHAI, K.; JAMKLANG, M. & BOYLE-VAVRA, S. **A novel methicillin-resistant cassette in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates of diverse genetic backgrounds.** J. Infect. Dis., 186, 1344-1347, 2002.

DAUWALDER, O.; LINA, G.; DURAND, G.; BES, M.; MEUGNIER, H.; JARLIER, V.; COIGNARD, B.; VANDENESCH, F.; ETIENNE, J. & LAURENT, F. **Epidemiology of invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones collected in France in 2006 and 2007.** J. Clin. Microbiol., 46, 3454-3458, 2008

DE ARAÚJO, G.L.; COELHO, L.R.; DE CARVALHO, C.B.; MACIEL, R.M.; CORONADO, A.Z.; ROZENBAUM, R.; FERREIRA-CARVALHO, B.T.; FIGUEIREDO, A.M. & TEIXEIRA, L.A. **Commensal isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* are also well equipped to produce biofilm on polystyrene surfaces.** J. Antimicrob. Chemother., 57, 855-864, 2006.

DE JONGE, B.L.M.; YOO-SEOK, C.; GAGE, D. & TOMASZ, A. **Peptidoglycan composition of a highly methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain.** J. Biol. Chem., 267, 11248-11254, 1992.

DE SOUZA, M.A.; SANCHES, I.S.; FERRO, M.L.; VAZ, M.J.; SARAIVA, Z.; TENDEIRO, T.; SERRA, J. & DE LENCASTRE, H. **Intercontinental spread of a multidrug-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone.** J. Clin. Microbiol., 36, 2590-2596, 1998.

DE SOUZA, M.A.; CONCEIÇÃO, T.; SIMAS, C. & DE LENCASTRE, H. **Comparison of genetic backgrounds of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Portuguese hospital and the community.** J. Clin. Microb., 43, 5130-5137, 2005

DEURENBERG, R. H. & STOBBERINGH, E. E. **The evolution of *Staphylococcus aureus*.** Infect. Gen. Evol., 8, 747-763, 2008

DEURENBERG, R.H.; NULENS, E.; VALVATNE, H.; SEBASTIAN, S.; DRISSEN, C.; CRAEGHS, J.; DE BRAUWER, E.; HEISING, B.; KRAAT, Y.J.; RIEBE, J.; STALS, F.S.; TRIENEKENS, T.A.; SCHERES, J.; FRIEDRICH, A.W.; VAN TIEL, F.H.; BEISSER, P.S. & STOBBERINGH, E.E. **Cross-Border Dissemination of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, Euregio Meuse-Rhin Region.** *Emerging Infectious Diseases* 15, 5, 2009.

DIEP, B.A.; PERDREAU-REMYNGTON, F. & SENSABAUGH, G.F. **Clonal Characterization of *Staphylococcus aureus* by multilocus restriction fragment typing, a rapid screening approach for molecular epidemiology.** *J. Clin. Microbiol.*, 41, 4559-64, 2003.

DIEP, B.A.; CHAMBERS, H.F.; GRABER, C.J.; SZUMOWSKI, J.D.; MILLER, L.G.; HAN, L.L.; CHEN, J.H.; LIN, F.; LIN, J.; VAN PHAN, T.H.; CARLETON, H.A.; MCDUGAL, L.K.; TENOVER, F.C.; COHEN, D.E.; MAYER, K.H.; SENSABAUGH, G.F. & PERDREAU-REMYNGTON, F. **Emergence of multidrug-resistant, community-associated, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone USA300 in men who have sex with men.** *Annals Int. Med.*, 148, 249-257, 2008.

DOMINGUEZ, M. A.; 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.*, 32, 2081-2087, 1994.

DOS SANTOS, S.M.J.; DA SILVA-CARVALHO, M.C.; FERREIRA-CARVALHO, B.T. & FIGUEIREDO, A.M. **Spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* belonging to the Brazilian epidemic clone in a general hospital and emergence of heterogenous resistance to glycopeptides.**

ENRIGHT, M.; DAY, N.; DAVIES, C.; PEACOCK, S. & SPRAT, B. **Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*.** *J. Clin. Microbiol.*, 38, 1008-1015, 2000.

ENRIGHT, M.C.; ROBINSON, D.A.; RANDLE, G.; FEIL, E.J.; GRUNDMANN, H. & SPRATT, B.G. **The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA).** *Proc Natl Acad Sci USA* 99 11,7687-7692, 2002.

FENG, Y.; CHEN, C-H.; SU, L-H.; HU, S.; YU, J. & CHIU, C-H. **Evolution and pathogenesis of *Staphylococcus aureus*: lessons learned from genotyping and comparative genomics.** *FEMS Microbiol Rev.* 32, 23-37, 2008

FERRY, T.; BES, M.; DAUWALDER, O.; MEUGNIER, H.; LINA, G.; FOREY, F.; VANDENESCH, F. & ETIENNE, J. **Toxin gene content of the lyon methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone compared with that of other pandemic clones.** *J. Clin. Microbiol.*, 44, 2642-2644, 2006.

FRANK, D.N.; FEAZEL, L.M.; BESSESIN, M.T.; PRICE, C.S. & JANIFF, E.N. **The human nasal microbiota and *S.aureus* carriage.** *PLoS One*, 5, 1-15, 2010.

FRENAY, H.M.; THEELEN, J.P.; SCHOOLS, L.M.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C.M.; VERHOEF, J., van LEEUWEN, W.J. & MOOI, F.R. **Discrimination of epidemic and nonepidemic methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains on the basis of protein A gene polymorphism.** *Clin Microbiol.*; 32, 846-847, 1994.

FRENAY, H.M.; BUNSCHOTEN, A.E.; SCHOOLS, L.M.; van LEEUWEN, W.J., VANDENBROUCKE-GRAULS, C.M.; VERHOEF, J. & MOOI, F.R. **Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on basis of protein A gene polymorphism.** *Eur J. Clin. Microbiol.Infect. Dis* 15(9): 768-70, 1996.

GILLET, Y.; ISSARTEL, B.; VANHEMS, P.; FOURNET, J. C.; LINA, G.; BES, M.; VANDENESCH, F.; PIÉMONT, Y.; BROUSSE, N.; FLORET, D. & ETIENNE, J. **Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients.** *Lancet*, 359, 753-759, 2002.

GILLET, Y.; BES, M.; LINA, G.; VANDENESCH, F.; FLORET, D.; ETIENNE, J. & RICHE, H. **Community acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in France: Emergence of a single clone that produces Panton Valentine Leukocidin.** Clin Infect Dis., 35, 819-824, 2002.

GONZALEZ, B. E.; RUEDA, A. M.; SHELBURNE, S. A.; MUSHER, D. M.; HAMILL, R. J. & HULTEN, K. G. **Community-associated strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as cause of healthcare-associated infection.** Infect. Control Hosp. Epidemiol., 27, 1051-1056, 2006.

GOTZ, F. ***Staphylococcus* and biofilms.** Mol. Microbiol., 43, 1367-1378, 2002.

GUZMÁN, E.; ROMEU, A. & GARCIA-VALLE, S. **Completely sequenced genomes of pathogenic bacteria: A review.** Enferm. Infec. Microbiol. Clin., 26, 88-98, 2008.

HARBARTH, S.; FRANCOIS, P.; SHRENZEL, J.; FANKHAUSER-RODRIGUEZ, C.; HUGONNET, S.; KOESSLER, T.; HUYGHE, A. & PITTET, D. **Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Switzerland.** Emerg. Infect. Dis., 11, 962-965, 2005.

HARBARTH, S. **Control of endemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-recent advances and future challenges.** Clin Microbiol Infect., 12, 1154-1162, 2006.

HIRAMATSU, K.; KATAYAMA, Y.; YAZAWA, H. & ITO, T. **Molecular genetics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** Int. J. Med. Microbiol., 292: 67-74, 2002.

HOLDEN, T.G.; FEILT, E. J.; LINDSAY, J.A.; PEACOCK, S.J.; DAYS, N. P.J.; ENRIGHT, M.C.; FOSTER, T.J.; HURST, L.; ATKIN, R.; BARRON, A.; BASON, N.; BENTLEY, S. D.; CHILIGWORTH, C.; CHILINGWORTH, T.; CHURCHER, C.; CLARK, L.; CORTON, C.; CRONIN, A.; DOGGET, J.; DOWD, L.; FELTWELL, T.; HANCE, Z.; HARRIS, B.; HAUSER, H.; HOLROYD, S.; JAGELS, K.; JAMES, K.D.; LENNARD, N.; LINE, A.; MAYES, R.; MOULE, S.; MUNGALL, K.; ORMOND, D.; QUAIL, M.A.; RABBINOWITSCH, E.; RUTHERFORD, K.; SANDERS, M.; HSU, L. Y.; KOH, Y. L.; CHLEBICKA, N. L.; TAN, T. Y.; KRISHNAN, P.; LIN, R.T.; TEE, N.; BARKHAM, T. & KOH, T.H. **Establishment of ST30 as the predominant clonal type among community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in Singapore.** J. Clin. Microbiol., 44, 1090-1093, 2005.

HIGUCHI, W.; TAKANO, T.; TENG, L.J. & YAMAMOTO, T. **Structure and specific detection of staphylococcal cassette chromosome *mec* type VII .** Biochemical and Biophysical Research Communications, 377, 752-756, 2008.

HUANG, Y.H.; TSENG, S.P.; HU, J.M.; TSAI, J.C.; HSUEH, P.R. & TENG, L.J. **Clonal spread of SCC*mec* type IV methicillin resistant *Staphylococcus aureus* between community and hospital.** Cli. Microbiol. Infect., 13: 717-724, 2007.

HUMPHREYS, H.; GRUNDMANN, H.; SKOV, R.; LUCET, C. & CAUDA, R. **Prevention and control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** Clin. Microbiol. Infect., 15, 120-4, 2009.

ITO, T.; KATAYAMA, Y.; ASADA, K. & MORI, N. **Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** Antimicrob. Agents Chemother., 45: 1323-1336, 2001.

ITO, T.; MA, X. X.; TAKEUCHI, F.; OKUMA, K.; YUZAWA, H. & HIRAMATSU, K. **Novel type V staphylococcal cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccrC*.** Antimicrob. Agents Chemother., 48, 2637-2651, 2004.

JARRAUD, S.; MOUGEL, C.; THIOULOUSE, J.; LINA, G.; MEUGNIER, H.; FOREY, F.; NESME, X.; ETIENNE, J. & VANDENESCH, F. **Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factor, agr groups (alleles) and human disease.** Infec. Immu., 70, 631-40, 2000.

JARRAUD, S.; LYON, G.J.; FIGUEIREDO, A.M.; GERARD, L.; VANDENESCH, F.; ETIENNE, J., MUIR, T.W. & NOVICK, R.P. **Exfoliatin-producing strains define a fourth *agr* specificity group in *Staphylococcus aureus***. J. Bacteriol., 82, 6517-6522, 2000.

JEVONS, P. "Celbenin" – resistant staphylococci. Br. Med., 1: 124-125, 1961.

JORGENSEN, H.J.; MATHISEN, T.; LØVSETH, A.; OMOE, K.; QVALE, K.S. & LONCAREVIC, S. **An outbreak of staphylococcal food poisoning caused by enterotoxin H in mashed potato made with raw milk**. FEMS Microbiol. Lett., 252, 267-72, 2005.

KATAYAMA, Y.; ITO, T. & HIRAMATSU, K. **A new class of genetic element, *Staphylococcus aureus* chromosome *mec*, encodes methicillin-resistant *Staphylococcus aureus***. Agents Chemother., 44, 1549-1555, 2000.

KANEKO, J. & KAMIO, Y. **Bacterial two-components and hetero-heptameric pore-forming cytotoxic toxins: structure pore-forming mechanism organization of the gene**. Biosci. Biotechnol. Biochem., 68, 981-1003.

KENNEDY, A.D.; OTTO, M.; BRAUGHTON, K.R.; WHITNEY, A.R.; CHEN, L.; MATHEMA, B.; MEDIAVILLA, J.R.; BYRNE, K.A.; PARKINS, L.D.; TENOVER, F.C.; KREISWIRTH, B.N.; MUSSER, J.M. & DELEO, F.R. **Epidemic community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, recent clonal expansion and diversification**. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., 105, 1327-1332, 2008.

KRAMER, A.; SCHWEBKE, I. & KAMPF, G. **How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review**. BMC Infect. Dis., 6, 130, 2006.

LAMBADEIRA-REY, M. & BOISSET, S. ***Staphylococcus aureus* Panton Valantine leukocidin causes necrotizing pneumonia**. Science, 315, 1082-1085, 2007.

LE LOIR, Y.; BARON, F. & GAUTIER, M. ***Staphylococcus aureus* food poisoning**. Genet Mol. Res., 31, 63-76, 2003.

LYER, R.N. & HITTINAHALLI, V. **Modified PAP method to detect heteroresistance to vancomycin among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates at a tertiary care hospital**. Indian. J. Med. Microbiol., 26, 176-179, 2008.

LYON, G.J.; WRIGHT, J.S.; MUIR, T.W. & NOVICK, R.P. **Key determinants of receptor activation in the *agr* autoinducing peptides of *Staphylococcus aureus***. Biochemistry., 41, 10095-10104, 2002.

JONAS, D.; SPECK, M.; DASCHNER, F.D. & GRUNDMANN, H. **Rapid PCR-Based Identification of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* from Screening Swabs**. J.Clin.Microbiol., 40, 1821-1823, 2002.

LOWY, F.D. ***Staphylococcus aureus* infections**. N. Engl. J. Med., 339: 520-532, 1998.

LAURENT, F.; LELIÉVRE, H. & COMU, M. **Fitness and competitive growth advantage of new gentamicine-susceptible MRSA clones spreading in French hospitals**. L. Antimicrob Chemother 47, 277-283, 2001.

LUCZAK-KADLUBOWSKA, A.; KRZYSZTON-RUSSJAN, J. & HRYNIEWICZ, W. **Characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated in Poland in 1996 to 2004 that were deficient in species-specific proteins**. J. Clin. Microbiol., 44, 4018-4024, 2006.

LUZAR, M.A.; COLES, G.A.; FALLER B.; SLINGENEYER, A.; DAH.; G.D.; BRIAT, C.; WONE., C.; KNEFATI, Y.; KESSLER., M. & PELUSO., F. ***Staphylococcus aureus* nasal carriage and infection in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis**. N. Engl. J. Med., 322, 505-509, 1990.

MAINARDI, J.L.; SHLAES, D.M.; GOERING, R.V.; SHLAES, J.H.; ACAR, J.F. & GOLDSTEIN, F. W. **Decreased teicoplanin susceptibility of methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus***. J. Infect. Dis., 171, 1646-1650, 1995.

MCDUGAL, L.K.; STEWARD, C.D.; KILLGORE, G.E.; CHAITRAM, J.M.; SIGIRD, K. & TENOVER, F.C. **Pulsed-Field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from United States: establishing a national database**. J. Clin. Microbiol, 41, 5113-5120, 2003

MANZUR, A.; DOMINGUEZ, A.M.; PUJOL, M.; GONZÁLEZ, M.P.; LIMON, E.; HORNERO, A.; MARTÍN, R.; GUDIOL, F. & ARIZA, J. **Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections, an emerging threat in Spain**. Clin. Microbiol. Infect., 14, 377-380, 2008.

MARRE, C.L.; DAUM, R.S.; BOYLE-VARRA, S.; MATAYOSHI, K. & MILLER, L.G. **Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates causing healthcare-associated infection**. J Infec. Dis., 13, 236-242, 2007.

MELO, M.C.; SILVA-CARVALHO, M.C.; FERREIRA, R.L.; COELHO, L.R.; SOUZA, R.R.; GOBBI, C.N.; ROZENBAUM, R.; SOLARI, C.A.; FERREIRA-CARVALHO, B.T. & FIGUEIREDO, A.M. **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., 58: 276-285, 2004.

MELTER, O.; SANTOS-SANCHES, I.; SCHINDLER, J.; ZEMLICKOVA, H. & DE LENCASTRE, H. **Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clonal types in the Czech Republic**. J. Clin. Microbiol., 37, 2798-2803, 1999.

MIRANDA, O.P.; CARVALHO, M.C.S.; RIBEIRO, A.; PORTELA, F.; CAETANO, N.; CORDEIRO, R., VIDAL, C. & FIGUEIREDO, A. M. **Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates carrying SCCmec IV in Brazil genetically related to USA 800**. Clin. Microbiol. Infect., 13, 1165-1172, 2007.

MILHEIRIÇO C.; OLIVEIRA, D.C. & DE LENCASTRE, H. **Update to the multiplex PCR strategy for assignment of *mec* element types in *Staphylococcus aureus***. J. Antimicrob. Chemother., 51, 3374-3377, 2007.

MILHEIRIÇO, C.; OLIVEIRA, D.C. & DE LENCASTRE, H. **Multiplex PCR strategy for subtyping the staphylococcal cassette chromosome *mec* type IV in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, SCCmec IV multiplex**. J. Antimicrob. Chemother., 60, 42-48, 2007.

MILLER, L. G.; PERDREAU-HEMINGTON, F.; RIEG, G.; MEHDI, S.; PERLROTH, J.; BAYER, A. S., TANG, A. W.; PHUNG, T. O. & SPELLBERG, B. **Necrotizing fasciitis caused by community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Los Angeles**. N. Engl. J. Med., 352, 1445-1453, 2005.

MORAN, G. B.; KRISHNADASAN, A.; GORWITZ, R. J.; FOSHEIM, G. E.; MCDUGAL, L. K.; CAREY, R. B. & TALAN, D. A. **Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections among patients in the emergency department**. N. Engl. J. Med., 355, 666-674, 2006.

MURCHAN, S.; KAUFMANN, M. E.; DEPLANO, A.; DE RYCK, R.; STRUELENS, M.; ZINN, C. E.; FUSSING, V.; SALMENLINNA, S.; VUOPIO-VARKILA, J.; EL SOLH, N.; CUNNY, C.; WITTE, W.; TASSIOS, P. T.; LEGAKIS, N.; VAN LEEUWEN, W.; VAN BELKUM, A.; VINDEL, A.; LACONCHA, I.; GARAZAR, J.; HAEGGMAN, S.; OLSSON-LILJEQUIST, B.; RANSJO, U.; COOMBES, G. & COOKSON, B. **Harmonization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for epidemiological typing of strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a single approach developed by consensus in 10 European laboratories and its application for tracing the spread of related strains**. J. Clin. Microbiol., 41, 1574-1585, 2003.

MONECKE, S.; BERGER-BÄCHI, B.; COOMBS, G.; HOLMES, A.; KAY, I.; KEARNS, A.; LINDE, H.J.; O'BRIEN, F.; SLICKERS, P. & EHRICHT, R. **Comparative genomics and DNA array-based genotyping of pandemic *Staphylococcus aureus* strains encoding Panton-Valentine leukocidin.** Clin Microbiol Infect., 13, 236-49, 2007.

MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; JORGENSEN, J. H.; PFALLER, M. A. & YOLKEN, R. H. ***Staphylococcus, Micrococcus* and another catalase-positive cocci that grow aerobically.** In: Manual of Clinical Microbiology. 8<sup>th</sup> ed. Washington. ASM Press., 1, 384-404, 2003.

Nacional Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approves standard, 2007.

NICAS, T.I.; COLE, C.T.; PRESTON, D.A.; SCHABEL, A.A. & NAGARAJAN, R. **Activity of glycopeptides against vancomycin-resistant gram-positive bacteria.** Antimicrobi. Agents. Chemother., 33, 1477-1481, 1989.

NNIS (National Nosocomial Infection Surveillance - NNIS). System report, data summary, from January 1992 through June 2004, issued October 2004. Am. J. Infect. Control., 32, 470-485, 2004.

NOTO, M.J.; KREISWIRTH, B.N.; MONK, A.B. & ARCHERI, G.L. **Gene acquisition at the insertion site for SCC<sub>mec</sub>, the genomic island conferring methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*.** J. Bacteriol., 190, 1276-1283, 2008.

NOVICK, R.P. & MUIR, T.W. **Virulence gene regulation by peptides in staphylococci and other Gram-positive bacteria.** Curr. Opin. Microbiol., 2, 40-45, 1999.

NOVICK, R.P. **Mobile genetic elements and bacterial toxinoses: the superantigen-encoding pathogenicity islands of *Staphylococcus aureus*.** Plasmid 49, 93-105, 2003.

NÜBEL, U.; ROUMAGNAC, P.; FELDKAMP, M.; SONG, J.H.; KO, K.S.; HUANG, Y.C.; COOMBS, G.; IP, M.; WESTH, H.; SKOV, R.; STRUELENS, M.J.; GOERING, R.V.; STROMMINGER, B.; WELLER, A.; WITTE, W. & ACHTMAN, M. (2008) **Frequent emergence and limited geographic dispersal of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** Plos One, 105, 14130-35, 2008.

O'BRIEN, F. G.; LIM, T. T.; CHONG, F. N.; COOMBS, G. W.; ENRIGHT, M. C.; ROBINSON, D. A., MONK, A.; SAI'D-SALIM, B.; KREISWIRTH, B. N. & GRUBB, W. B. **Diversity among Community Isolates of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Australia.** J. Clin. Microbiol., 42, 3185-90, 2004.

O'BRIEN, F.G.; COOMBS, G.W.; PEARSON, J.C.; CHRISTIANSEN, K.J. & GRUBB, W.B. **Type V staphylococcal cassette chromosome *mec* in community staphylococci from Australia.** Antimicrob. Agents Chemother., 49: 5129-5132, 2005.

O'HARA, F.P.; GUEX, N.; WORD, J.M.; MILLER L.A.; BECKER, J.A.; WALSH, S.L.; SCANGARELLA, N.E.; WEST, J.M.; SHAWAR, R.M. & AMRINE-MADSEN H. A. **Geographic variant of the *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine Leukocidin toxin and the origin of community-associated methicillin-resistant *S. aureus* USA300.** J. Infect. Dis., 197, 187-194, 2008.

OLIVEIRA, D.C.; SANCHES, I. S.; TAMAYO, M.; RIBEIRO, G.; COSTA, D. & DE LENCASTRE, H. **Virtually all MRSA infections in the largest Portuguese hospitals are caused by two intentionally spreads multi-resistant strains: the "Iberian" and the "Brazilian" clones of MRSA.** Clin. Microbiol. Infect., 4, 373-384, 1998.

OLIVEIRA, D.C.; TOMASZ, A. & DE LENCASTRE H. **The evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: identification of two ancestral genetic backgrounds and the associated *mec* elements.** Microb Drug Resist, 7, 349-61, 2001.

OLIVEIRA, G.A.; FARIA, J.B.; LEVY, C.E. & MAMIZUCA, E.M. **Characterization of the Brazilian endemic clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from hospitals throughout Brazil.** Braz. J. Infect. Dis., 5, 163-170, 2001.

OLIVEIRA, D.C. & DE LENCASTRE, H. **Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** Antimicrob. Agents Chemother., 46, 2155-2161, 2002.

OLIVEIRA, D.C.; TOMASZ, A & DE LENCASTRE, H. **Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** Lancet. Infect. Dis., 2: 180-189. *Erratum in:* Lancet. Infect. Dis., 2: 315, 2002.

OLIVEIRA, D.C., MILHEIRIÇO, C. & DE LENCASTRE, H. **Redefining a structural variant of staphylococcal cassette chromosome *mec*, SCC*mec* type VI.** Antimicrob. Agents Chemother., 50, 3457-3459, 2006.

OMOE, K.; HU, D.L.; TAKAHASHI-OMOE, H.; NAKANE, A. & SHINAGAWA, K. **Comprehensive analysis of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates.** FEMS Microbiol. Lett., 246, 191-8, 2005.

OTTER, J.A. & FRENCH, G.L. **Molecular epidemiology of community-associated methicillin-resistance *S. aureus* in Europe.** Lancet Infect. Dis., 10, 227-39, 2010.

PACHECO, A.B.; GUTH, B.E.; SOARES, K.C.; NISHIMURA, L. & DE ALMEIDA, D.F. **Random amplification of polymorphic DNA reveals serotype-specific clonal clusters among enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from humans.** J. Clin. Microbiol., 35, 1521-1525, 1997.

PARSEK, M.R. & SINGH, P.K. **Bacterial biofilms, an emerging link to disease pathogenesis.** Annu. Rev. Microbiol., 57, 677-701, 2003.

PEACOCK, S. J.; DE SILVA, I. & LOWY F. D. **What determines nasal carriage of *Staphylococcus aureus*?** Trends Microbiol., 9, 605-610, 2001.

PLATA, K.; ROSATO, A.E. & WEGRYN, G. ***Staphylococcus aureus* as a new infectious agent: overview of biochemistry and molecular genetics of its pathogenicity.** Acta Biochimica Polonica, 56, 597-612, 2009.

POTEL, C.; ALVAREZ, M.; ALVAREZ, P. & OTERO, I. **Evolution, antimicrobial susceptibility and assignment to international clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated over a 9-year period in two Spanish hospitals.** Clin. Microbiol. Infect., 13, 728-730, 2007.

RIBEIRO, A.; DIAS, C.; SILVA-CARVALHO, M.C.; BERQUÓ, L. FERREIRA, F.A.; SANTOS, R.N.S.; FERREIRA-CARVALHO, B. & FIGUEIREDO, A.M.S. **First report of infection with community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in South America.** J. Clin. Microbiol., 43, 1985-1988, 2005.

RICHARDSON, J.F & REITH, S. **Characterization of a strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (EMRSA-15) by conventional and molecular methods.** J. Hosp. Infect.; 25:45-52, 1993

RODRÍGUES-BAÑO, J.; BISCHOFBERGER, C.; ÁLVAREZ-LERMA, F.; ANSENSIÓD, A.; DELGADOE, T.; GARCÍA-ARCALF, D.; GARCÍA-ORTEGAA, L.; HERNÁNDEZG, M.J.; MOLINA-CABRILLANAH, J.M.; PÉREZ-CANOSAD, C. & PUJOLI, M. **Vigilancia y control de *Staphylococcus aureus* resistente a metilina en hospitales españoles.** Enferm. Infec. Microbiol. Clin., 26, 285-298, 2008.

RODRÍGUEZ-NOBREGA, E.; SEAS, C.; GUZMÁN-BLANCO, M.; MEJÍA, C.; ALVAREZ, C.; LUIS BAVESTRELLO, L.; ZURITA, J.; LABARCA, J. & LUNA, C. M. **Evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America.** International J. of Infect. Dis., 14, 560-566, 2010.

ROMAN, R. S.; SMITH, J.; WALKER, M.; BYRNE, S.; RAMOTAR, K.; DYCJK, B.; KABANI, A. & NICOLE, L. E. **Rapid geographic spread of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain.** Clin. Infect. Dis., 25, 698-705, 1997.

ROSSNEY, A.S.; SHORE, A.C.; MORGAN, P.M.; FITZGIBBON, M.M.; O'CONNELL, B. & COLEMAN, D.C. **The emergence and importation of diverse genotypes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) harboring the Panton-Valentine leukocidin gene (pvl) reveal that pvl is a poor marker for community-acquired MRSA strains in Ireland.** J Clin Microbiol., 45, 2554-63, 2007.

SÁ-LEÃO, R.; SANTOS-SANCHES, I.; DIAS, D.; PERES, I.; BARROS, R.M. & 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 strains?** J. Clin. Microbiol., 37, 1913-1920, 1999.

SAHA, B.; SINGH, A.K.; GHOSH, A. & BAL, M. **Identification and characterization of a vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from Kolkata (South Asia).** J. Med. Microbiol., 57, 72-79, 2008.

SAIMAN, L.; O'KEEFE, M.; GRAHAM, P. L.; WU, F.; SAID-SALIM, B.; KREISWIRTH, B.; LASALA, A.; SCHLIEVERT, P. M. & DELLA-LATTA, P. **Hospital transmission of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among postpartum women.** Clin. Infect. Dis., 37, 1313-19, 2003.

SANCHES, I.S.; RAMIREZ, M.; TRONI, H.; ABECASSIS, M.; PADUA, M.; TOMASZ, A. & DE LENCASTRE. **Evidence for the geographic spread of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone between Portugal and Spain.** J. Clin. Microbiol., 33, 1243-1246, 1995.

SCHABERG, D.R., CULVER, D.H. & GAYNES, R. P. **Major trends in the microbial etiology of nosocomial infection.** Am. J. Med., 91, 72S-75S, 1991.

SCRIBEL, L.V.; SILVA-CARVALHO, M.C.; SOUZA, R.R.; SUPERTI, S.V.; KVVITKO, C.H.C.; FIGUEIREDO, A.M.S. & ZAVASCKI, A.P. **Clinical and molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying SCCmecIV in a university hospital in Porto Alegre, Brazil.** Diag. Microbiol. Infec. Dis., 56, 457-61, 2009.

SHARP, S.; SIMMONDS, M.; STEVENS, K.; WHITEHEAD, S.; BARREL, B. G.; SPRATT, B. G. & PARKHILL, J. **Complete genomes of two clinical *Staphylococcus aureus* strains: Evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance.** PNAS, 26: 9786-9791, 2004 .

SHELBURNE, S. A.; MUSER, D. M.; HULTEN, K.; CEASAR, H.; LU, M. Y.; BHAILA, I. & HAMILL, R. J. ***In vitro* killing of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with drug combinations.** Antimicrob. Agents Chemother., 48, 4016-4019, 2004.

SHORE, A.; ROSSNEY, A.S.; KEANE, C.T.; ENRIGHT, M.C. & COLEMAN, D.C. **Genetic diversity among community methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains causing outpatients infections in Australia.** J. Clin. Microbiol., 42, 4735-4743, 2004.

SHORE, A.; ROSSNEY, A.S.; KEANE, C.T.; ENRIGHT, M.C. & COLEMAN, D.C. **Seven novel variants of the staphylococcal chromosome cassette *mec* in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Ireland.** Antimicrob. Agents Chemother., 49, 2070-2083, 2005.

SIERADZKI, K. & TOMASZ, A. **Inhibition of cell wall turnover and autolysis by vancomycin in a highly vancomycin-resistant mutant of *Staphylococcus aureus*.** J. Bacteriol., 179, 2557-2566, 1997.

SILVA-CARVALHO, M.C.; BONELLI, R.; SOUZA, R.R.; MOREIRA, S.; DOS SANTOS, L.C.G.; CONCEIÇÃO, M.S.; JUNIOR, S.J.M.; CARBALITO, J.M.; RITO, P.N.; VIEIRA, V.V.; TEIXEIRA,

L.A. & FIGUEIREDO, A.M.S. **Emergence of multiresistant variants related to USA 400 community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) as the most common MRSA isolates in two Rio de Janeiro hospitals.** *Diag. Microbiol, Infec.Dis.*, 65, 300-35, 2009.

SOARES, M. J. S.; TEIXEIRA, L.A.; NUNES, M.R.; CARVALHO, M.C.S.; FERREIRA-CARVALHO, B.T. & FIGUEIREDO, A.M.S. **Analysis of different molecular methods for typing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates belonging to the Brazilian Epidemic clone.** *J. Med. Microbiol.*, 50, 732-742, 2001.

SOLA, C.; SAKA-HECTOR, A.; Cordoba MRSA Collaborative Study Group, VINDEL, A. & BOCCO, L.J **Emergence and dissemination of a community-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* clone - Panton-Valentin Leucocidin positive sharing the ST5 lineage with the most prevalent nosocomial clone in the same region of Argentina.** *J. Clin. Microb.*, 46, 1826-31, 2008.

SOO KO, K.; KIM, Y.S.; SONG, J.H.; YEOM, J.S.; LEE, H.; JUNG, S.I.; JEONG, D.R.; KIM, S.W.; CHANG, H.H.; KI, H.K.; MOON, C.; OH, W.S.; PECK, K.R. & LEE, N.Y. **Genotypic diversity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in Korean hospitals.** *Antimicrobiol. Agents. Chemother.*, 49, 3583-3585, 2005.

SOUSA-JUNIOR, F.C.; SILVA-CARVALHO, M.C.; FERNANDES, M.J.B.C.; VIEIRA, F.L.P.; PELLEGRINO, C.; FIGUEIREDO, A.M.S.; de MELO, M.C.N. & MILAN, E.P. **Genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates obtained in the Northeast region of Brazil.** *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 42, 877-881, 2009

SOUZA, M.A.; SANCHES, I.S.; FERRO, M.L.; VAZ, M.J.; SARAIVA, Z.; TENDEIRO, T.; SERRA, J. & DE LENCASTRE, H. **Intercontinental spread of a multidrug-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone.** *J. Clin. Microbiol.*, 36, 2590-2596, 1998.

SOUZA, M.A.; CRISOSTOMO, M.I.; SANCHES, I.S.; FUZHONG, J.S.; TOMASZ, A. & DE LENCASTRE, H. **Frequent recovery of a single clonal type of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* from patients in two hospitals in Taiwan and China.** *J. Clin. Microbiol.*, 41: 159-163, 2003.

STRANDÉN, A., R.; FREI, R. & WIDMER, A. F. **Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: can PCR replace pulsed-field gel electrophoresis?** *J. Clin. Microbiol.*, 41, 3181-86, 2003.

STROMMINGER, R.; CUNY, C.; MERNER, G. & WITTE, W. **Obvious lack of association between dynamics of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in central Europe and geographic specificity groups.** *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.*, 23, 15-19, 2003.

STRUELENS, M.J. & DENIS, O. **Rapid molecular detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a cost-effective tool for infection control in critical care.** *Critical Care*, 10, 128, 2006.

TAKIZAWA Y.; TANEIKE I.; NAKAGAWA S.; OISHI T.; NITAHARA Y.; IWAKURA N.; OZAKI K.; TAKANO M.; NAKAYAMA T. & YAMAMOTO T. **A Panton-Valentine leucocidin (PVL)-positive community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strain, another such strain carrying a multiple-drug resistance plasmid, and other more-typical PVL-negative MRSA strains found in Japan.** *J. Clin. Microbiol.*, 43, 3356-3363, 2005.

TAUBES, G. **The bacteria fight back.** *Science*, 321, 356-361, 2008.

TEIXEIRA, L. A.; RESENDE, C. A.; ORMOND, L. R.; ROSEBAUM, R., FIGUEIREDO, A. M. S.; DE LENCASTRE, H. & TOMASZ, A. **Geographic spread of epidemic multiresistant *Staphylococcus aureus* clone in Brazil.** *J. Clin. Microbiol.*, 33: 2400-2404, 1995.

TENOVER, F.C.; ARBEIT, R.D.; GOERING, R.V.; MICKLSEN, P.A.; MURRAY, B.E. & PERSING, D.H. **Interpretin chromosomal DNA restriction patterns produced by pulse-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing.** *J. Clin. Microbiol.*, 33, 2233-39, 1995.

TENOVER, F.C.; ARBEIT, R.D. & GOERING, R.V. **How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists.** *Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America.* *Infect Control Hosp Epidemiol.*18, 426-439, 1997.

TENOVER, F.C.; WEIGEL, L.M.; APPELBAUM, P.C.; MCDUGAL, L.K.; CHAITRAM, J.; MCALLISTER, S.; CLARK, N.; KILLGORE, J.; O'HARA, C. M.; JEVITT, L.; PATEL, J. B. & BOZDOGAN, B. **Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate from a patient in Pennsylvania.** *Antimicrob. Agents Chemother.*, 48: 275-280, 2004.

TENOVER, F.C.; MCDUGAL, L.M.; GOERING, R.V.; KILLGORE, G.; PROJAN, S.T.; PATEL, J.B. & DUNMAN, P.M. **Characterization of a strain of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* widely disseminated in the United States.** *J. Clin. Microbiol.* 44, 108-118, 2006.

TIWARI, H.K. & SEN, M.R. **Emergence of vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) from a tertiary care hospital from northern part of India.** *BMC Infect. Dis.*, 6, 156, 2006.

UDO, E. E.; PEARMAN, J. W. & GRUBB, W.B. **Genetic analysis of community isolates methicillin-resistant *S. Aureus* in western Australia.** *J. Hosp. Infect.*, 25, 97-108, 1993.

UDO, E.E.; AL-SWEIH, N. & NORONHA, B.. **Characterisation of non-multiresistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (including EMRSA-15) in Kuwait Hospitals.** *Clin Microbiol Infect*; 12: 262–269, 2006

VALENTINI, P.; PARISE, G.; MONACO, M.; CREA, F.; SPANU, T.; RANNO, O.; TRONCI, M. & PANTOSTI, A. **A uncommon presentation for a severe invasive infection due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone USA300 in Italy: a case report.** *Annal. Clin. Microbiol. Antimicrobiol.* 7: 1-6, 2008.

VANDENESH, F.; NAIMI, T.; ENRIGHT, M.C., LINA, G.; NIMMO, G.R.; HEFFERMAN, H.; LIASSINE, N.; BES, M.; GREENLAND, T.; REVERDY, M.E. & ETIENNE, J. **Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: world wide emergence.** *Emerg. Infect. Dis.*, 9:978-984, 2003.

VON EIFF, C.; BECKER, K.; MACHKA, K.; STAMMER, H. & PETERS G. **Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia.** *N. Engl. J. Med.*, 344: 11-6, 2001.

VOYICH, J.M.; OTTO, M. & MATHEMA, B. **Is Panton Valantine leucocidin the major virulence determinat in community associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus*?** *J. Infect. Dis.* 194, 1761-1770, 2006

WALDRON, D. E. & LINDSAY, J. A. **Sau1: a novel lineage-specific type I Restriction- Modification system that blocks horizontal gene transfer into *Staphylococcus aureus* and between *S.aureus* isolates of different lineages.** *J. Bacteriol* 189, 5578-5585, 2006.

WANNET, W. J .B.; SPALBURG, E.; HECK,M.E.O.C.; PLUISTER, G. N.; WILLEMS, R.J.L. & de NEELING, A.J. **Widespread dissemination in The Netherlands of the epidemic Berlin methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone with low-level resistance to oxacillin.** *J. Clin. Microbiol.*, 3077-3082, 2004.

WANNET, W.J.B., SPALBURG, E., STER, G.N., WILLEMS, R.J.I. & NEELING, A.J. **Widespread disseminaton in tje Netherland of the Epidemic Berlin methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone with low-level resistance to oxacilin.** *J.clin.Microbiol*, 3007-3082.2004

WEIGEL, L .M.; DONLAN, R. M.; SHIN, D.H.; JENSEN, B.; CLARK, N.C.; MCDUGAL, L .K.; ZHU, W.; MUSSER, K.A.; THOMPSON, J.; KOHLERSCHMIDT, D.; DUMAS, N.; LIMBERGER, R.J. & PATEL, J.B. **High-level vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with a polymicrobial biofilm.** *Antimicrob. Agents Chemother.*, 51, 231-238, 2007.

WHITENER, C. J.; PARK, S. Y.; BROWNE, F. A.; PARENT, L. J.; JULIAN, K.; BOZDOGAN, B.; APPELBAUM, P. C.; CHAITRAM, J.; WEIGEL, L. M.; JERNIGAN, J.; MCDUGAL, L. K.; TENOVER, F. C. & FRIDKIN, S. K. **Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in the absence of vancomycin exposure.** Clin. Infect. Dis., 38, 1049-1055, 2004.

WILCOX, M. H.; KITE, P.; MILLS, K. & SUGDEN, S. **In situ measurement of linezolid and vancomycin concentrations in intravascular catheter-associated biofilm.** J. Antimicrob. Chemother., 47, 171-175, 2001

WISPLINGHOFF, H.; EWERTZ, P.; WISPLINGHOFF, S.; STEPANIK, 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. Microbiol., 43: 5445-5451, 2005. *Erratum in:* J. Clin. Microbiol., 44: 676, 2006.

WHITENER, C.J.; PARK, S.Y.; BROWNE, F.A.; PARENT, L.J.; JULIAN, K.; BOZDOGAN, B.; APPELBAUM, P.C.; CHAITRAM, J.; WEIGEL, L.M.; JERNIGAN, J.; MCDUGAL, L.K.; TENOVER, F.C. & FRIDKIN, S. K. **Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in the absence of vancomycin exposure.** Clin. Infect. Dis., 38, 1049-1055, 2004.

ZHANG, L.; GRAY, L.; NOVICK, R.P. & JI, G. **Transmembrane topology of AgrB, the protein involved in the post-translational modification of AgrD in *Staphylococcus aureus*.** J. Biol. Chem., 277, 34736-34742, 2002.

ZHANG, K.; MCCLURE, J. A.; ELSAYED, S.; TAN, J. & CONLY, J. M. **Coexistence of Pantone-Valentine Leukocidin-Positive and -Negative Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* USA 400 Sibling Strains in a Large Canadian Health-Care Region.** J. Infect. Dis., 197, 195-204, 2008.

ZHANG, K.; MCCLURE, J.A.; SAMMER, E. & CONLY, J. M. **Novel Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Type, Tentatively Designated Type VIII, Harboring Class A *mec* and Type 4 *ccr* Gene Complexes in a Canadian Epidemic Strain of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*.** Anti. Microbiol. Agents. Chemot., 53, 531-540, 2009.



# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)