

**LOREN PASCHOAL**

Epidemiologia molecular de infecções hospitalares da corrente sanguínea por *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina:  
Estudo multicêntrico (Projeto SCOPE Brasil)

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

**São Paulo**

**2010**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**LOREN PASCHOAL**

Epidemiologia molecular de infecções hospitalares da corrente sanguínea por *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina:  
Estudo multicêntrico (Projeto SCOPE Brasil)

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Campos Pignatari

**São Paulo**  
**2010**

PASCHOAL, Loren

**Epidemiologia molecular de infecções hospitalares da corrente sanguínea por *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina: Estudo multicêntrico (Projeto SCOPE Brasil)** / Loren Paschoal - São Paulo, 2010.

xv, 86 p

Tese (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias

**Título em inglês:** Molecular epidemiology of hospital infections of the bloodstream by *Staphylococcus aureus* resistant to oxacillin: A multicenter study (Project SCOPE Brazil)

1. *Staphylococcus aureus* 2. oxacilina 3. biologia molecular

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO**  
**ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA**  
**DISCIPLINA DE INFECTOLOGIA**

**Chefe do Departamento:**

Prof. Dr. Angelo Amato Vincenzo de Paola

**Coordenador do Curso de Pós-graduação:**

Prof. Dr. Ricardo Sobieh Diaz

# LOREN PASCHOAL

Epidemiologia molecular de infecções hospitalares da corrente sanguínea por *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina:  
Estudo multicêntrico (Projeto SCOPE Brasil)

## **BANCA EXAMINADORA:**

**Titular:** Dr<sup>a</sup>. Antonia Maria de Oliveira Machado

**Titular:** Dr<sup>a</sup>. Luci Corrêa

**Titular:** Dr. Marcelo Jenné Mimica

**Suplente:** Dr<sup>a</sup>. Marinês Dalla Valle Martino

Aprovada em: 26/08/2010

*Aos meus pais e minha irmã pelo amor e apoio incondicionais durante todos os momentos da minha vida.*

*Obrigada pelo incentivo constante e por todas as oportunidades que me proporcionaram.*

*Tenham certeza que vocês são os responsáveis pela pessoa que eu sou. Muito obrigada por todo o apoio, essa conquista também pertence a vocês! Amo muito vocês!*

*Ao Pablo que sempre me impulsionou a vencer meus medos e enfrentar as dificuldades. Me apoiou em todos os momentos mesmo eu tendo ficado ausente.*

*Muito obrigada! Te amo muito!*

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Antonio Carlos Campos Pignatari, diretor do Laboratório Especial de Microbiologia Clínica (LEMC), meus agradecimentos pela oportunidade concedida em fazer parte do LEMC, confiança depositada em meu trabalho, pelo exemplo de profissional humano e competente. Meu respeito e eterna gratidão pelas oportunidades que me foram dadas.

À grande companheira Adryella que além de ter se tornado uma pessoa que tenho enorme carinho, me ensinou a base da microbiologia. Espero carregar essa amizade mesmo que distante fisicamente pela vida toda.

À Jussimara Monteiro e Andréa Pereira que me ajudaram a fazer parte do LEMC. Sem vocês nada disso seria possível, serei eternamente grata.

Ao grande amigo Thomas Chagas, que além de me ensinar muito sobre microbiologia, aprendo com ele diariamente como ser humano. Obrigada pela confiança e oportunidade que me deu para realizar grandes sonhos pessoais.

À Fernanda Marques, Vinícius e Mirian pelo aporte e ensinamentos na realização dos experimentos como PFGE e MLST.

À Fernanda Inoue, pelos ensinamentos em MRSA durante o início do trabalho no LEMC e sua amizade. Sua colaboração foi fundamental para este estudo.

À Eliete Frigatto que além do apoio no LEMC me ajudou muito no início da carreira como microbiologista.

À Rosana Capecce que contribuiu durante todo o trabalho e em diversos momentos se mostrou disposta a ajudar.

A todos os amigos do LEMC e ALERTA, pelo trabalho em equipe, e pela amizade e apoio constantes durante todos os momentos que partilhamos.

Aos meus pais Ivette e Paschoal por todo incentivo, apoio e carinho. Vocês são fundamentais nesse trabalho.

À minha irmã Audrey que sempre foi amiga e companheira em todos os momentos. Nossa ligação é atemporal.

À minha amiga Fofa que além de amiga sempre foi uma mãe e irmã e com isso me deu suporte para toda essa jornada. Obrigada!

À Eliani e ao Sérgio que tenho enorme carinho. Agradeço todos os ensinamentos e suporte que me deram durante esses 8 anos.

A todos que fizeram parte direta ou indiretamente na realização desse trabalho, meu muito obrigada!



## SUMÁRIO

ÍNDICE DE TABELAS.....	X
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XII
ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	XIV
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. Infecções de corrente sanguínea.....	4
2.2. Mecanismos de resistência em <i>S. aureus</i> aos $\beta$ -lactâmicos .....	5
2.3. Epidemiologia .....	9
2.4. Epidemiologia Molecular .....	12
3. OBJETIVOS.....	17
4. METODOLOGIA .....	18
4.1. Desenho do estudo.....	18
4.2. Amostras Bacterianas .....	20
4.3. Testes Fenotípicos e Genotípicos.....	21
4.3.1. Reação em cadeia da polimerase (PCR) para a detecção do gene <i>nuc</i> .....	21
4.3.2. PCR multiplex para a determinação do tipo de SCC <i>mec</i> conforme protocolo desenvolvido por Zhang.....	23
4.3.3. PCR mutiplex para a determinação do tipo de SCC <i>mec</i> conforme protocolo desenvolvido por Milheiriço.....	27
4.3.4. PCR para a detecção do gene <i>lukF</i> , codificador da PVL (Panton- Valentine leukocidin) .....	29
4.3.5. Etest®.....	30
4.3.6. Perfil de Sensibilidade a vancomicina pela metodologia de Diluição em Ágar ..	31
4.3.7. Análise do polimorfismo do DNA cromossômico por PFGE .....	32
4.3.8. Tipagem molecular por <i>Multilocus Sequence Typing</i> – MLST .....	37
4.3.8.1. Extração do DNA genômico para a técnica de MLST.....	38
5. RESULTADOS .....	43
5.1. Frequência de <i>S. aureus</i> isolados no Projeto SCOPE Brasil.....	43
6. DISCUSSÃO.....	62
7. CONCLUSÕES.....	70
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
RESUMO.....	83
9. ANEXOS.....	84
9.1. Ficha clínica.....	84
9.2. Produção científica .....	85
9.2.1.Trabalho aceito em congresso .....	85

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Identificação dos tipos de SCCmec em <i>S. aureus</i> .....	08
<b>Tabela 2.</b> Centros médicos participantes do Projeto SCOPE Brasil (Junho de 2007 a Julho de 2009).....	21
<b>Tabela 3.</b> Regiões alvo, cepas controles e número de acesso do GenBank.....	24
<b>Tabela 4.</b> Sequência dos primers utilizados para reação em cadeia da polimerase (PCR) multiplex para determinação dos tipos de SCCmec.....	25
<b>Tabela 5.</b> Sequência dos primers utilizados para PCR multiplex para a determinação dos tipos de SCCmec, segundo Milheiriço e colaboradores (2007).....	28
<b>Tabela 6.</b> Cepas de <i>S. aureus</i> utilizadas como controles no presente estudo.....	35
<b>Tabela 7.</b> Primers utilizados para amplificação de fragmentos gênicos de <i>S. aureus</i> , através da PCR a fim de serem analisados pela técnica de MLST (Enright <i>et al.</i> , 2000).....	38
<b>Tabela 8.</b> Principais patógenos isolados em hemoculturas de pacientes admitidos em hospitais brasileiros, em comparação com dados do Programa SCOPE Norte-Americano (SCOPE Brasil 2007- 2009).....	43
<b>Tabela 9.</b> Patógenos Gram positivos mais frequentemente isolados em hemoculturas de pacientes admitidos em hospitais brasileiros (SCOPE Brasil 2007 -2009).....	44
<b>Tabela 10.</b> Porcentagem de distribuição de MRSA isolados de infecções de corrente sanguínea entre os centros do Projeto SCOPE Brasil (2007-2009).....	45

<b>Tabela 11.</b> Data da hemocultura, tipos de <i>SCCmec</i> e CIM de oxacilina e vancomicina das amostras de MRSA isolados de infecções de corrente sanguínea do Projeto SCOPE Brasil (2007-2009).....	47
<b>Tabela 12.</b> Porcentagem, distribuição dos tipos de <i>SCCmec</i> e CIM 50/90 de MRSA isolados de infecções de corrente sanguínea segundo os protocolos de Zhang e colaboradores (2005) e Milheiriço e colaboradores (2007).....	48
<b>Tabela 13.</b> Porcentagem de distribuição de MRSA isolados de infecções de corrente sanguínea nas regiões brasileiras e CIM 50/90 de oxacilina e vancomicina.....	49
<b>Tabela 14.</b> Relação das amostras de MRSA isolados de infecções de corrente sanguínea com os respectivos resultados do <i>SCCmec</i> , MLST, ST e CC do Projeto SCOPE Brasil (2007-2009).....	58

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Localização geográfica dos dezesseis centros participantes do Projeto SCOPE – Brasil, 2007-2009.....	20
<b>Figura 2:</b> Fluxograma da caracterização das amostras de MRSA de infecções de corrente sanguínea do Projeto SCOPE Brasil (2007 - 2009).....	42
<b>Figura 3.</b> Distribuição dos MRSA isolados de infecções de corrente sanguínea nas regiões brasileiras e os tipos de <i>SCCmec</i> encontrados.....	49
<b>Figura 4:</b> Dendrograma de similaridade genética entre os 62 isolados de MRSA de acordo com padrão de PFGE, construído pelo método de agrupamento UPGMA, baseado no coeficiente de Dice. As colunas à direita do dendrograma correspondem respectivamente, ao número do banco LEMC ou clone, tipo de <i>SCCmec</i> , ano de isolamento e número do centro participante do Projeto SCOPE Brasil.....	52
<b>Figura 5.</b> Análise dos clusters das amostras contendo <i>SCCmec</i> tipo I com os clones Chile/Córdoba, utilizando o coeficiente de similaridade de Dice e o método UPGMA. As colunas à direita do dendrograma correspondem, respectivamente, ao número do banco Lemc ou clone, tipo de <i>SCCmec</i> , ano de isolamento e número do centro participante do Projeto SCOPE Brasil.....	53
<b>Figura 6.</b> Análise dos clusters das amostras contendo <i>SCCmec</i> tipo II com o clone Nova Iorque/Japão, utilizando o coeficiente de similaridade de Dice e o método UPGMA. As colunas à direita do dendrograma correspondem, respectivamente, ao número do banco LEMC ou clone, tipo de <i>SCCmec</i> , ano de isolamento e número do centro participante do Projeto SCOPE Brasil.....	54
<b>Figura 7.</b> Análise dos clusters das amostras contendo <i>SCCmec</i> tipo III com o Clone Epidêmico Brasileiro, utilizando o coeficiente de similaridade de Dice e o método UPGMA. As colunas à direita do dendrograma correspondem, respectivamente, ao número do banco LEMC ou clone, tipo de <i>SCCmec</i> , ano de isolamento e número do centro participante do Projeto SCOPE Brasil.....	56

**Figura 8.** Análise dos clusters das amostras contendo SCCmec tipo IV com o clone Pediátrico, USA300 e USA400, utilizando o coeficiente de similaridade de Dice e o método UPGMA. As colunas à direita do dendrograma correspondem, respectivamente, ao número do banco LEMC ou clone, tipo/subtipo de SCCmec, ano de isolamento e número do centro participante do Projeto SCOPE Brasil..... 57

**Figura 9:** Diagrama do Complexo Clonal (CC5) obtido em 21 de Junho de 2010 através do programa BURSTv2 (<http://pubmlst.org/software/analysis/start> e <http://saureus.mlst.net/>) mostrando os isolados estudados com os ST5, 105 e 1176 na base de dados pública de *S. aureus* MLST (<http://www.mlst.net/>). O círculo em azul indica o progenitor do grupo o CC5. Os círculos em vermelho correspondem aos MRSA em estudo pertencentes ao mesmo Complexo Clonal, já aqueles em verde são os descritos anteriormente no Brasil. O diâmetro dos pontos depende do número de amostras com o ST indicado. As linhas mostram com qual ST eles estão ligados..... 60

**Figura 10:** Diagrama do Complexo Clonal 8 obtido em 21 de Junho de 2010 através do programa BURSTv2 (<http://pubmlst.org/software/analysis/start> e <http://saureus.mlst.net/>) mostrando o isolado estudado com o ST 239 na base de dados pública de *S. aureus* MLST (<http://www.mlst.net/>). O círculo em azul indica o progenitor deste grupo CC8, já em vermelho indica os isolados com ST 239..... 61

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC - *American Type Culture Collection*

CC - complexo clonal

CDC - *Centers for Disease Control and Prevention*

CEB - Clone epidêmico brasileiro

CIM - concentração inibitória mínima

CLSI - *Clinical Laboratory Standards Institute*

ICS - infecções de corrente sanguínea

IRAS - infecções comunitárias e relacionadas à assistência à saúde

LEMC - Laboratório Especial de Microbiologia Clínica

MLST - *Multilocus sequence typing*

MRSA - methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

NCTC - *National Collection of Type Cultures*

NISS - *National Nosocomial Infection Surveillance System*

ORF - *open reading frame*

ORSA - oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*

OSPC - *Oceania South Pacific Clone*

PBP - *Penicillin Binding Protein*

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

PFGE - *pulsed-field gel electrophoresis*

PVL - Pantón-Valentine leucocidina

SCC<sub>mec</sub> - cassete cromossômico estafilocócico *mec*

SCOPE - *Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiological Importance*

SIRS - síndrome da resposta inflamatória sistêmica

ST - *sequence type*

SWP - *South West Pacific*

TSB - *Tryptone Soy Broth*

UFC - unidades formadoras de colônias

UTI - Unidade de Terapia Intensiva

UNIFESP - Universidade Federal de São Paulo

UPGMA - *Unweighted Pair-Groups Method using arithmetic averages*

USA - *United States of America*

VISA - *Staphylococcus aureus* intermediário à vancomicina

## 1. INTRODUÇÃO

A vigilância constante dos patógenos presentes nas infecções de corrente sanguínea (ICS) é necessária para determinar as tendências de resistência, fornecer informações úteis relativas aos pacientes, fatores de risco e diferenças geográficas.

No Brasil, após a descrição do clone brasileiro em 1992 no Hospital São Paulo (Sader *et al.*, 1994), poucos estudos relataram dados sobre a persistência deste padrão molecular em hospitais do país (Teixeira *et al.*, 1995; Oliveira *et al.*, 2001). Além disso, apenas um estudo identificou os diferentes tipos de SCC*mec* presentes nos isolados brasileiros de MRSA (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) (Trindade *et al.*, 2005). Pouco se sabe sobre a identificação de novas linhagens genéticas de MRSA hospitalares, sobre a confirmação da persistência deste clone, ou quanto aos tipos de SCC*mec* presentes.

Uma vez que não existem dados satisfatórios na literatura a esse respeito, a identificação e constatação da diversidade de clones de MRSA possibilitariam a realização de um estudo epidemiológico que pudesse avaliar corretamente estes fatores em diferentes hospitais localizados nas cinco regiões brasileiras.

No Hospital São Paulo, os diferentes perfis moleculares dos cinco isolados de MRSA identificados pelo estudo de Monteiro no ano de 2005, sugerem a presença de diversidade genética e a evolução deste clone. Este achado justifica uma investigação mais minuciosa sobre o assunto, incluindo um maior número de isolados de MRSA neste e em outros hospitais do país. Adicionalmente, a classificação do SCC*mec* dos diferentes isolados clínicos de



MRSA provenientes do Brasil ainda é desconhecida. O conhecimento destes novos tipos de SCCmec possibilitaria estudar a evolução genética destes clones de MRSA, identificando novas linhagens epidemiológicas de *S. aureus*.

Para a pesquisa dos *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), fica evidente a relevância da determinação correta e com acurácia da resistência à oxacilina pelo laboratório clínico, incluindo as amostras comunitárias. Diversos pesquisadores nacionais estudam, no momento, a prevalência dessas infecções por MRSA contendo esses determinantes genéticos. Tais dados são essenciais para uma orientação terapêutica mais adequada seja em ambiente hospitalar ou comunitário.

A resistência bacteriana aos antimicrobianos eleva a morbi-mortalidade dos pacientes com infecções adquiridas na comunidade e, principalmente, daqueles que adquirem infecções hospitalares. O controle da resistência bacteriana é complexo e exige atuação em vários setores; sendo que as atividades mais eficazes envolvem o controle da disseminação de bactérias resistentes (no hospital e na comunidade) e o controle no uso dos antibióticos (uso racional). Porém, para que essas medidas sejam implementadas, é necessário entender como as bactérias resistentes se disseminam para que as medidas adequadas de controle possam ser utilizadas. Por outro lado, para que os antibióticos sejam utilizados adequadamente, especialmente no tratamento empírico, é necessário o conhecimento dos mecanismos de resistência envolvidos e como estes se relacionam a pressão seletiva exercida por diferentes classes de antibióticos, ou mesmo por diferentes drogas de uma mesma classe. Como todos esses parâmetros variam muito de acordo com a

região geográfica ou mesmo o tipo de hospital, estudos realizados em nosso território em diferentes hospitais se fazem necessários.

Para tanto foi elaborado um projeto de vigilância denominado Projeto SCOPE Brasil (*Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiological Importance*) iniciado em Junho de 2007. Tal projeto tem interesse em estudar as características epidemiológicas e microbiológicas das infecções da corrente sanguínea de relevância clínica nos hospitais brasileiros, compreendendo todas as regiões do Brasil (Sul, Sudeste, Centro-Oeste, Norte e Nordeste).

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Infecções de corrente sanguínea

As infecções hospitalares continuam a ser um grande problema de saúde, não só no Brasil, mas também em países desenvolvidos (Diekema *et al.*, 2002; Edmond *et al.*, 1999).

Infecções de corrente sanguínea estão entre as mais comuns infecções associadas à assistência a saúde e apresentam alta morbidade e mortalidade (Diekema *et al.*, 2003; Wenzel *et al.*, 2001). Estima-se que dois milhões de pacientes por ano adquiram infecções hospitalares nos Estados Unidos, desses, aproximadamente 350 mil (10–20%) são de corrente sanguínea, sendo 90 mil (4,5%) fatais (Diekema *et al.*, 2003; Wenzel *et al.*, 2001; Center for Disease Control and Prevention – CDC, 2002).

De 1960 a 1970, as bactérias Gram negativas eram os patógenos mais comumente isolados de ICS. Desde então, as infecções causadas pelos Gram positivos têm se tornado cada vez mais frequentes (Edmond *et al.*, 1999; Diekema *et al.*, 2002).

Informações da prevalência de infecções por *S. aureus* têm sido geradas pelo programa SENTRY de vigilância antimicrobiana. Segundo dados deste programa, no período de 1997 a 2002 *S. aureus* esteve entre os três patógenos mais frequentemente isolados de hemoculturas provenientes de hospitais da América do Norte, América Latina e Europa (Biedenbach *et al.*, 2004). Em relação ao Brasil, este patógeno foi o mais prevalente isolado de ICS (23,5%) em doze hospitais localizados em quatro estados diferentes (Sader *et al.*, 2001).

As taxas de resistência antimicrobiana aumentaram nas últimas duas décadas em relação a todos os microrganismos isolados de ICS, incluindo o *S. aureus*. Desse modo, com a emergência de patógenos multi-resistentes, a terapia antimicrobiana profilática e o tratamento destas infecções têm se tornado cada vez mais difíceis, e as informações epidemiológicas atualizadas são necessárias para ajudar na adequação da terapia empírica (Biedenbach *et al.*, 2004).

## **2.2. Mecanismos de resistência em *S. aureus* aos $\beta$ -lactâmicos**

No início dos anos 1940, infecções por *S. aureus* eram tratadas com penicilina e em 1942 foi relatado o primeiro caso de resistência a esta droga devido a aquisição do plasmídeo que codifica a enzima penicilinase. No fim da década de 60, mais de 80% de todos os isolados de *S. aureus* provenientes do ambiente hospitalar ou da comunidade, apresentavam resistência à penicilina. Atualmente, mais de 90% dos isolados de *S. aureus* produzem penicilinase. Adicionalmente cepas de *S. aureus* desenvolveram resistência a meticilina/oxacilina (penicilina semi-sintética resistente à ação das  $\beta$ -lactamases) chamadas de MRSA ou ORSA (oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*), através da aquisição do gene *mecA* (Lowy, 2003).

A resistência à meticilina em *S. aureus* é decorrente da alteração do sítio de ação dos  $\beta$ -lactâmicos (Brumfitt and Hamilton-Miller, 1989; Chambers and Sachdeva, 1990; Lyon and Skurray, 1987). Os antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos agem através da inibição de enzimas que desempenham um papel importante na síntese da parede bacteriana. Essas enzimas catalisam a etapa final da síntese da parede celular e, por serem o sítio de ação das penicilinas,

passaram a ser chamadas de proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs). Estas PBPs catalisam a reação de transpeptidação necessária para a união das cadeias de peptidoglicano, constituintes da parede celular bacteriana. As PBPs normalmente possuem alta afinidade de ligação aos  $\beta$ -lactâmicos e são inibidas por concentrações muito baixas destes agentes.

*S. aureus* possui normalmente quatro PBPs e se torna resistente aos compostos  $\beta$ -lactâmicos através da produção de uma PBP adicional, denominada PBP2a ou PBP2', uma proteína de 78-kDa (Brumfitt and Hamilton-Miller, 1989; Chambers, 1997). Esta nova PBP substitui a função das demais PBPs neste patógeno, permitindo que o microrganismo sobreviva em concentrações de  $\beta$ -lactâmicos que, em outras condições, seriam letais. Conseqüentemente, a resistência à meticilina em *S. aureus* confere resistência a todos os demais agentes  $\beta$ -lactâmicos, inclusive às cefalosporinas (Chambers, 1997).

A codificação destas novas PBPs está relacionada à aquisição do gene *mecA* pelo *S. aureus*. Este gene faz parte de um elemento genético móvel encontrado em todos os isolados de MRSA. Foi demonstrado que o gene *mecA* faz parte de um elemento genômico designado *staphylococcal cassette chromosome mec* (SCC*mec*), integrado ao cromossomo de *S. aureus* (Hiramatsu *et al.*, 2002; Katayama *et al.*, 2000).

O SCC*mec* é composto pelo complexo do gene *mec*, que codifica resistência à meticilina e o complexo do gene *ccr* (do inglês *cassette chromosome recombinase*), que codifica recombinases responsáveis pela sua mobilidade. Além disso, uma região denominada J (derivada do termo inglês *junkyard*) compõe o restante do material genético do complexo SCC*mec*. Não

se sabe ao certo qual a importância desta região em termos funcionais para o MRSA (exceto genes que codificam resistência para outros agentes antimicrobianos não  $\beta$ -lactâmicos e metais pesados). No entanto, esta região é de grande importância para auxiliar na classificação dos diferentes tipos de SCC*mec*.

O complexo do gene *mecA* é composto pelo gene propriamente dito e de seus genes regulatórios *mecI* e *mecR1*, localizados na região posterior ao promotor do gene *mecA*. O gene *mecI* codifica uma proteína que se liga ao DNA e reprime a transcrição do gene *mecA*, enquanto que o gene *mecR1* codifica uma proteína que promove a transcrição do gene *mecA* na presença de  $\beta$ -lactâmicos (Sharma *et al.*, 1998). São conhecidas quatro classes deste complexo, nomeadas de A a D, que divergem entre si de acordo com a presença de determinadas sequências de inserção (sequências de DNA envolvidas com a mobilização de informação genética, de função similar aos plasmídeos) (Katayama *et al.*, 2001).

O complexo *ccr* é composto pelos genes *ccrA*, *ccrB* e *ccrC* envolvidos por ORFs (*open reading frames*) localizadas no complexo SCC*mec*, responsáveis pela codificação de polipeptídeos que têm como função a excisão e integração do SCC*mec* no cromossomo estafilocócico (Katayama *et al.*, 2000; Ito *et al.*, 2009). Esses genes são designados de *ccrA1* e *ccrB1* (em SCC*mec* tipo I), *ccrA2* e *ccrB2* (em SCC*mec* tipo II), *ccrA3* e *ccrB3* (em SCC*mec* tipo III), *ccrA2* e *ccrB2* (em SCC*mec* tipo IV) e *ccrC* (em SCC*mec* tipo V), *ccrA4* e *ccrB4* (em SCC*mec* tipo VI), *ccrC* (em SCC*mec* tipo VII) e *ccrA4* e *ccrB4* (em SCC*mec* tipo VIII) (Ito *et al.*, 2004; Ito *et al.*, 2009).

Atualmente são conhecidos oito diferentes tipos de *SCCmec*, classificados em tipos (*SCCmec* I a VIII) e subtipos (*SCCmec* tipo IV e subtipos IVa, IVA, IVb, IVc, IVd, IVE, IVg, IVh, IVi e IVj) . Os tipos de *SCCmec* são definidos por meio da combinação do complexo *ccr* e seu alotipo e a classe do gene *mecA* (tabela 1) (Ito *et al.*, 2009).

**Tabela 1.** Identificação dos tipos de *SCCmec* em *S. aureus*.

<i>SCCmec</i>	complexo gene <i>ccr</i> (alotipo)	complexo gene <i>mec</i>
I	1 (A1B1)	B
II	2 (A2B2)	A
III	3 (A3B3)	A
IV	2 (A2B2)	B
V	5 (C)	C2
VI	4 (A4B4)	B
VII	5 (C)	C1
VIII	4 (A4B4)	A

Adaptado de Ito *et al.*, 2009.

Os menores *SCCmec* (tipos I, IV, V, VI, VII e VIII) contêm, geralmente, somente recombinases e genes estruturais e regulatórios para resistência à metilina. Por outro lado, os tipos II e III possuem elementos de transposição e genes codificadores de resistência aos antimicrobianos não  $\beta$ -lactâmicos. Os isolados que contêm os tipos I, II e III possuem classicamente origem hospitalar e os tipos IV e V têm origem comunitária (Deresinski, 2005). Oliveira e colaboradores identificaram em 2006 um tipo de *SCCmec* (tipo VI), anteriormente classificado como tipo IV pelos mesmos pesquisadores. Esta reclassificação foi relacionada a um novo alotipo de *ccrAB* (*ccrAB4*) presente em

uma das primeiras amostras descritas deste clone (HDE288) (Oliveira *et al.* 2006).

Embora a origem do SCC*mec* permaneça desconhecida, uma das hipóteses seria que o cassete poderia provir do *Staphylococcus sciuri* que albergou o ancestral da PBP2a, uma vez que uma PBP foi encontrada no mesmo e demonstrou ter 87,8% da sequência dos aminoácidos da PBP2a (Wu *et al.*, 2001).

No início do século XXI novos aspectos moleculares da resistência de MRSA passaram a ser estudados com grande repercussão, particularmente em amostras de isolados de infecções comunitárias, nos Estados Unidos (*Center for Disease Control and Prevention – CDC*, 1999). Tais cepas carregam frequentemente o gene *lukF* codificador da exotoxina PVL (Panton-Valentine leukocidin) que é capaz de provocar choque séptico e necrose na pele, tecido celular subcutâneo e pulmonar (Boyle-Vavra and Daum, 2007). Ribeiro e colaboradores (2005) na UFRJ, possibilitaram a detecção em nosso meio dos primeiros casos de amostras carregando o SCC*mec* tipo IV com toxina PVL em Porto Alegre.

### **2.3. Epidemiologia**

*S. aureus* é um patógeno amplamente disseminado em ambientes intra e inter-hospitalares e é frequentemente encontrado colonizando profissionais de saúde e pacientes (Calfee *et al.*, 2003).

*S. aureus* desempenham um importante papel nas infecções hospitalares bem como em infecções adquiridas na comunidade (Chambers, 2001; Frank *et al.*, 1999; Gorak *et al.*, 1999; Hussain *et al.*, 2000). Desde sua



descoberta durante os anos 1880, *S. aureus* surgiu como uma bactéria Gram positiva oportunista, potencialmente patogênica associada a diversos processos infecciosos, desde pequenas infecções de pele a infecções de feridas pós-operatórias, bacteremia, osteomielite, endocardite e pneumonia necrotizante (Lowy, 2003; Moran and Mount, 2003).

Os componentes bacterianos e os produtos secretados que contribuem para a patogenicidade das infecções por *S. aureus* são numerosos e incluem adesinas, exoenzimas e exotoxinas (Projan and Novick, 1997).

Na América Latina, *S. aureus* foi o agente mais frequentemente isolado de pele e tecidos moles (Sader *et al.*, 2002a) e de infecções de corrente sanguínea em pacientes hospitalizados (Sader *et al.*, 2002b). Neste último estudo, constatou-se que, no período compreendido entre 1997 a 2000, houve um aumento de cerca de 3% na frequência de isolamento deste patógeno em hemoculturas, dos quais 30,6% dos mesmos eram resistentes à oxacilina. Estudos mais recentes do Programa de Vigilância SENTRY (*Antimicrobial Surveillance Program*) demonstram que *S. aureus* continua a ser o patógeno predominante de infecções de pele e tecidos moles na América Latina, América do Norte e Europa, no período compreendido entre 1998 a 2004 (Moet *et al.*, 2007).

Diversos são os fatores de risco apontados para a aquisição de infecções por MRSA. Variações da maior ou menor prevalência destes fatores ocorrem de acordo com a localização geográfica, a instituição e a população de pacientes estudados (Oztoprak *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008). De um modo geral, os fatores de risco mais citados na literatura relacionados à aquisição de bacteremia por MRSA são: antibioticoterapia prévia; permanência prolongada

em UTI; uso de cateteres venosos centrais e urinários; infecções e colonização prévia por MRSA; hospitalização prévia e presença de co-morbidades (Conterno, 1999; Rezende *et al.*, 2002; Carnicer-Pont *et al.*, 2006; Guilarde *et al.*, 2006).

Em um hospital situado em Bruxelas, na Bélgica, a utilização prévia de antimicrobianos é citada como o principal fator de risco para infecções da corrente sanguínea por MRSA, sendo 68% das mesmas associadas ao uso de algum destes agentes (Libert *et al.*, 2008). Estudos realizados em hospitais terciários na Turquia e Espanha, que compararam fatores de risco para MRSA e MSSA (*Staphylococcus aureus* sensível à meticilina), observaram que a permanência acima de 48 horas em UTI estava correlacionada à aquisição de MRSA (García-Vázquez *et al.*, 2007; Oztoprak *et al.*, 2006). Na Turquia, 47% dos casos de bacteremia por *S. aureus* estavam relacionados e intimamente ligados à excessiva prática de procedimentos invasivos que ocorrem neste tipo de unidade.

O sistema nacional de notificação de infecções hospitalares dos Estados Unidos (*National Nosocomial Infections Surveillance System* - NNIS) considerou este microrganismo a causa mais comum de infecções hospitalares relatada entre 1992 e 2004 (NNIS, 2004).

Na Argentina, um estudo de vigilância que envolveu 27 centros médicos identificou 58% de resistência à meticilina durante o período de 1996 a 1998 (Bantar *et al.*, 2000). Outro estudo adicional, pertencente ao Consórcio Internacional de Controle de Infecção, envolvendo 10 UTIs colombianas, observou 65,4% de isolados de MRSA (Moreno *et al.*, 2006).

Vários relatos demonstraram uma alta frequência de MRSA em pacientes com bacteremias admitidos em hospitais brasileiros. Em alguns estudos, taxas próximas a 80% foram identificadas em pacientes internados em hospitais universitários (Conterno *et al.*, 1998; Guilarde *et al.*, 2006; Moreira *et al.*, 1998). Trabalho realizado na Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) comparou taxas de mortalidade entre bacteremias causadas por MRSA e MSSA no período de 1995 a 1996. Houve diferença significativa entre essas taxas, sendo que a mortalidade atribuída a MRSA na época foi de 42% (Conterno, 1999).

Um estudo caso-controle, que investigou 282 casos de infecção hospitalar durante os anos de 2000 a 2001, realizado em hospital universitário na cidade de Goiânia, confirma este alto percentual, no qual 58,3% de 84 casos de bacteremias foram atribuídas a MRSA (Guilarde *et al.* 2006).

Estudo realizado em um hospital universitário na cidade de São Paulo no período de 2002 a 2003 investigou amostras de MRSA isoladas de hemoculturas de 203 pacientes. Neste trabalho, observou-se uma alta taxa de mortalidade dos pacientes infectados (46%) até quatro semanas após o isolamento laboratorial de MRSA (Trindade, 2005).

#### **2.4. Epidemiologia Molecular**

Tradicionalmente foram descritos a existência de cinco clones de MRSA disseminados internacionalmente, denominados "clones epidêmicos" pela técnica de tipagem molecular - PFGE. Estas linhagens foram designadas como Ibérico, Brasileiro, Húngaro, Nova Iorque/Japão, e pediátrico epidêmico, de acordo com a área geográfica onde foram primariamente isolados e/ou

indicando características epidemiológicas únicas. Considera-se que estes clones são responsáveis, em conjunto, pela maioria das infecções por MRSA no mundo (Oliveira *et al.*, 2002).

O clone Ibérico foi descrito inicialmente na Espanha em 1989 e desde então tem sido identificado em outros países da Europa e nos Estados Unidos (Roberts *et al.*, 1998; Sa-Leao *et al.*, 1999; Sanches *et al.*, 1995). Além de encontrar-se amplamente disseminado em hospitais da Hungria, o clone Húngaro foi recentemente identificado em Taiwan (Aires de *et al.*, 2003). De acordo com estudos mais recentes, observa-se a diminuição da incidência deste clone em países como Espanha e Portugal, nos quais ocorre a emergência de outros clones com menor espectro de resistência a antibióticos não  $\beta$ -lactâmicos (Cuevas *et al.*, 2007).

O clone Nova Iorque/Japão foi inicialmente considerado o clone de MRSA predominante em hospitais da região metropolitana de Nova Iorque e algumas regiões adjacentes, além de ter sido identificado também em um hospital em Tóquio, Japão (Aires de *et al.*, 2000). Atualmente, além deste clone ter sido detectado em outros países como Hungria e México, é considerado nos Estados Unidos como principal clone em casos de infecção relacionada à assistência à saúde (McDougal *et al.*, 2003). Esse clone foi relatado inicialmente por de Miranda e colaboradores (2007).

Após seu isolamento em uma instituição pediátrica em 1992 em Portugal, o clone pediátrico epidêmico já foi reportado na Polônia, Estados Unidos, Argentina, e Colômbia (Gomes *et al.*, 2001; Roberts *et al.*, 1998; Sa-Leao *et al.*, 1999). No Brasil, este clone já foi documentado como colonizante

na cidade do Rio de Janeiro (Melo *et al.*, 2004) e em Recife (de Miranda *et al.*, 2007).

O clone epidêmico brasileiro (CEB) foi descrito inicialmente em 1993 (Sader *et al.*, 1994), em um estudo realizado na cidade de São Paulo, e encontra-se amplamente disseminado por várias regiões do mundo, incluindo países da América Latina (Argentina, Brasil, Chile, e Uruguai) e Europa (República Tcheca e Portugal) (Gomes *et al.*, 2001; Aires de *et al.*, 2001). No Brasil, este clone de MRSA pôde ser identificado em diferentes hospitais, da região norte até o sul do país, frequentemente associado a surtos epidêmicos (Oliveira *et al.*, 2001; Teixeira *et al.*, 1995).

Estudos realizados com isolados de MRSA recuperados em hospitais na década passada demonstraram uma predominância do clone epidêmico brasileiro dentre as amostras de MRSA avaliadas. Um dos primeiros relatos descrevendo a emergência do CEB já demonstrava a alta frequência do mesmo dentre os isolados de MRSA de cinco cidades brasileiras: São Paulo, Rio de Janeiro, Niterói, Porto Alegre e Manaus (Teixeira *et al.*, 1995). Neste estudo, o CEB pôde ser identificado em 77% de todas as amostras de MRSA isoladas de vários sítios de infecção, coletadas entre os anos de 1992 a 1994.

Esta predominância no Brasil foi também demonstrada por um estudo conduzido com amostras de MRSA coletadas entre 1995 e 1997, provenientes de 19 cidades brasileiras (Oliveira *et al.*, 2001). Dentre os 83 isolados selecionados para tipagem molecular, a maioria (80,3%) apresentou padrão idêntico ao clone brasileiro de MRSA. Na cidade de São Paulo, poucos estudos foram conduzidos após 1993, para verificar se este clone ainda persiste em hospitais desta localidade. Aires de Souza, em 2001, publicou um estudo

envolvendo seis hospitais no Estado de São Paulo, dos quais foram coletados 162 isolados de MRSA durante o período de 1996 a 1998, e verificou que 97% deles eram relacionados ao CEB (Aires de *et al.*, 2001).

Após alguns anos, um estudo conduzido no complexo do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo identificou quatro padrões de PFGE dentre 151 isolados de MRSA obtidos de hemoculturas no período de 2002 a 2003. Foi possível observar, além de uma linhagem predominante relacionada ao CEB (SCC*mec* tipo III), um perfil distinto contendo SCC*mec* tipo IV que se destacou em um número expressivo, sugerindo uma linhagem emergente de MRSA (Trindade *et al.*, 2005; de Trindade, 2005). Infelizmente o padrão de bandas desta linhagem não foi comparada com os clones disseminados em outras localidades. Ainda assim, o caráter intra-hospitalar destas amostras e a ausência da produção de PVL presente na maioria dos clones com SCC*mec* tipo IV) sugerem que sejam relacionadas ao clone pediátrico (Trindade, 2005; Vidal, 2007).

Verificou-se em outro estudo brasileiro cinco casos de MRSA com comprovada origem comunitária, portando SCC*mec* tipo IV, na região sul do país (Ribeiro *et al.*, 2005). Os isolados, quando comparados pelo método de PFGE, apresentaram similaridade genética a uma linhagem identificada como comunitária na Austrália (*Oceania Southwest Pacific Clone - OSPC*).

No Hospital São Paulo, pertencente à UNIFESP, durante os períodos de 1991 a 1992 e de 1995 a 1996, foi observado que 86% dos isolados de MRSA coletados de hemoculturas de pacientes hospitalizados pertenciam ao clone epidêmico brasileiro (Conterno, 1999). Entretanto, em 2005, um estudo que padronizou diferentes protocolos de PFGE e analisou cinco isolados clínicos de

MRSA coletados de hemoculturas no período de 2000 a 2004 observou diferentes padrões de PFGE (Monteiro, 2005). Nenhuma das cinco amostras eram idênticas entre si e além disso, todas eram distintas do CEB tanto pelos critérios padronizados por Pfaller e colaboradores (1992), quanto pelos critérios de Tenover (Tenover *et al.*, 1995).

Trabalhos publicados a respeito da clonalidade de *S. aureus* são frequentemente complementados pela técnica denominada *multilocus sequence typing* (MLST). A técnica baseia-se na análise de sequências de sete genes conservados (*housekeeping genes*) do microrganismo, no qual diferentes sequências correspondem a diferentes alelos de cada gene e a um determinado tipo de sequência denominado ST (*sequence type*). Isolados com os sete alelos semelhantes são relacionados a um mesmo complexo clonal (CC), sendo que, dentre a maior parte dos MRSA circulantes, destacam-se cinco linhagens: CC8, CC5, CC30, CC45, e CC22 (Enright *et al.*, 2000; Enright *et al.*, 2002). Os resultados de MLST são inseridos em uma base de dados digital no endereço <http://www.mlst.net>, o que permite comparações entre sequências de *S. aureus* descritas em diferentes partes do mundo. A respeito dos clones internacionais, foram classificados pelo MLST como: ST239 (CEB), ST5 (clones pediátrico e Nova Iorque/Japão) e ST247 (Ibérico).

A caracterização dos elementos genéticos denominados SCC*mec* tipos I a VIII associada a tipagem molecular por PFGE e mais recentemente por MLST tem possibilitado uma análise mais acurada da disseminação global desses microrganismos que carregam o gene *mecA* tanto a nível comunitário quanto hospitalar (Hiramatsu *et al.*, 2001).

### 3. OBJETIVOS

Geral:

- Caracterização fenotípica e genotípica de *S. aureus* resistentes a oxacilina (MRSA), coletados de hemoculturas provenientes de diversos centros participantes do projeto SCOPE - Brasil, no período de Junho de 2007 a Julho de 2009.

Específicos:

- Avaliar a distribuição dos tipos de SCCmec das diferentes instituições participantes por meio da técnica de PCR multiplex;
- Detectar a possível presença do gene *lukF* codificador da toxina PVL (Panton-Valentine leukocidin);
- Determinar as concentrações inibitórias mínimas à oxacilina e vancomicina;
- Avaliar a similaridade genética das amostras utilizando as técnicas de PFGE e MLST.



## 4. METODOLOGIA

### 4.1. Desenho do estudo

O Projeto SCOPE Brasileiro é uma extensão de um estudo realizado pela *Virginia Commonwealth University*, nos Estados Unidos, denominado de SCOPE coordenado pelo Dr. Richard P. Wenzel e Dr. Michael B. Edmond, que mostraram dados epidemiológicos sobre mais de 24.000 infecções da corrente sanguínea em 49 hospitais norte-americanos durante um período de sete anos (Wisplinghoff *et al.*, 2004).

As ICS hospitalares foram definidas pelo isolamento de microrganismos patogênicos de uma ou mais amostras de hemoculturas positivas em pelo menos 48 horas de admissão do paciente. Isolados bacterianos potencialmente contaminantes de pele (ex.: difteróides, *Propionibacterium* spp., *Bacillus* spp., *Staphylococcus* coagulase negativo ou *Micrococcus* spp.), coletados de pacientes em utilização de cateter venoso central e prescrição de terapia antimicrobiana para esta infecção, e exibindo ao menos uma das síndromes da resposta inflamatória sistêmica (SIRS), foram incluídos.

As hemoculturas foram processadas pelos hospitais participantes do estudo. Somente a primeira hemocultura (com um ou mais microrganismos) de cada paciente foi considerada. A identificação dos isolados das hemoculturas assim como os testes de sensibilidade foram realizados pelos laboratórios afiliados aos centros hospitalares brasileiros incluídos no estudo. No total, seis laboratórios utilizaram método automatizado para identificação e teste de sensibilidade aos antimicrobianos, desses três utilizaram Vitek II (BioMérieux, North Caroline, USA) e três utilizaram o sistema BD Phoenix (Becton Dickinson and Company, Maryland, USA). As amostras dos nove centros que não

possuíam método automatizado foram re-identificadas e testadas quanto à sensibilidade aos antimicrobianos pelo LEMC, utilizando o sistema BD Phoenix (Becton Dickinson and Company, Maryland, USA).

O Programa SCOPE Brasileiro incluiu o envio de dados epidemiológicos dos pacientes acometidos com infecções de corrente sanguínea, sendo facultativo o envio das amostras bacterianas pelos centros médicos participantes para o LEMC (Laboratório Especial de Microbiologia Clínica - Universidade Federal de São Paulo) que é o centro coordenador deste estudo no Brasil.

Esses isolados foram enviados mensalmente ao LEMC, em meio de transporte Amies com carvão ativado (Copan, Brescia, Itália). No LEMC, todas as amostras foram semeadas em placas de ágar sangue ou MacConkey e em seguida foram armazenadas em caldo tríptico de soja (TSB - Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) com glicerol 15% e estocadas a -20°C. Os laboratórios dos centros participantes utilizaram metodologia para teste de sensibilidade aos antimicrobianos consistentes com os critérios adotados pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI).

Trata-se de um estudo de prevalência no período conduzido de Junho de 2007 a Julho de 2009. Foram selecionadas todas as amostras de *S. aureus* provenientes de hemoculturas de pacientes admitidos em hospitais que fazem parte do Projeto SCOPE – Brasil.

Os dados clínicos e microbiológicos foram obtidos de forma prospectiva pelas Comissões de Controle de Infecção Hospitalar dos centros brasileiros selecionados que submeteram as informações para o centro coordenador do projeto (LEMC) com envio de cada isolado microbiológico junto com a ficha do

paciente (vide anexo), que foram armazenados e selecionados para o estudo no banco de microrganismos do LEMC.

#### 4.2. Amostras Bacterianas

Foram selecionadas para o estudo todas as amostras clínicas de MRSA (n=62) dos centros participantes do Projeto SCOPE – Brasil, isoladas entre Junho de 2007 a Julho de 2009, para isso nos baseamos no resultado da oxacilina enviada na ficha clínica do paciente.

Os centros foram distribuídos da seguinte maneira: 1 centro no Norte, 4 centros no Nordeste, 2 centros no Sul, 7 centros no Sudeste e 2 centros no Centro-Oeste (figura 1 e tabela 2). O centro 14 optou por enviar somente os dados epidemiológicos, os centros 8, 11 e 15 não isolaram *S. aureus* e o centro 16 iniciou sua participação no estudo recentemente não sendo possível incluir as amostras neste estudo.



**Figura 1.** Localização geográfica dos dezesseis centros participantes do Projeto SCOPE – Brasil, 2007-2009.

**Tabela 2.** Centros médicos participantes do Projeto SCOPE Brasil (Junho de 2007 a Julho de 2009).

Centro Médico	Início da Coleta de Dados	Cidade/Estado
1 - Hospital São Paulo	Junho de 2007	São Paulo/SP
2 - Hospital do Rim e Hipertensão	Junho de 2007	São Paulo/SP
3 - Hospital de Diadema	Junho de 2007	São Paulo/SP
4 - Instituto de Oncologia Pediátrica (IOP/GRAAC)	Junho de 2007	São Paulo/SP
5 - Hospital Nove de Julho	Junho de 2007	São Paulo/SP
6 - Hospital Israelita Albert Einstein	Junho de 2007	São Paulo/SP
7 - Hospital Santa Casa de Porto Alegre	Outubro de 2007	Porto Alegre/RS
8 - Hospital do Coração de Natal	Janeiro de 2008	Natal/RN
9 - Hospital Universitário Walter Cantídio	Janeiro de 2008	Fortaleza/CE
10 - Hospital Santa Casa do Pará	Dezembro de 2007	Belém/PA
11 - Hospital da Unimed de Natal	Fevereiro de 2008	Natal/RN
12 - Hospital das Clínicas de Goiânia	Janeiro de 2008	Goiânia/GO
13 - Hospital de Base de Brasília	Janeiro de 2008	Brasília/DF
14 - Hospital Conceição de Porto Alegre	Maio de 2008	Porto Alegre/RS
15 - Hospital Espanhol de Salvador	Julho de 2008	Salvador/BA
16 - Hospital Estadual Universitário do Triângulo Mineiro	Janeiro de 2009	Uberaba/MG

### 4.3. Testes Fenotípicos e Genotípicos

#### 4.3.1. Reação em cadeia da polimerase (PCR) para a detecção do gene

##### *nuc*

Todas as cepas de MRSA selecionadas para o presente estudo foram submetidas à confirmação da identificação da espécie, utilizando a detecção do gene *nuc* pela técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase). Os primers foram desenhados em nosso laboratório, a partir da cepa MRSA 252 (seqüência do DNA obtida pelo número de acesso GenBank NC\_002952) e posteriormente encaminhados para síntese (IDT - Integrated DNA Technologies Inc., Coralville, EUA).

5` GCCACGTCCATATTTATCAG 3`nuc - R1

5` TATGGTCCTGAAGCAAGTG 3`nuc - F1

#### **4.3.1.1. Extração do DNA genômico por fervura conforme protocolo desenvolvido por Zhang**

Para a extração do DNA genômico foi utilizado a extração por fervura, segundo Zhang e colaboradores (Zhang *et al.*, 2005). Após crescimento bacteriano em placa de ágar Columbia contendo sangue de carneiro a 5%, uma a cinco colônias bacterianas foram suspensas em 50 µL de água destilada estéril e aquecidas a 99°C durante 10 minutos. Depois da centrifugação a 13000 rpm durante 3 minutos, foram utilizados 0,5µL do sobrenadante para a reação de PCR de volume final de 10 µL.

#### **4.3.1.2. Reação de amplificação**

A reação de amplificação foi realizada utilizando-se 5µL de GoTaq Green Master Mix (Promega, Madison, WI, EUA), 1µL de primers, 3,5 µL de água estéril deionizada e 0,5µL do sobrenadante da suspensão bacteriana. A reação de amplificação foi realizada no termociclador MasterCycler gradient (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), utilizando o seguinte programa: 5 min a 95°C, seguido por 35 ciclos de 15s a 95°C, 15s a 53°C e 1 min a 72°C. O programa termina com uma extensão adicional de 10 min a 72°C. Os tubos foram mantidos a 4°C até o momento da eletroforese. Como controle positivo foi utilizado a cepa NCTC 10442, e como controle negativo água destilada deionizada estéril.

Após a reação de amplificação, os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% (contendo brometo de etídio) em tampão TBE 0,5X por 25 minutos a 120V. Como padrão de peso molecular foi utilizado um marcador de peso molecular de 100pb (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA). O DNA foi posteriormente visualizado e fotografado sob transiluminação ultravioleta.

#### **4.3.2. PCR multiplex para a determinação do tipo de SCCmec conforme protocolo desenvolvido por Zhang**

A determinação do tipo de SCCmec e do gene *mecA* foi realizada utilizando-se o método de PCR mutiplex, conforme o protocolo desenvolvido por Zhang e colaboradores (Zhang *et al.*, 2005). Este protocolo permite detectar os tipos I a V de SCCmec, além de quatro subtipos de SCCmec IV (IVa, IVb, IVc e IVd).

São utilizados 9 *loci*, selecionados com base nas sequências do elemento *mec* descritas previamente, disponível no banco de dados GenBank (*National Center for Biotechnology Information*; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index>) (Ito *et al.*, 2001; Ito *et al.*, 1999). As respectivas regiões alvo, cepas e números de acesso do GenBank no qual este protocolo foi delineado estão na tabela 3.

**Tabela 3.** Regiões alvo, cepas controles e número de acesso do GenBank.

<b>SCC<i>mec</i></b>	<b>Região</b>	<b>Cepa</b>	<b>Número de acesso GenBank</b>
tipo I	ORF E008	NCTC 10442	AB033763
tipo II	kdpE	N315	D86934
tipo III	ORF CZ049	85/2082	AB37671
tipo IVa	ORF CQ002	CA05	AB063172
tipo IVb	ORF CM001	8/6-3P	AB063173
tipo IVc	ORF CR002	MR108	AB096217
tipo IVd	ORF CG001	JCSC4469	AB0967677
tipo V	ORF V011	JCSC3624	AB12121

As sequências dos primers utilizados nas reações de PCR multiplex para a determinação dos tipos de SCC*mec* estão descritos na tabela 4.

**Tabela 4.** Sequência dos primers utilizados para reação em cadeia da polimerase (PCR) multiplex para determinação dos tipos de SCC*mec*.

<i>Primer</i> <sup>(1)</sup>	Sequência de oligonucleotídeos (5´- 3´)	Tamanho amplicon (pb)	Especificidade
Tipo I–F Tipo I–R	GCTTTAAAGAGTGTCGTTACAGG GTTCTCTCATAGTATGACGTCC	613	SCC <i>mec</i> I
Tipo II–F Tipo II–R	CGTTGAAGATGATGAAGCG CGAAATCAATGGTTAATGGACC	398	SCC <i>mec</i> II
Tipo III–F Tipo III–R	CCATATTGTGTACGATGCG CCTTAGTTGTCGTAACAGATCG	280	SCC <i>mec</i> III
Tipo IVa–F Tipo IVa–R	GCCTTATTCGAAGAAACCG CTACTCTTCTGAAAAGCGTCG	776	SCC <i>mec</i> IVa
Tipo IVb–F Tipo IVb–R	TCTGGAATTACTTCAGCTGC AAACAATATTGCTCTCCCTC	493	SCC <i>mec</i> IVb
Tipo IVc–F Tipo IVc–R	ACAATATTTGTATTATCGGAGAGC TTGGTATGAGGTATTGCTGG	200	SCC <i>mec</i> IVc
Tipo IVd–F Tipo IVd–R	CTCAAATAACGGACCCCAATACA TGCTCCAGTAATTGCTAAAG	881	SCC <i>mec</i> IVd
Tipo V–F Tipo V–R	GAACATTGTTACTTAAATGAGCG TGAAAGTTGTACCCTTGACACC	325	SCC <i>mec</i> V
MecA147-F MecA147-R	GTGAAGATATACCAAGTGATT ATGCGCTATAGATTGAAAGGAT	147	<i>mec</i> A

<sup>1</sup> Adaptado de Zhang e colaboradores, 2005.

Para a extração do DNA genômico foi utilizado a extração por fervura descrito no item 4.3.1.1, porém foram utilizados 2 µL do sobrenadante para a reação de PCR de volume final de 25 µL.

Para a reação de amplificação foi utilizada a seguinte mistura de reação: 12,5 µL de Master Mix para multiplex (Qiagen, Valencia, CA, EUA), um total de 7,7 µL de primers em concentrações de acordo com protocolo padronizado, 2,8 µL de água estéril deionizada e 2 µL do sobrenadante da suspensão



---

---

bacteriana. A reação de amplificação foi realizada no termociclador MasterCycler gradient (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), utilizando o seguinte programa: 5 min a 94°C, seguido por 10 ciclos de 45s a 94°C, 45s a 65°C e 1,5 min a 72°C e outros 25 ciclos de 45s a 94°C, 45s a 55°C e 1,5 min a 72°C. O programa termina com uma extensão adicional de 10 min a 72°C. Os tubos foram mantidos a 4°C até o momento da eletroforese.

Após a reação de amplificação, os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% (contendo brometo de etídio) em tampão TBE 0,5X por 40 minutos a 120V. Como padrão de peso molecular foi utilizado um marcador de peso molecular de 100bp. O DNA foi posteriormente visualizado e fotografado sob transiluminação ultravioleta.

Como controles positivos para os diferentes tipos de *SCCmec* foram utilizadas as seguintes cepas de MRSA: NCTC 10422 (*SCCmec* tipo I), N315 (*SCCmec* tipo II), 85/2082 (*SCCmec* tipo III), JCSC 1968 / CA05 (*SCCmec* tipo IVa), JCSC1978 / 8/6-3P (*SCCmec* tipo IVb), MR 108 (*SCCmec* tipo IVc), JCSC 4469 (*SCCmec* tipo IVd) e JCSC 3624 / WIS [WBG8318] (*SCCmec* tipo V) (Ito *et al.*, 2001; Ito *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2002; Okuma *et al.*, 2002). Todos os controles foram gentilmente cedidos pelo Prof<sup>o</sup>. Keiichi Hiramatsu e Prof<sup>a</sup>. Teruyo Ito, do Departamento de Bacteriologia, Universidade de Juntendo - Tóquio, Japão, e Prof<sup>o</sup>. Robert S. Daum, Universidade de Chicago, Departamento de Pediatria, Chicago, Illinois. Como controle negativo foi utilizado água destilada deionizada estéril.

#### **4.3.3. PCR mutiplex para a determinação do tipo de SCCmec conforme protocolo desenvolvido por Milheiriço**

Trata-se de um protocolo publicado em 2007 (Milheirico *et al.*, 2007) como atualização da publicação feita em 2002 por Oliveira e colaboradores, no qual é possível identificar seis tipos de SCCmec (tipo I ao VI) além de seis subtipos do SCCmec tipo VI (a, b, c, d, E, g e h). Todas as amostras de MRSA que não produziram nenhuma banda visível e também as que apresentaram bandas múltiplas (amplificaram para mais de um tipo de SCCmec) SCCmec tipo I e III pelo protocolo de Zhang e colaboradores (2005) foram submetidas a este protocolo.

Este protocolo utilizou um total de 10 *loci*, selecionados com base nas sequências do elemento *mec*. Neste protocolo atualizado foram acrescentados oito novos primers que não constavam no protocolo de 2002 com o intuito de detectar o *ccrB* alotipo 2 (específico para tipos II e IV), *ccrC* e a região J1 do tipo V (específicos para tipo V), e a região J1 do SCCmec III. As respectivas sequências de primers utilizadas para identificar cada tipo de SCCmec deste protocolos estão descritos na tabela 5.

**Tabela 5.** Sequência dos primers utilizados para PCR multiplex para a determinação dos tipos de *SCCmec*, segundo Milheiriço e colaboradores (2007).

Primer		Sequência de oligonucleotídeos	Tamanho do amplicon (pb)	Especificidade
CIF2 F2	CIF2 R2	TTCGAGTTGCTGATGAAGAAGG ATTTACCACAAGGACTACCAGC	495	<i>SCCmec</i> tipo I
<i>ccrC</i> F2	<i>ccrC</i> R2	GTA CTCTGTTACAATGTTTGG ATAATGGCTTCATGCTTACC	449	<i>SCCmec</i> tipo V
RIF5 F10	RIF5 R13	TTCTTAAGTACACGCTGAATCG GTCACAGTAATCCATCAATGC	414	<i>SCCmec</i> tipo III
<i>SCCmec</i> V J1 F	<i>SCCmec</i> V J1 R	TTCTCCATTCTTGTTTCATCC AGAGACTACTGACTTAAGTGG	377	<i>SCCmec</i> tipo V
<i>dcs</i> F2	<i>dcs</i> R1	CATCCTATGATAGCTTGGTC CTAAATCATAGCCATGACCG	342	<i>SCCmec</i> tipos I, II e IV
<i>ccrB2</i> F2	<i>ccrB2</i> R2	AGTTTCTCAGAATTCGAACG CCGATATAGAAWGGTTAGC	311	<i>SCCmec</i> tipos II e IV
kdp F1	kdp R1	AATCATCTGCCATTGGTGATGC CGAATGAAGTAAAAGAAAGTGG	284	<i>SCCmec</i> tipo II
<i>SCCmec</i> III J1 F	<i>SCCmec</i> III J1 R	CATTGTGAAACACAGTACG GTTATTGAGACTCCTAAAGC	243	<i>SCCmec</i> tipo III, J1
mecl P2	mecl P3	ATCAAGACTTGCATTCAGGC GCGGTTTCAATTCACCTTGTC	209	<i>SCCmec</i> tipos II e III
<i>mecA</i> P4	<i>mecA</i> P7	TCCAGATTACAACCTTCACCAGG CCACTTCATATCTTGTAACG	162	<i>mecA</i> (controle interno)

Adaptado de Milheiriço e colaboradores (2007).

A extração do DNA genômico foi realizada segundo protocolo de van Soolingen e colaboradores (1991). Para a PCR foi utilizada a seguinte reação:

---

---

12,5 µL de GoTaq Green Master Mix (Promega, Madison, WI, EUA), 200 nM dos primers kdp F1, kdp R1, 400 nM dos primers CIF2 F2, CIF2 R2, SCCmec III J1F, SCCmec III J1R, SCCmec V J1 F, SCCmec V J1 F, RIF5 F10, RIF5 F13, 800 nM dos primers mecl P2, mecl P3, DCS F2, DCS R1, MECA P4, MECA P7, *ccrB2* F2, *ccrB2* R2, *ccrC* F2, *ccrC* R2 e 5 ng de DNA. A reação de amplificação foi realizada no termociclador MasterCycler gradient (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), utilizando o seguinte programa: 4 min a 94°C, seguido por 30 ciclos de 30s a 94°C, 30s a 53°C e 1 min a 72°C. O programa termina com uma extensão adicional de 4 min a 72°C. Os tubos foram mantidos a 20°C até o momento da eletroforese.

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose como demonstrado no item 4.3.2.

#### **4.3.4. PCR para a detecção do gene *lukF*, codificador da PVL (Panton-Valentine leukocidin)**

Todas as amostras de MRSA foram submetidas a testes para detecção do gene responsável pela síntese da PVL segundo protocolo de Ribeiro e colaboradores (2005). Os primers foram desenhados com base na sequência do gene *lukF*, disponível no GenBank, número de acesso AB006796. O produto da amplificação foi de 406 pb.

Para a extração do DNA genômico foi utilizado a extração por fervura, segundo protocolo de Zhang e colaboradores (Zhang *et al.*, 2005) descrito no item 4.3.1.1.

Para a reação de amplificação foi utilizada 5 µL de GoTaq Green Master Mix (Promega, Madison, WI, EUA), um total de 1 µL de primers, 3,5 µL de água

estéril deionizada e 0,5µL do sobrenadante da suspensão bacteriana. A reação de amplificação foi realizada no termociclador MasterCycler gradient (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), utilizando o seguinte programa: 5 min a 95°C, seguido por 35 ciclos de 20s a 95°C, 20s a 53°C e 1 min a 72°C. O programa termina com uma extensão adicional de 10 min a 72°C. Os tubos foram mantidos a 4°C até o momento da eletroforese. Após a reação de amplificação, os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% (contendo brometo de etídio) em tampão TBE 0,5X por 25 minutos a 120V. Como padrão de peso molecular foi utilizado um marcador de peso molecular de 100bp (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA). O DNA foi posteriormente visualizado e fotografado sob transiluminação ultravioleta.

Como controle positivo foi utilizada a cepa de MRSA MR 108 (SCC*mec* tipo IVc, portadora do gene *lukF*), e como controles negativos a cepa N315 (SCC*mec* tipo II) e água destilada deionizada estéril.

#### **4.3.5. Etest®**

Todas as amostras de MRSA foram testadas no LEMC pela técnica de Etest® (AB Biodisk, Solna, Suécia) para oxacilina e vancomicina. As amostras foram retiradas da coleção de microrganismos do LEMC e cultivadas em ágar-sangue (Columbia Blood Agar, DIFCO, enriquecido com 5% de sangue de carneiro desfibrinado) e incubadas a 35°C por 24 horas. Após o crescimento inicial os isolados foram subcultivados e o inóculo preparado em caldo Mueller-Hinton (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) para obtenção de uma concentração de  $1,5 \times 10^8$  UFC/ml e então inoculados em ágar Mueller-Hinton (*Clinical and Laboratories Standard Institute - CLSI, 2009*). Sobre as placas já inoculadas

foram depositadas tiras de Etest<sup>®</sup> contendo diferentes concentrações de oxacilina e vancomicina. As placas foram incubadas em estufa à 35°C em aerobiose. A leitura da CIM foi realizada segundo instruções do fabricante. O controle de qualidade foi realizado com a cepa ATCC (*American Type Culture Collection*) de *S. aureus* 29213. Os resultados foram interpretados segundo o documento do CLSI 2009.

#### **4.3.6. Perfil de Sensibilidade a vancomicina pela metodologia de Diluição em Ágar**

O teste de diluição em ágar foi realizado em todas as amostras de MRSA encaminhadas pelos centros participantes ao LEMC. Após o crescimento bacteriano em placas de ágar sangue por 24 horas, uma a três colônias isoladas de *S. aureus* foram transferidas para tubos contendo 4 mL de salina (NaCl - Sigma, St. Louis, MO). A suspensão bacteriana foi homogeneizada e a turvação medida em turbidímetro digital (Baxter<sup>®</sup>, Sacramento, EUA), para a obtenção de uma concentração bacteriana em torno de  $1,5 \times 10^8$  unidades formadoras de colônias (UFC)/mL correspondente a 0,5 da escala de McFarland (CLSI, 2009).

As CIMs foram determinadas pela metodologia de diluição em ágar seguindo as recomendações do CLSI (CLSI, 2009) para o seguinte antimicrobiano e diluições: vancomicina (0,25 - 64 µg/mL). Esta metodologia foi realizada através da incorporação de concentrações seriadas e logarítmicas do respectivo antimicrobiano em placas de Petri individuais contendo ágar Müller-Hinton (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra). Cada placa representava uma única

concentração do antimicrobiano. Foram testadas diferentes concentrações, de acordo com o antimicrobiano testado.

Após preparo e diluição do inóculo, as amostras bacterianas foram inoculadas simultaneamente sobre a superfície do ágar utilizando o multi-inoculador, o qual dispensa de 1 a 3  $\mu\text{L}$  contendo aproximadamente o inóculo final de  $1 \times 10^4$  UFC/mL. As placas inoculadas foram incubadas por 18-24 horas, a 37°C. Após este período, a CIM foi determinada como a menor concentração de antimicrobiano capaz de inibir o crescimento bacteriano (CLSI, 2009).

Como controle de qualidade dos testes de sensibilidade foi utilizada a cepa ATCC de *S. aureus* 29213.

#### **4.3.7. Análise do polimorfismo do DNA cromossômico por PFGE**

A análise do DNA cromossômico dos isolados de MRSA foi realizada pela técnica de PFGE, após digestão do cromossomo bacteriano com a enzima de restrição *Sma*I. Esta técnica é uma variação da eletroforese convencional, onde a corrente elétrica varia alternadamente de direção e o uso de enzimas de restrição com sítios de reconhecimento raro permite a digestão do cromossomo em fragmentos maiores. Esta técnica foi realizada segundo recente protocolo estabelecido nos Estados Unidos pelo CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*, Atlanta, Georgia), para tipagem molecular de *S. aureus* (McDougal *et al.* 2003).

Uma colônia do isolado teste foi inoculado em 5 ml de caldo BHI (*brain heart infusion*) e incubado a 35-37°C por 24 horas, com agitação vigorosa. As concentrações das suspensões celulares foram ajustadas com solução salina

até atingir uma leitura de turbidez de 1,1 a 1,3 de MacFarland. Uma alíquota de 200 µl da suspensão de células ajustadas foi transferida para um tubo de microcentrífuga de peso conhecido, centrifugado a 12.000 X g por aproximadamente 2 a 4 minutos e o sobrenadante cuidadosamente aspirado. Os tubos foram novamente pesados com a finalidade de se determinar o peso do centrifugado (células). O centrifugado foi resuspenso em 300 µL da solução tampão Tris-EDTA (Tris HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 1mM) e incubado a 37°C por 10 minutos. À esta suspensão celular foram adicionados 4 µL de solução convencional (L 7386/Sigma, St. Louis, Mo, EUA), ou 3 µL de solução recombinante (L 0761/Sigma) de lisostafina (1 mg/ml 20mM de acetato de sódio, pH 4,5), e 300 µL de gel de agarose 1,8% SeaKem Gold (FMC, Rockland, Maine, EUA) em solução tampão Tris-EDTA à 55°C. Estes pequenos blocos de gel, contendo DNA cromossômico, foram incubados por um período mínimo de quatro horas em solução EC (Tris 6 mM, pH 7,5; NaCl 1M; EDTA 0,01M; Brij-58 0,5%; Sarcosil 0,5%; Deoxicolato de sódio 0,2% e 0,5% de sódio lauroylsarcosina) à 37°C. A seguir, os blocos de gel foram lavados várias vezes em solução tampão Tris-EDTA e armazenados nesta solução a 4°C até serem submetidos à digestão enzimática e eletroforese.

Os plugs foram cortados em três partes iguais e armazenados em tampão de restrição 1x por 30 minutos. O tampão de restrição das amostras foi removido e o DNA das amostras de *S. aureus* foi digerido com 3 µl da enzima *Sma*I (Promega R6125, 10U/ µl) em 200 µl do tampão de restrição 1x, com incubação a 25°C por duas a três horas. A eletroforese foi realizada em gel de agarose a 1% no sistema CHEF-DRIII (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA). Os fragmentos de restrição resultantes foram colocados no aparelho de



---

---

eletroforese com corrente alternando de 5 a 40 segundos a 6 V/cm e temperatura de 14°C durante 21 horas em gel de agarose a 1%. Os géis foram corados com brometo de etídio (1,5 µg/mL) por 1 hora, descorados em água bidestilada por mais 45 minutos, e fotografados sob luz ultravioleta com filme FUJI FTI-500 e capturados com o programa LISCAP Image Capture Software com o aparelho ImageMaster® (Amersham Pharmacia Biotech AB, CA, EUA). As fotos foram digitalizadas e salvas como arquivo TIF para análise posterior.

Como padrão de peso molecular, foi utilizado o Lambda DNA ladder (New England Biolabs, EUA) na primeira e última coluna de cada gel. Além do peso molecular, foi incluída a cepa de referência *S. aureus* NCTC 8325, posicionada a cada cinco ou seis amostras clínicas, em todos os géis de PFGE. A amostra NCTC 8325 foi gentilmente cedida pela Prof. Hermínia de Lencastre, Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Oeiras, Portugal (número de acesso GenBank CP000253).

Amostras de MRSA representantes de clones mundiais ou locais foram também incluídas nos experimentos: NCTC 10422 (*SCCmec* tipo I), N315 (*SCCmec* tipo II), 85/2082 (*SCCmec* tipo III), JCSC 1968 / CA05 (*SCCmec* tipo IVa), JCSC1978 / 8/6-3P (*SCCmec* tipo IVb), MR 108 (*SCCmec* tipo IVc), JCSC 4469 (*SCCmec* tipo IVd), JCSC 3624 / WIS [WBG8318] (*SCCmec* tipo V), A1721/HU25 (Clone Brasileiro Epidêmico, *SCCmec* tipo III), WB72 (USA 300, *SCCmec* tipo IV), MW2 (USA 400, *SCCmec* tipo IV), WB49 (Oceania South Pacific Clone, *SCCmec* IV), HAR24 (EMRSA - 15, *SCCmec* tipo IV), HAR24 (EMRSA - 16, *SCCmec* tipo II), BK2464 (New York - Japan, *SCCmec* II), HDE288 (Clone Pediátrico / USA800, *SCCmec* IVa). Todos os controles foram gentilmente cedidos pelo Prof<sup>o</sup>. Keiichi Hiramatsu e Prof<sup>a</sup>. Teruyo Ito, do

Departamento de Bacteriologia, Universidade de Juntendo - Tóquio, Japão; Prof<sup>o</sup>. Robert S. Daum, Universidade de Chicago, Departamento de Pediatria, Chicago, Illinois; Prof<sup>a</sup>. Hermínia de Lencastre, Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Oeiras, Portuga; Prof<sup>a</sup>. Agnes Figueiredo, Instituto de Microbiologia Prof<sup>o</sup>. Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. A tabela 6 sumariza todas as cepas controle utilizadas no presente estudo.

**Tabela 6.** Cepas de *S. aureus* utilizadas como controles no presente estudo.

Número da Amostra	Clone	SCCmec
NCTC8325	-	-
NCTC10442	-	SCCmec tipo I
N315	-	SCCmec tipo II
NCTC85/2082	-	SCCmec tipo III
JCSC1968	-	SCCmec tipo IVa
JCSC1978	-	SCCmec tipo IVb
MR108	-	SCCmec tipo IVc
JCSC4469	-	SCCmec tipo IVd
WIS	WBG8318	SCCmec tipo V
A1721	Clone Epidêmico Brasileiro	SCCmec tipo III
WB72	USA 300	SCCmec tipo IV
MW2	USA 400	SCCmec tipo IV
WB49	Oceania South Pacific Clone	SCCmec tipo IV
HAR22	EMRSA - 15	SCCmec tipo IV
HAR24	EMRSA - 16	SCCmec tipo II
BK2464	New York - Japan - USA 100	SCCmec tipo II
HU25	Clone Epidêmico Brasileiro	SCCmec tipo III
HDE 288	Clone Pediátrico - USA800	SCCmec tipo VI

Os géis foram incluídos e processados pelo programa BioNumerics versão 5.0 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium) como imagens preto e branco

invertidas de 8 bits. Para cada imagem, é realizada análise espectral para determinar o tamanho do disco a ser utilizado na extração do plano de fundo da imagem, pela técnica de rolamento de disco.

As cepas de referência *S. aureus* NCTC 8325 de cada gel foram normalizadas entre si e com a cepa de referência universal NCTC 8325. Após digestão com a enzima *Sma*I, esta cepa produz 13 bandas visivelmente definidas, distribuídas entre 674 kb e 36 kb. A cepa NCTC 8325 é considerada padrão internacional de referência para normalização dos fragmentos cromossômicos de amostras de *S. aureus* submetidas à PFGE. O processo de normalização é etapa essencial e obrigatória para corrigir as distorções intra e inter géis que podem ocorrer na técnica de PFGE. Bandas de amostras clínicas situadas acima da maior banda da NCTC (674 kb) não são incluídas para análise, pois estas bandas não serão normalizadas. Da mesma maneira, bandas abaixo de 36 kb são excluídas da análise pela menor resolução destas bandas de baixo peso molecular e impossibilidade de normalização das mesmas (Murchan *et al.*, 2003).

Em todas as imagens, a definição de bandas foi realizada automaticamente pelo programa e depois conferida individualmente, por comparação visual. O coeficiente de similaridade utilizado foi o coeficiente de Dice baseado na presença e posição de bandas. O dendrograma foi construído utilizando o algoritmo de análise filogenética UPGMA (Unweighted Pair-Groups Method using arithmetic averages). Este algoritmo realiza as análises através de agrupamentos por médias não ponderadas. Os valores de otimização e tolerância utilizados para o conjunto de isolados foram de 0,8 e 1,8%,

respectivamente. Um coeficiente de similaridade acima de 80% foi selecionado para definir cada cluster de isolados (McDougal *et al.*, 2003).

#### **4.3.8. Tipagem molecular por *Multilocus Sequence Typing* – MLST**

A tipagem molecular foi feita em oito isolados de MRSA com alguns dos tipos de SCC*mec* encontrados.

Tipagem molecular baseada nas sequências de sete *housekeeping* genes foram executados de acordo com procedimentos previamente descritos (Enright *et al.*, 2000). Os *housekeeping* genes foram usados no esquema final de MLST (<http://www.mlst.net/>) e os fragmentos foram amplificados usando os primers mostrados na tabela 7.

Os primers foram desenhados usando as sequências de regiões altamente conservadas que flanqueiam as regiões mais variáveis desses genes.

**Tabela 7:** Primers utilizados para amplificação de fragmentos gênicos de *S. aureus*, através da PCR a fim de serem analisados pela técnica de MLST (Enright *et al.*, 2000)

Enzima/Gene	Primer	Sequência (5' – 3')	Tamanho do produto	nº do alelo/locus do MLST
Carbamato kinase ( <i>arcC</i> )	<i>arcC</i> -Up	TTGATTCACCAGCGCGTATTGTC	570	37
	<i>arcC</i> -Dn	AGGTATCTGCTTCAATCAGCG		
Shikimato desidrogenase ( <i>aroE</i> )	<i>aroE</i> -Up	ATCGGAAATCCTATTTACATTC	536	66
	<i>aroE</i> -Dn	GGTGTGTATTAATAACGATATC		
Glicerol kinase ( <i>glpF</i> )	<i>glpF</i> -Up	CTAGGAACTGCAATCTTAATCC	534	44
	<i>glpF</i> -Dn	TGGTAAAATCGCATGTCCAATTC		
Guanilato kinase ( <i>gmk</i> )	<i>gmk</i> -Up	ATCGTTTTATCGGGACCATC	488	35
	<i>gmk</i> -Dn	TCATTAAC TACAACGTAATCGTA		
Fosfato acetiltransferase ( <i>pta</i> )	<i>pta</i> -Up	GTAAAATCGTATTACCTGAAGG	575	44
	<i>pta</i> -Dn	GACCCTTTTGTGAAAAGCTTAA		
Triosefosfato isomerase ( <i>tpi</i> )	<i>tpi</i> -Up	TCGTTCAATTCTGAACGTCGTGAA	475	58
	<i>tpi</i> -Dn	TTTGCACCTTCTAACAATTGTAC		
Acetil coenzima A acetiltransferase ( <i>yqiL</i> )	<i>yqiL</i> -Up	CAGCATACAGGACACCTATTGGC	598	52
	<i>yqiL</i> i-Dn	CGTTGAGGAATCGATACTGGAAC		

#### 4.3.8.1. Extração do DNA genômico para a técnica de MLST

O DNA genômico foi realizado sobre 5 ml de cultura de bactérias crescidas durante a noite. As bactérias foram centrifugadas e ressuspensas em 400 µL de TE (tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8.0, contendo EDTA 5 mM) e submetidas a 80°C por 5 minutos. Adicionou-se 75 µL de SDS 10% e o material foi incubado a 37°C por 1 hora. Adicionou-se 15 µL de lisostafina, 2 µL de RNase A e 5 µL de proteinase K (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) para

concentração final de 20 e 200 µg/ml e 1 mg, respectivamente. O tubo foi agitado e a mistura resultante foi aquecida a 65°C por 15 min. Após esse período, acrescentou-se 100 mL de CTAB/NaCl, o tubo foi novamente agitado e a mistura resultante aquecida a 65°C por mais 15 min. O DNA extraído foi purificado por 2 extrações fenol/clorofórmio/isoamílico (24/24/1) precipitado com etanol e ressuspenso em 50 a 100 µl de Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) contendo EDTA 1 mM (TE).

O DNA extraído foi quantificado espectrofotometricamente no equipamento Termo Spectronic (Fisher Scientific Company, Pensilvânia, EUA), empregando-se os comprimentos de onda de 260nm e 280nm, e foi calculada a relação densidade óptica (DO) 260/280 (Sambrook *et al.*, 1989) neste mesmo equipamento.

#### **4.3.8.2. Reação de PCR para MLST**

As reações de PCR foram realizadas em volume de 50µl com 0,5µl do DNA genômico (aproximadamente 0,5 µg), 10 pmol de cada *primer*, 25 µl do tampão de reação (kit GoTaq polimerase - Perkin-Elmer Applied Biosystems; Foster Cyt, Califórnia).

A reação de PCR foi executada com desnaturação inicial de 5 minutos a 95°C, seguida por 35 ciclos de anelamento a 55°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto e desnaturação a 95°C por 1 minuto, seguido por uma etapa final da extensão de 72°C por 5 minutos.

#### **4.3.8.3. Reação de sequenciamento**

Os produtos amplificados foram purificados com auxílio do Qiaquick PCR Purification System (Qiagen) e os fragmentos ressuspensos em 50  $\mu$ L de TE.

As sequências de ambos os lados foram determinadas utilizando o kit ABI PRISM Big Dye Cycle Sequencing Ready Reaction (Perkin-Elmer, Applied Biosystems), utilizando-se os terminais fluorescentes de BigDye e os primers usados inicialmente na amplificação por PCR. Em um tubo de PCR acrescentou-se 75 mg (entre 2 a 10  $\mu$ L) de DNA amplificado por PCR, 2  $\mu$ L tampão de reação para sequenciamento, 5 mL do tampão de reação 5X, 1  $\mu$ L de primer senso ou antissenso (3,9 pmol/ mL) e água destilada e autoclavada em quantidade suficiente para 20  $\mu$ L. A mistura foi submetida a uma ciclagem de 94°C por 2 minutos seguida por 25 ciclos de : 96°C por 10 segundos; 50°C por 30 segundos e 60°C por 4 minutos. Após o término da reação para sequenciamento, os produtos foram transferidos para tubos de microcentrífuga de 1,5 mL e precipitados com 80 $\mu$ L de isopropanol 75% (temperatura ambiente), foram secos a 95°C por 30 segundos, ressuspensos com 20 $\mu$ L e aplicados em sequenciador ABI 3100 (Perkin-Elmer, Applied Biosystem).

#### **4.3.8.4. Caracterização do MLST**

As sequências resultantes da amplificação dos sete *housekeeping* genes de cada clone inserido na pesquisa, foram editadas pela análise dos cromatogramas obtidos no sequenciamento e comparadas com o aquelas na base de dados do site MLST de *S. aureus* (<http://saureus.mlst.net/>). Com base na sequência final foram definidos os alelos que em conjunto, definiram o genótipo da bactéria. Todas as sequências receberam um número para cada

gene de acordo com o perfil de mutações apresentado. Quando um alelo apresentou sequência diferente das já disponíveis na base de dados, este foi considerado um novo alelo e recebeu nova numeração. Ao final, cada amostra obteve um conjunto de 7 números, um para cada gene estudado, e este conjunto de números foi representado por outro número que se chama tipo de sequência (*Sequence Type* ou ST). Desta forma, os alelos em cada um dos sete *loci* definiram o perfil alélico correspondente, para cada isolado.

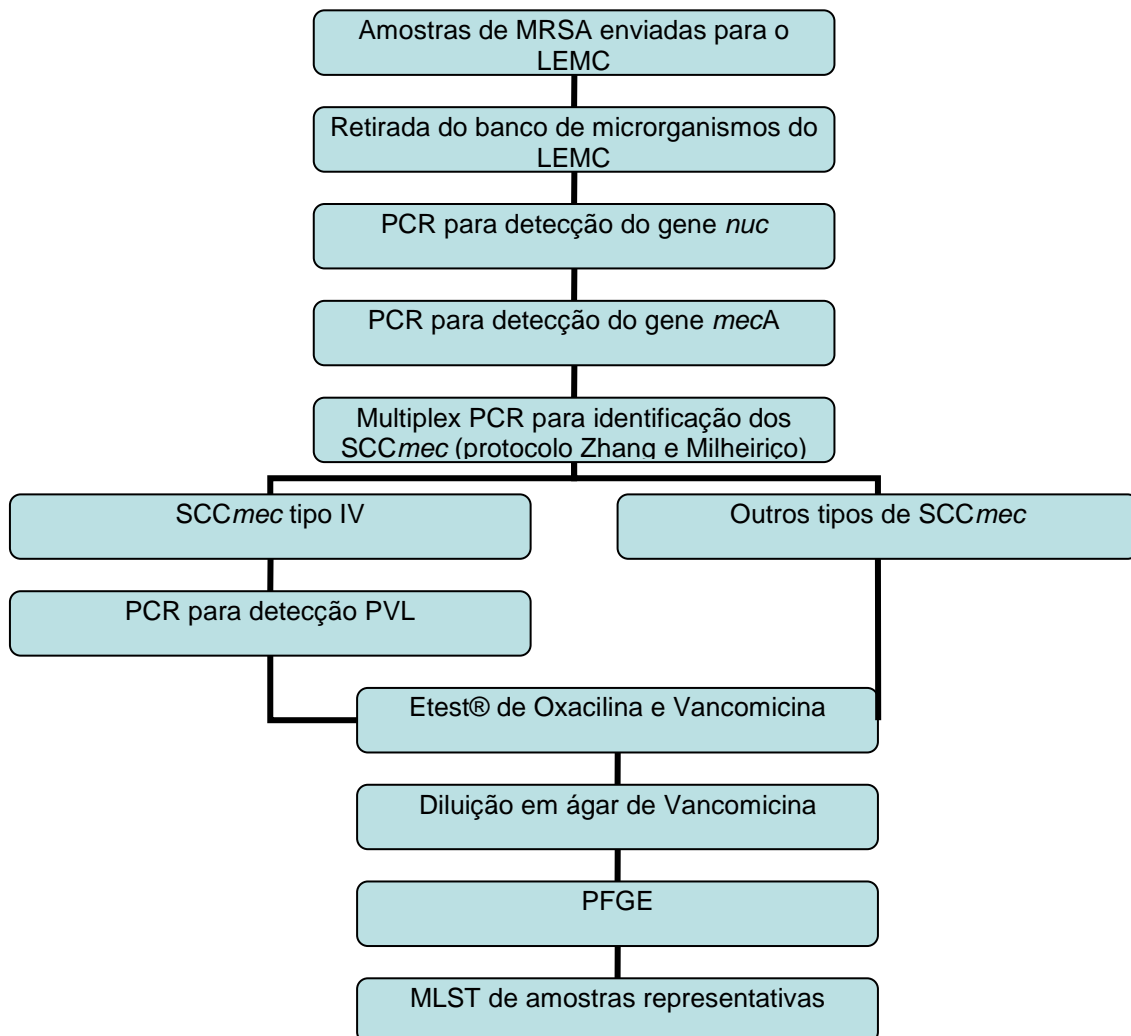
Os índices de discriminação (DIs) e intervalos de confiança foram calculados com base no índice de diversidade de Simpson como descrito por Grundmann *et al.*, 2001.

Utilizando os programas START e eBURSTv2, também disponíveis *online* (<http://pubmlst.org/software/analysis/start> e <http://saureus.mlst.net/>), construiu-se um dendograma baseado no ST de cada amostra e nos dados do banco, para demonstrar a relação entre as amostras e também para as separar em grupos, representando complexos clonais, quando existentes (Jolley *et al.*, 2001; Feil *et al.*, 2004).

O programa eBURSTv2 também permitiu a da análise das amostras estudadas em relação às amostras contidas no banco de dados de diversas localidades geográficas, sendo então realizada uma análise global (Feil *et al.*, 2004).



#### 4.4. Fluxograma da caracterização das amostras



**Figura 2:** Fluxograma da caracterização das amostras de MRSA de infecções de corrente sanguínea do Projeto SCOPE Brasil (2007 - 2009).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Frequência de *S. aureus* isolados no Projeto SCOPE Brasil

Durante o período de Junho de 2007 à Julho de 2009, foram encaminhadas ao LEMC um total de 1.787 microrganismos, dos quais 208 foram de *S. aureus*, sendo 62 (29,8%) resistentes à oxacilina (MRSA).

Entre os principais microrganismos isolados estão: *Klebsiella pneumoniae* (14,9%), seguido de *Staphylococcus coagulase negativo* (SCN) (12,1%), *Acinetobacter* spp. (11,8%), *S. aureus* (11,6%) e *P. aeruginosa* (9,8%) (tabela 8).

**Tabela 8.** Principais patógenos<sup>a</sup> isolados em hemoculturas de pacientes admitidos em hospitais brasileiros, em comparação com dados do Programa SCOPE Norte-Americano (SCOPE Brasil 2007- 2009).

Microrganismo	N° isolados (%)	
	Brazilian SCOPE (2007-2009)	SCOPE Norte-Americano (1995-2002)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	267 (14,9)	1.006 (4,8)
SCN <sup>b</sup>	217 (12,1)	6.566 (31,3)
<i>Acinetobacter</i> spp.	212 (11,8)	272 (1,3)
<b><i>Staphylococcus aureus</i></b>	<b>208 (11,6)</b>	<b>4.237 (20,2)</b>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	175 (9,8)	902 (4,3)
<i>Escherichia coli</i>	130 (7,3)	1.174 (5,6)
<i>Enterococcus</i> spp.	118 (6,6)	1.971 (9,4)
<i>Enterobacter</i> spp.	97 (5,4)	818 (3,9)
<i>Candida</i> spp.	87 (4,9)	1.888 (9,0)
<i>Serratia</i> spp.	69 (3,9)	356 (1,7)
Número total de isolados	1787 (100)	20.978 (100)

<sup>a</sup>Um ou mais microrganismos por paciente

<sup>b</sup>SCN = *Staphylococcus coagulase negativo*

Entre os patógenos Gram positivos (n=572), SCN (37,9%), *S. aureus* (36,4%), *E. faecalis* (15,4%), *E. faecium* (5,1%) e *Streptococcus* spp. (2,6%) foram isolados com maior frequência (tabela 9).

**Tabela 9.** Patógenos Gram positivos mais frequentemente isolados em hemoculturas de pacientes admitidos em hospitais brasileiros (SCOPE Brasil 2007 -2009).

Microrganismo	Número isolados (%)
SCN	217 (37,9)
<b><i>S. aureus</i></b>	<b>208 (36,4)</b>
<i>Enterococcus faecalis</i>	88 (15,4)
<i>Enterococcus faecium</i>	29 (5,1)
<i>Streptococcus</i> spp.	15 (2,6)
Outros <sup>a</sup>	15 (2,6)
Nº total de isolados Gram positivos	572

<sup>a</sup> Incluem: *Aerococcus viridans*; *Bacillus cereus*; *Corynebacterium* spp.; *Corynebacterium jeikeium*; *Corynebacterium matruchotii*; *Gemella haemolysans*; *Gemella morbillorum*; *Kocuria kristinae*; *Leifsonia aquatica*; *Leuconostoc lactis*; *Listeria monocytogenes*.

O projeto SCOPE original, conduzido em centros médicos dos Estados Unidos, revelou maior predominância de patógenos Gram positivos como causadores de bacteremias em pacientes hospitalizados, sendo o *S. aureus* (20,2%) o segundo mais isolado. No Brasil *S. aureus* foi o quarto agente (11,6%) mais frequentemente isolado.

Dentre os isolados de MRSA enviados pelos centros participantes, tivemos o centro 5 localizado na cidade de São Paulo – SP com o maior

percentual de MRSA (83,33%) e o centro 7 da cidade de Porto Alegre – RS apresentou o menor índice (7,14%) (tabela 10).

**Tabela 10.** Porcentagem de distribuição de MRSA isolados de infecções de corrente sanguínea entre os centros do Projeto SCOPE Brasil (2007-2009).

Centros participantes	* <i>S. aureus</i>	MRSA	MRSA (%)
1	41	18	43,90
2	9	3	33,33
3	11	10	9,09
4	3	1	33,33
5	6	5	83,33
6	12	3	25,00
7	42	3	7,14
9	16	3	18,75
10	10	2	20,00
12	11	5	45,45
13	44	9	20,45
Total	208	62	29,8%

Os centros 8, 11 e 15 não isolaram *S. aureus*, o centro 14 não enviou amostras bacterianas e o 16 iniciou sua participação recentemente no projeto;

\*: Isolados de *S. aureus* sensíveis e resistentes a oxacilina.

### 5.3. Caracterização Genética

Todas as amostras de MRSA apresentaram PCR positivos para a presença dos genes *nuc* e *mecA*. Os resultados de SCC*mec* das amostras, processadas segundo protocolo de Zhang e colaboradores (2005) e Milheiriço e colaboradores (2007), encontram-se descritos na tabela 11. Do total de 62 amostras processadas pelo protocolo de Zhang e colaboradores (2005), 25 amplificaram para o SCC*mec* tipo III, 16 amplificaram para o SCC*mec* tipo II, 6 amplificaram para SCC*mec* tipo I, 9 amostras amplificaram para o SCC*mec* tipo

IV, sendo 4 *SCCmec* subtipo IVa, 2 *SCCmec* subtipo IVb, 1 *SCCmec* subtipo IVc e 2 *SCCmec* subtipo IVd.

Um total de 2 amostras não produziu nenhuma banda visível, e outras 4 amostras apresentaram bandas múltiplas, amplificaram para mais de um tipo de *SCCmec* tipo I e III pelo protocolo de Zhang e colaboradores (2005). O protocolo de Milheiriço e colaboradores (2007) conseguiu definir o tipo de *SCCmec* para as amostras com bandas múltiplas, totalizando 29 amostras com *SCCmec* tipo III. Porém as duas amostras que não apresentaram bandas visíveis no protocolo do Zhang e colaboradores (2005) também não foram tipadas pelo protocolo do Milheiriço e colaboradores (2007).

A única amostra com *SCCmec* subtipo IVc (37490) proveniente de um centro da cidade de São Paulo apresentou o gene que codifica PVL.

**Tabela 11.** Data da hemocultura, tipos de SCC<sub>mec</sub> e CIM de oxacilina e vancomicina das amostras de MRSA isolados de infecções de corrente sanguínea do Projeto SCOPE Brasil (2007-2009).

Centro hospitalar	Nº banco Lemc	Data da hemocultura	SCC <sub>mec</sub>	CIM (µg/ml) <sup>a</sup>		
				Oxacilina Etest® (µg/ml)	Vancomicina Etest® (µg/ml)	Vancomicina Diluição em agar (µg/ml)
1	31722	16/12/2007	I	>256	1	0.5
	32996	12/04/2008	I	>256	2	0.5
	35680	25/08/2008	I	>256	2	0.5
	36486	17/10/2008	I	>256	1.5	0.5
	37267	17/12/2008	I	>256	1.5	0.5
	32219	09/02/2008	II	>256	2	1
	33416	29/04/2008	II	>256	1.5	0.5
	29811	07/07/2007	II	>256	1.5	0.5
	29840	11/07/2007	II	>256	1.5	0.5
	37574	18/01/2009	II	>256	2	0.5
	31341	23/11/2007	II	>256	2	0.5
	29907	17/07/2007	III	>256	1	0.5
	37404	12/01/2009	III	>256	2	1
	37668	29/01/2009	III	>256	1.5	0.5
	29708	27/06/2007	IVa	8	1	0.5
	30696	26/09/2007	IVa	>256	1	1
	31901	09/01/2008	IVb	>256	2	1
30911	10/10/2007	IVb	>256	2	1	
2	34822	20/05/2007	III	>256	1	0.5
	36212	07/08/2008	III	>256	1.5	0.5
	37412	03/10/2008	III	>256	1.5	0.5
3	37507	07/12/2008	I	>256	1.5	0.5
	31130	05/07/2007	III	>256	1	0.5
	30989	16/10/2007	III	>256	1	1
	32179	13/01/2008	III	>256	1.5	0.5
	37489	12/12/2008	II	>256	1.5	0.5
	31003	21/09/2007	II	>256	2	1
	30988	24/10/2007	II	>256	2	0.5
	34403	19/03/2008	III	>256	1	0.5
	37490	28/11/2008	IVc	12	1.5	0.5
	31554	01/11/2007	IVd	16	1.5	1
4	29722	30/06/2007	IVa	24	1.5	0.5
5	35479	30/06/2005	III	>256	1,5	1
	30828	01/09/2007	III	>256	1	1
	32770	08/03/2008	III	>256	1	0.5
	31084	09/10/2007	II	128	1.5	0.5
	36448	20/08/2008	NT <sup>b</sup>	>256	1.5	0.5
6	33815	05/02/2008	III	>256	1	1
	31384	07/07/2007	II	>256	1	0.5
	31385	14/06/2007	II	>256	2	0.5
7	32965	02/01/2008	III	>256	1.5	0.5

	31850	23/10/2007	III	>256	1.5	0.5
	38362	21/05/2008	III	>256	1.5	0.5
	33214	12/03/2008	IVd	48	1.5	0.5
9	35769	28/07/2008	IVa	48	1	1
	36446	18/08/2008	III	>256	1	0.5
	32901	20/03/2008	III	>256	1.5	0.5
10	32917	06/03/2008	III	>256	1	0.5
	33956	30/06/2005	II	>256	2	0.5
	34754	03/06/2008	III	>256	1.5	0.5
12	39267	09/11/2008	III	>256	2	1
	39268	05/08/2009	III	>256	2	2
	39269	11/05/2008	II	>256	2	2
	37213	01/09/2008	II	>256	1.5	1
	38018	08/01/2009	II	>256	2	0.5
	37212	2008	III	>256	1	0.5
	38020	26/11/2008	III	>256	2	0.5
13	38017	15/01/2009	III	>256	2	0.5
	38644	02/02/2009	III	>256	1,5	0,5
	38643	24/02/2009	III	>256	2	0,5
	37086	12/06/2008	III	>256	1	0,5
	37092	21/06/2008	NT <sup>b</sup>	>256	2	0,5

<sup>a</sup> Concentração Inibitória Mínima (CIM);

<sup>b</sup> Não tipável.

**Tabela 12.** Porcentagem, distribuição dos tipos de SCCmec e CIM 50/90 de MRSA isolados de infecções de corrente sanguínea segundo os protocolos de Zhang e colaboradores (2005) e Milheiriço e colaboradores (2007).

SCCmec	MRSA		CIM 50/90 (µg/ml)		
	Frequência	(%)	Oxacilina (Etest®)	Vancomicina (Etest®)	Vancomicina (Diluição em Ágar)
Tipo III	29	46,77	>256/>256	1,5/2,0	0,5/1,0
Tipo II	16	25,81	>256/>256	2,0/2,0	0,5/1,0
Tipo IV	9	14,52	48/>256	1,5/2,0	0,5/1,0
Tipo I	6	9,68	>256/>256	1,5/2,0	0,5/0,5
Não tipável	2	3,22	>256/>256	1,5/2,0	0,5/0,5

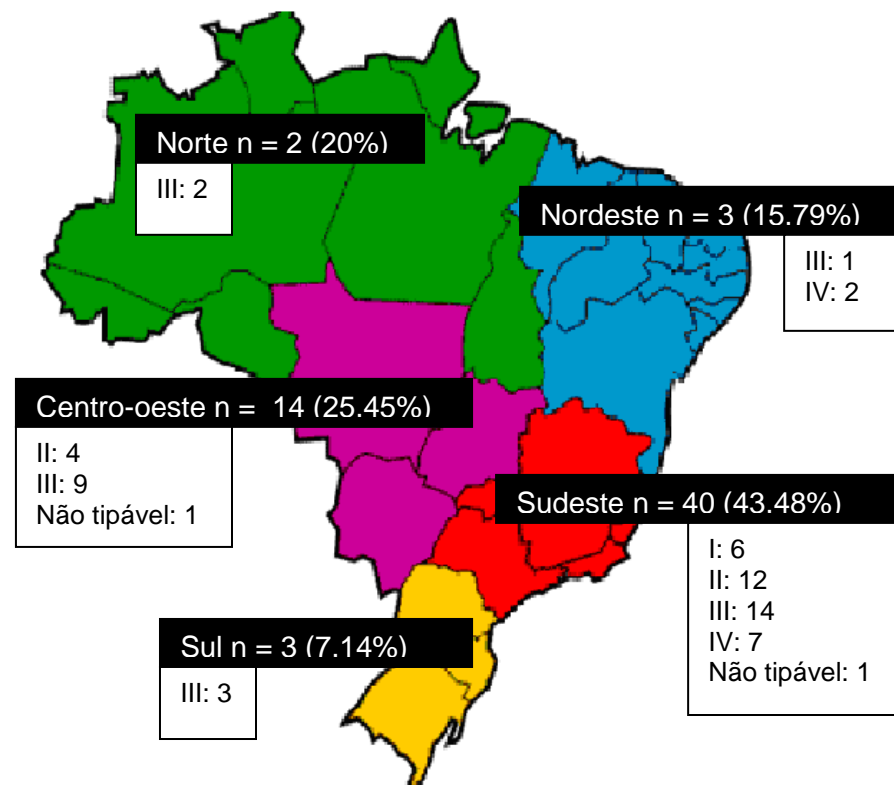
Observamos a predominância do SCCmec tipo III seguido dos tipos II, IV e I.

**Tabela 13.** Porcentagem de distribuição de MRSA isolados de infecções de corrente sanguínea nas regiões brasileiras.

Regiões brasileiras	Centros participantes	* <i>S. aureus</i>	MRSA	Porcentagem de MRSA (%)
Norte	10	10	2	20,00
Nordeste	9	19	3	15,79
Centro-oeste	12 e 13	55	14	25,45
Sudeste	1, 2, 3, 4, 5 e 6	82	40	43,48
Sul	7	42	3	7,14
Total	11	208	62	29,80

Os centros 8, 11 e 15 não isolaram *S. aureus*, o centro 14 não enviou amostras bacterianas e o 16 iniciou sua participação recentemente no projeto.

\*: Isolados de *S. aureus* sensíveis e resistentes a oxacilina.



**Figura 3.** Distribuição dos MRSA isolados de infecções de corrente sanguínea nas regiões brasileiras e os tipos de SCCmec encontrados.



---

---

Observando a figura 3 e tabela 13 que comparam as regiões brasileiras, temos o Sudeste com o maior percentual de MRSA (43,48%) e a região Sul com o menor índice (7,14%).

A região Sudeste apresentou maior número de MRSA e variabilidade de tipos de *SCCmec* sendo a única região na qual o *SCCmec* tipo I foi encontrado. A região Sul apresentou menor porcentagem de MRSA e estes tinham *SCCmec* tipo III apenas.

As amostras com *SCCmec* tipo II só foram encontradas na região Sudeste e Centro-oeste em seis hospitais diferentes (figura 3 e tabela 11).

## 5.2. Perfil de sensibilidade

Todas as amostras oriundas dos centros participantes classificadas como MRSA, foram submetidas a técnicas dilucionais para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) para oxacilina e vancomicina (tabela 11), uma vez que os centros participantes enviaram os resultados apenas por categoria de sensibilidade.

As amostras com *SCCmec* tipo I, II e III apresentaram CIM >256 µg/ml para oxacilina por Etest® com exceção de uma delas com *SCCmec* tipo II com CIM igual a 128 µg/ml. Seis amostras do total de nove com *SCCmec* tipo IV apresentaram para oxacilina CIM ≤48 µg/ml com as CIMs 50/90 igual a 48/>256 µg/ml (tabela 12).

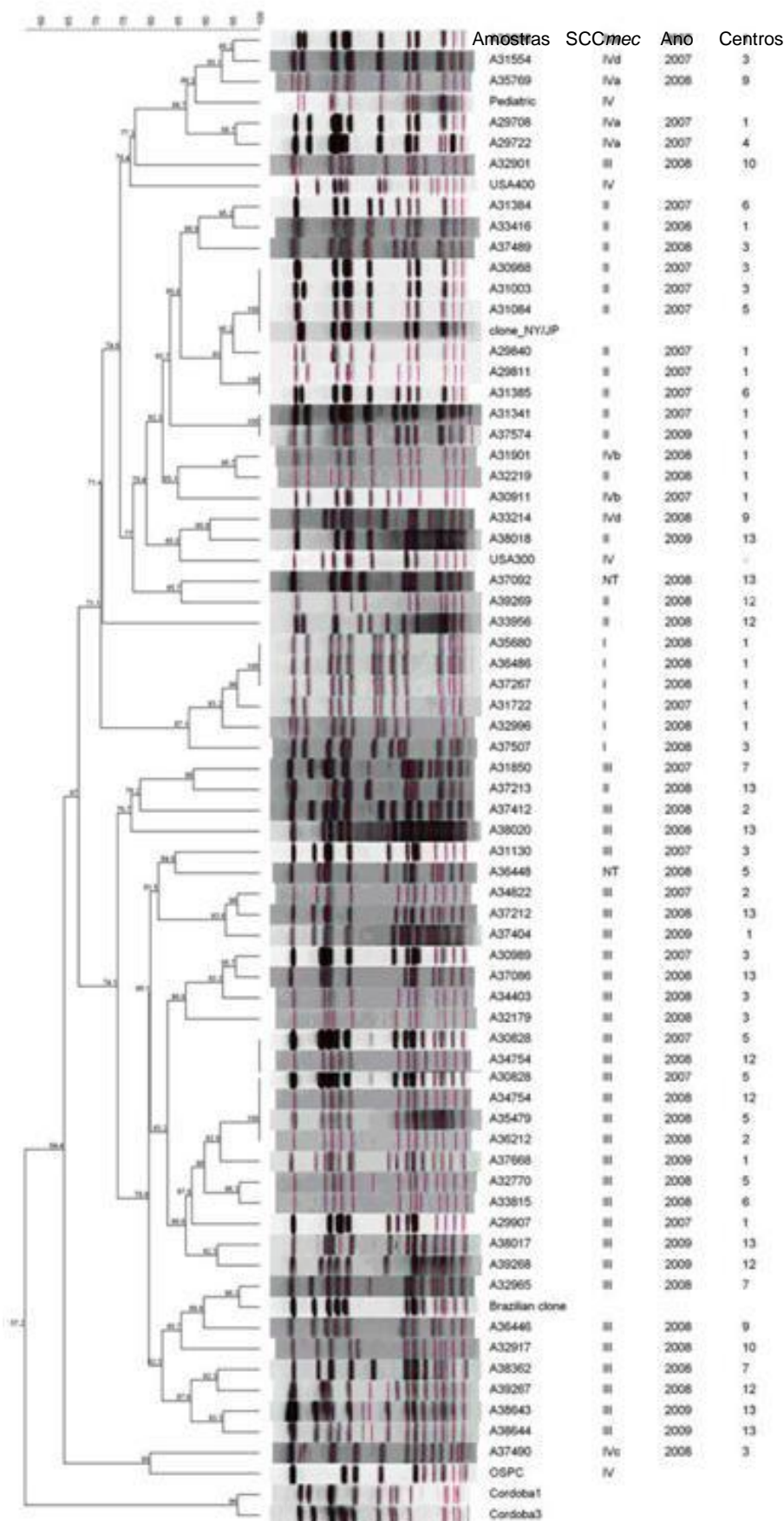
Observamos CIMs de 1,0, 1,5 e 2,0 µg/ml para vancomicina por Etest®, porém, quando feito a diluição em ágar, apenas duas amostras (39268 e 39269) tiveram CIM igual a 2,0 µg/ml, todas as outras apresentaram valores entre 0,5 e 1,0 µg/ml.

As amostras com SCCmec tipo II apresentaram CIM 50/90 por Etest® mais elevada (2,0/2,0 µg/ml), comparada ao restante das amostras, porém os resultados para diluição em ágar foram iguais a 0,5/1,0 µg/ml.

#### **5.4. Tipagem Molecular**

Todas as 62 amostras foram submetidas à técnica de PFGE e analisadas no programa BioNumerics versão 5.0 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium) (figura 4).

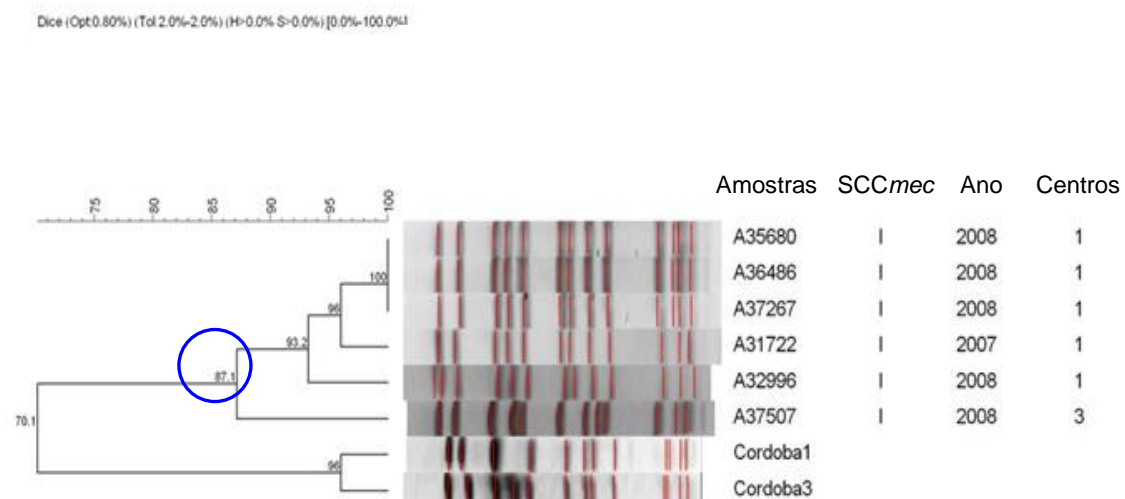
Downloaded from www.nrcresearchpress.com by UNIV OF CALIFORNIA on 06/11/15



**Figura 4:** Dendrograma de similaridade genética entre os 62 isolados de MRSA de acordo com padrão de PFGE, construído pelo método de agrupamento UPGMA, baseado no coeficiente de Dice. As colunas à direita do dendrograma correspondem respectivamente, ao número do banco LEMC ou clone, tipo de *SCCmec*, ano de isolamento e número do centro participante do Projeto SCOPE Brasil.

NT: *SCCmec* não tipável.

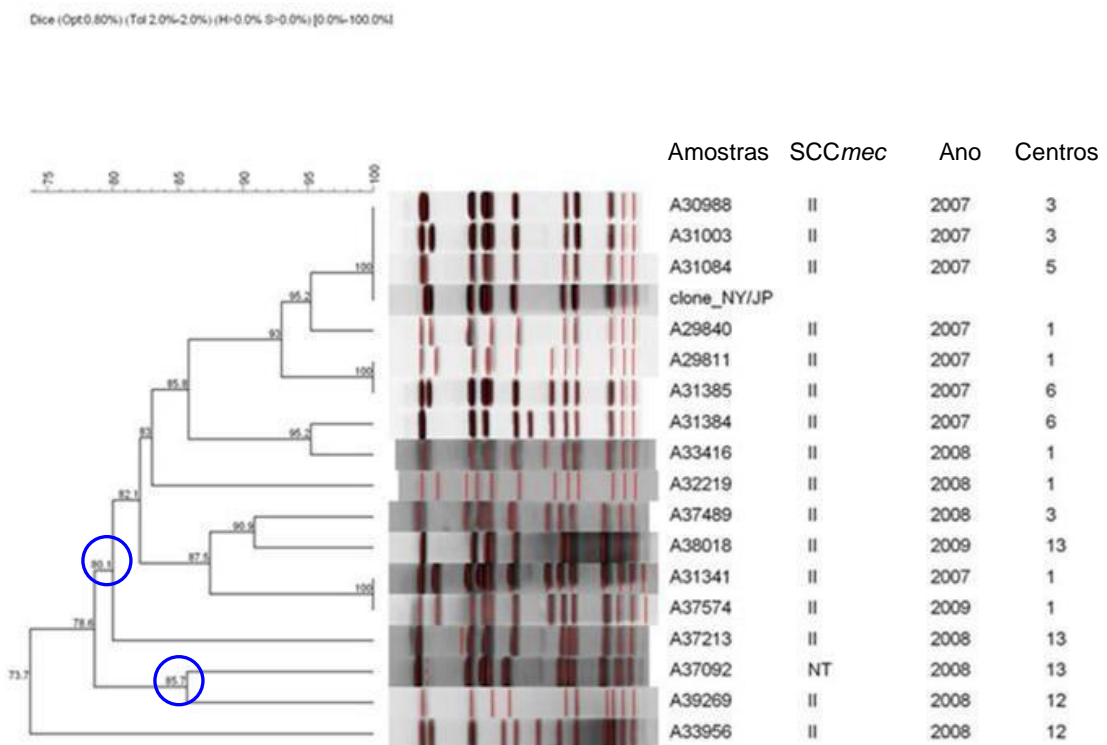
Foram incluídas como controle as amostras Pediátrico epidêmico (Pediatric *SCCmec* tipo IV), Clone Epidêmico Brasileiro (Brazilian clone *SCCmec* tipo III), USA300 (*SCCmec* subtipo IVb), USA400 (*SCCmec* tipo IV), OSPC (OSPC *SCCmec* tipo IV), Nova Iorque/Japão (clone\_NY/JP *SCCmec* tipo II) e



**Figura 5.** Análise dos clusters das amostras contendo *SCCmec* tipo I com os clones Chile/Córdoba, utilizando o coeficiente de similaridade de Dice e o método UPGMA. As colunas à direita do dendrograma correspondem,

respectivamente, ao número do banco Lemc ou clone, tipo de *SCCmec*, ano de isolamento e número do centro participante do Projeto SCOPE Brasil.

A análise do dendrograma somente com amostras portando *SCCmec* tipo I revelou que todas fazem parte de um mesmo *cluster* (destacado na 5) com similaridade de 87,1% e não possuem nenhuma similaridade com o clone Chile/Córdoba.

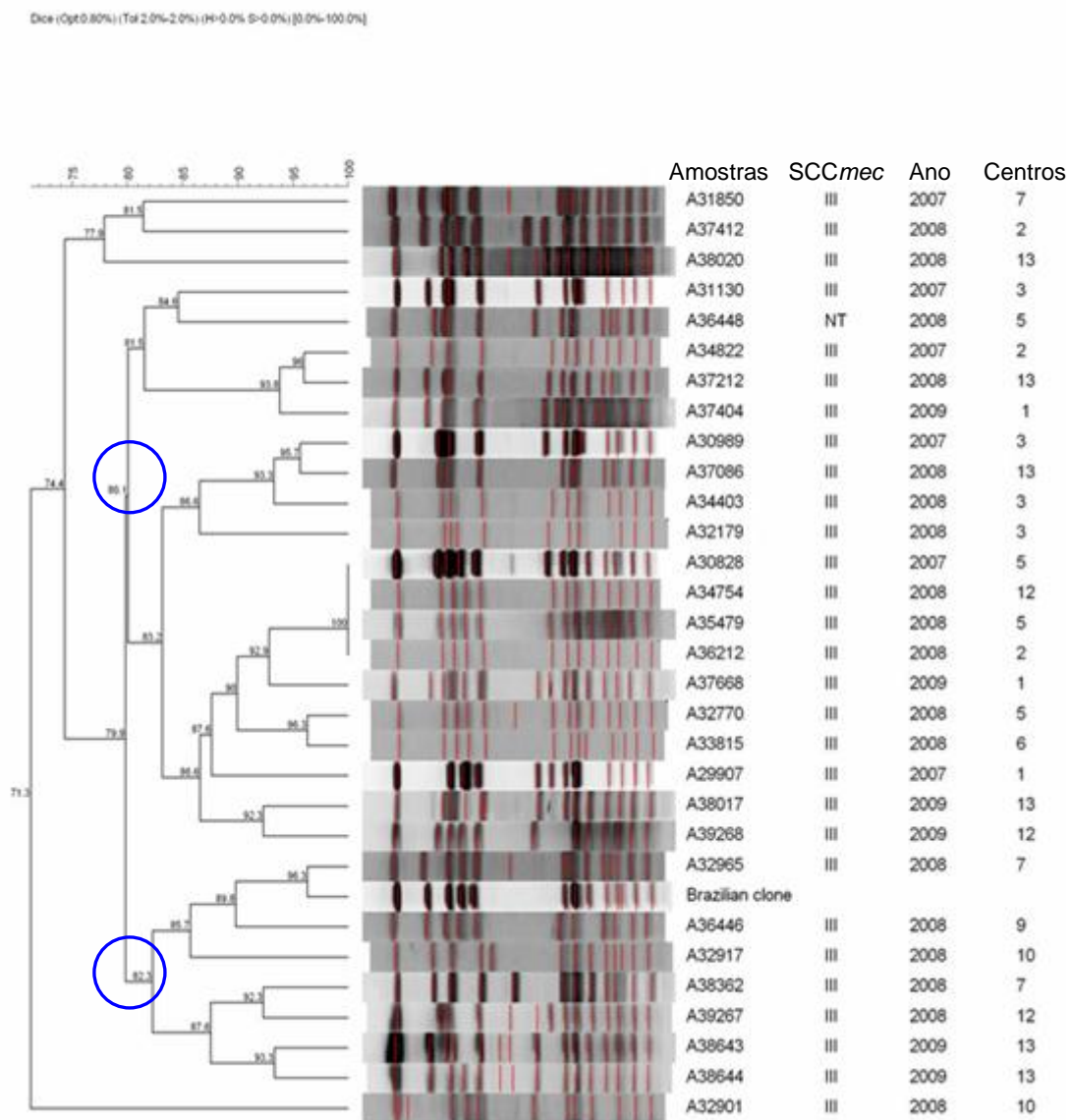


**Figura 6.** Análise dos clusters das amostras contendo *SCCmec* tipo II com o clone Nova Iorque/Japão, utilizando o coeficiente de similaridade de Dice e o método UPGMA. As colunas à direita do dendrograma correspondem, respectivamente, ao número do banco LEMC ou clone, tipo de *SCCmec*, ano de isolamento e número do centro participante do Projeto SCOPE Brasil.

NT: SCC*mec* não tipável.

As amostras com SCC*mec* tipo II agruparam-se em dois clusters com 80,1% e 85,7% de similaridade (destacados na figura 6). Três amostras (30988, 31003 e 31084) foram classificadas como clones ao Nova Iorque/Japão pois apresentaram 100% de similaridade, estas pertencem a dois centros distintos na cidade de São Paulo (3 e 5). As amostras 31341 e 37574 também são clones e foram isoladas no mesmo centro hospitalar.

Uma das amostras (37092) das quais não foi possível tipar o SCC*mec* revelou similaridade de 85,7% com uma amostra tipo II (39269). Uma das amostras não se relacionou com nenhum dos clusters (33956).



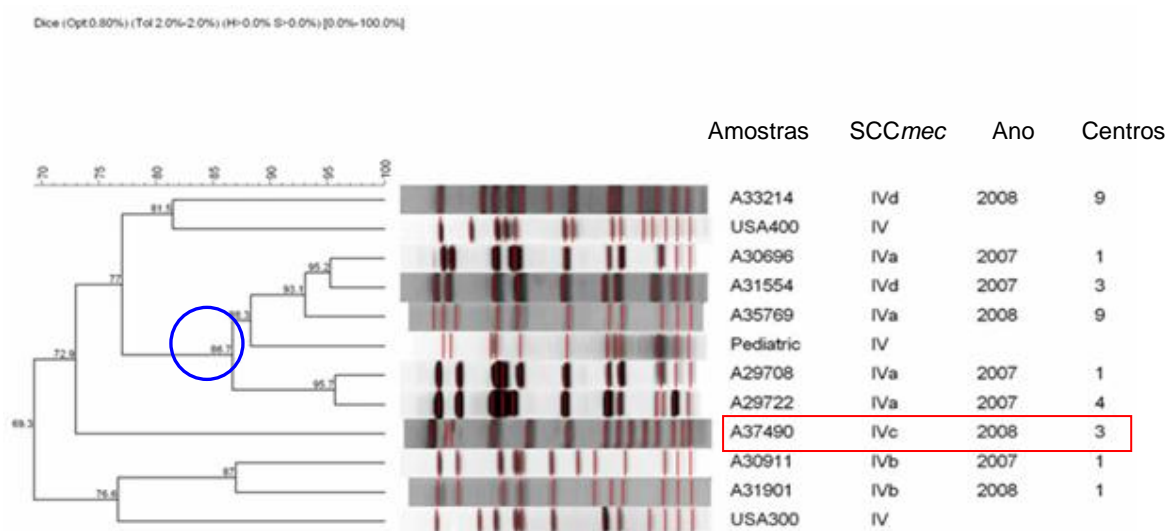
**Figura 7.** Análise dos clusters das amostras contendo SCCmec tipo III com o Clone Epidêmico Brasileiro, utilizando o coeficiente de similaridade de Dice e o método UPGMA. As colunas à direita do dendrograma correspondem, respectivamente, ao número do banco LEMC ou clone, tipo de SCCmec, ano de isolamento e número do centro participante do Projeto SCOPE Brasil.

NT: SCCmec não tipável.

As 29 amostras com SCCmec tipo III foram agrupadas em dois clusters principalmente (destacados na figura 7). Três amostras não se relacionaram com estes clusters (31850, 37412 e 32901).

Uma das amostras (32965) relacionou-se geneticamente ao perfil do CEB em 95,3%. A amostra com SCCmec não tipável (36448) teve 84,6% de similaridade com outra tipo III (31130).

Quatro amostras são clones entre si, foram isoladas em três hospitais diferentes de São Paulo e Goiânia (30828, 34754, 35479 e 36212).



**Figura 8.** Análise dos clusters das amostras contendo SCCmec tipo IV com o clone Pediátrico, USA300 e USA400, utilizando o coeficiente de similaridade de Dice e o método UPGMA. As colunas à direita do dendrograma correspondem, respectivamente, ao número do banco LEMC ou clone, tipo/subtipo de SCCmec, ano de isolamento e número do centro participante do Projeto SCOPE Brasil.

A amostra marcada em vermelho (37490) teve resultado positivo para a detecção de PVL (figura 8).



Um cluster (destacado na figura 8) com similaridade superior a 80% reuniu a maioria das amostras com SCCmec tipo IV e apresentou um perfil similar ao Clone Pediátrico. Uma das amostras SCCmec subtipo IVd (33214) correlacionou-se à linhagem USA400. A amostra com PVL positiva não se relacionou a nenhum dos clones.

Amostras selecionadas de acordo com o tipo de SCCmec foram caracterizadas através da técnica de MLST.

**Tabela 14:** Relação das amostras de MRSA isolados de infecções de corrente sanguínea com os respectivos resultados do SCCmec, MLST, ST e CC do Projeto SCOPE Brasil (2007-2009).

Amostras/Clones	Data da hemocultura	SCCmec	MLST <sup>b</sup> alelos <sup>c</sup>	ST <sup>d</sup>	CC <sup>e</sup>
37267	17/12/2008	I	1-4-1-4-12-1-28	105	5
30988	24/10/2007	II	1-4-1-4-12-1-28	105	5
31084	09/10/2007	II	1-4-1-4-12-1-28	105	5
37092	21/07/2008	NT <sup>a</sup> (sugestivo de SCCmec tipo II)	1-4-1-4-12-1-10	5	5
Clone Nova Iorque/Japão (N315)		II	1-4-1-4-12-1-10	5	5
32965	02/01/2008	III	2-3-1-1-4-4-3	239	8
36448	20/08/2008	NT <sup>a</sup> (sugestivo de SCCmec tipo III)	2-3-1-1-4-4-3	239	8
Clone Epidêmico Brasileiro		III	2-3-1-1-4-4-3	239	8
29708	27/06/2007	IVa	1-4-1-4-37-1-130	1176	5
35769	28/07/2008	IVa	1-4-1-4-12-1-10	5	5
Clone Pediátrico (USA800)		IV	1-4-1-4-12-1-10	5	5

NT<sup>a</sup>: Não tipável

MLST<sup>b</sup>: *Multi locus sequence typing*

Alelos<sup>c</sup>: *arc, aroe, glpf, gmk, pta, tpi, yqil*

ST<sup>d</sup>: *Sequence typing*

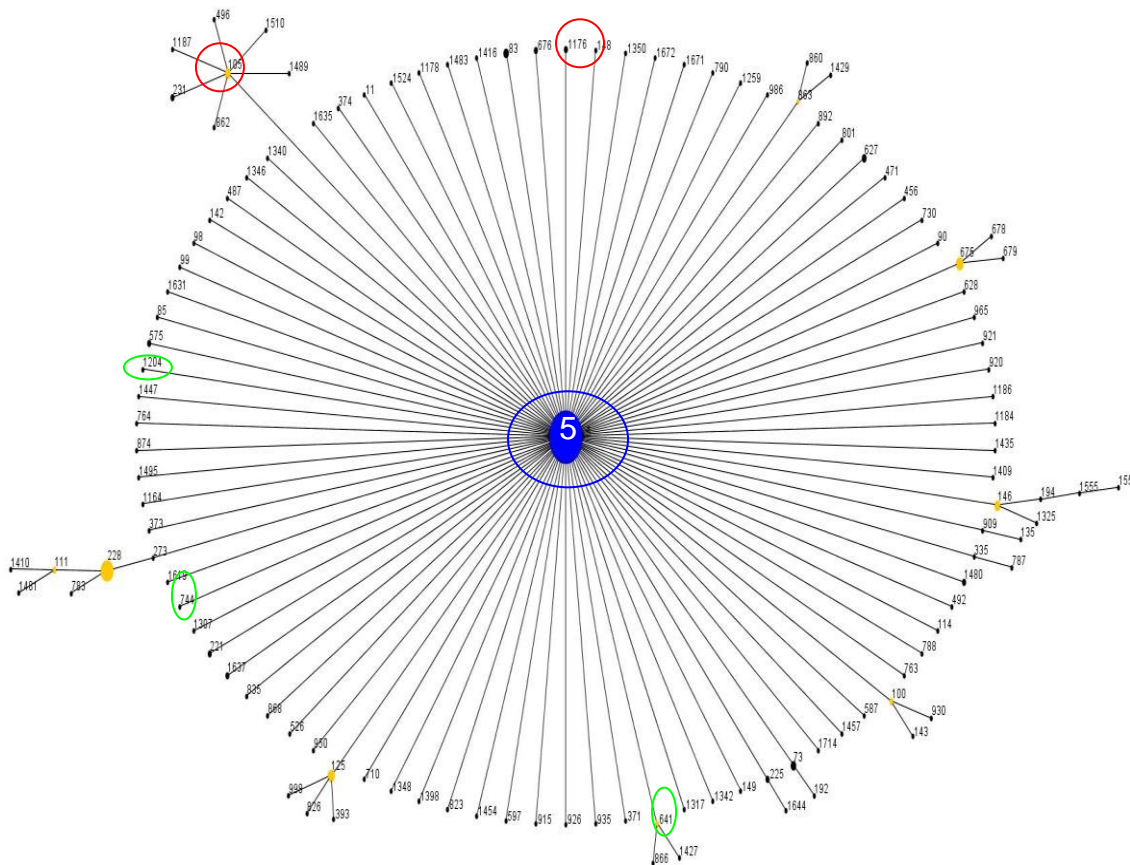
CC<sup>e</sup>: Complexo Clonal

Entre os isolados de MRSA estudados verificou-se ST105 em amostra com *SCCmec* tipo I; ST5 e ST105 para amostras com *SCCmec* tipo II; ST239 para amostras carregando *SCCmec* tipo III e ST5 e ST1176 relacionados a amostras apresentando *SCCmec* tipo IV (tabela 14).

A genotipagem por MLST demonstrou que o isolado 29708 pertencente ao CC5 apresenta um novo alelo para o gene *yqil*, resultando no ST1176 até então inédito no banco de dados do MLST, recentemente descrito em nosso laboratório por Mirian S. do Carmo (comunicação pessoal).

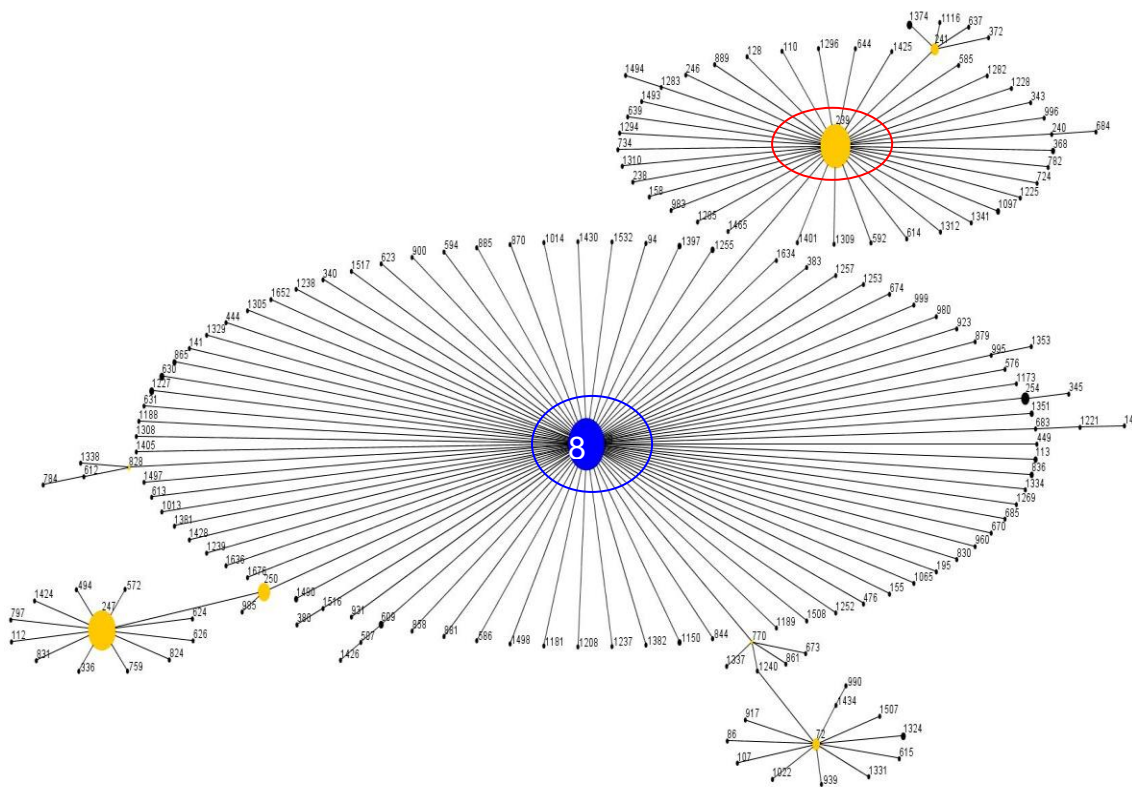
Duas cepas (35769 e 37092) ST5 carregam o mesmo *SCCmec* do Clone Pediátrico (*SCCmec* tipo IV) e Nova Iorque/Japão (*SCCmec* tipo II) respectivamente.

A cepa estudada com *SCCmec* tipo III e outra sugestiva do mesmo tipo (32965 e 36448), possuem ST239 e pertencem ao CC8 característico do CEB.



**Figura 9:** Diagrama do Complexo Clonal (CC5) obtido em 21 de Junho de 2010 através do programa BURSTv2 (<http://pubmlst.org/software/analysis/start> e <http://saureus.mlst.net/>) mostrando os isolados estudados com os ST5, 105 e 1176 na base de dados pública de *S. aureus* MLST (<http://www.mlst.net/>). O círculo em azul indica o progenitor do grupo o CC5. Os círculos em vermelho correspondem aos MRSA em estudo pertencentes ao mesmo Complexo Clonal, já aqueles em verde são os descritos anteriormente no Brasil. O diâmetro dos pontos depende do número de amostras com o ST indicado. As linhas mostram com qual ST eles estão ligados.

Outras 6 cepas isoladas no Brasil mas não pertencentes ao estudo foram relacionadas ao ST105 e duas cepas com ST641 (figura 9).



**Figura 10:** Diagrama do Complexo Clonal 8 obtido em 21 de Junho de 2010 através do programa BURSTv2 (<http://pubmlst.org/software/analysis/start> e <http://saureus.mlst.net/>) mostrando o isolado estudado com o ST 239 na base de dados pública de *S. aureus* MLST (<http://www.mlst.net/>). O círculo em azul indica o progenitor deste grupo CC8, já em vermelho indica os isolados com ST 239.

---

---

## 6. DISCUSSÃO

Um total de 1787 microrganismos foram isolado por 15 centros participantes até Julho de 2009, desses 32% são Gram positivos. Entre os patógenos Gram positivos isolados com maior frequência estão: SCN (37,9%), *S. aureus* (36,4%), *E. faecalis* (15,4%), *E. faecium* (5,1%) e *Streptococcus* spp. (2,6%).

O projeto SCOPE norte americano, revelou maior predominância de patógenos Gram positivos como causadores de bacteremias em pacientes hospitalizados, sendo o *S. aureus* o segundo mais isolado (Wisplinghoff *et al.*, 2004).

Em contraste aos resultados do estudo Norte-Americano, no Brasil *S. aureus* foi o quarto agente (11,6%) mais frequentemente isolado entre todos os microrganismos. Sader e colaboradores (2001), relatam que houve uma diminuição da prevalência deste patógeno em ICS, pois em estudo realizado em doze hospitais localizados em quatro regiões brasileiras, a porcentagem de isolamento foi de 23,5%.

Foram recebidos 208 isolados de *S. aureus* de todos os centros participantes, dos quais 62 eram MRSA (29,8%). Destaca-se uma maior incidência de MRSA na região Sudeste e menor na região Sul.

Na América Latina, a exiguidade de estudos prospectivos de vigilância limita a obtenção da estimativa da prevalência de MRSA em diferentes regiões geográficas. Na Argentina, estudo de vigilância realizado em 27 centros médicos detectou 58% de resistência à oxacilina entre amostras coletadas entre 1996 e 1998 (Bantar *et al.*, 2000).

---

---

Encontramos no presente estudo, uma predominância do SCC*mec* tipo III (46,77%) relacionado ao clone epidêmico brasileiro (CEB), porém observou-se outros tipos prevalentes I, II e IV. Esse resultado difere do estudo de Conterno, na década de 90, realizado no Hospital São Paulo (centro 1), onde 86% das amostras de MRSA pertenciam ao CEB (Conterno, 1999).

Inoue (2008), na mesma instituição (centro 1) encontrou em amostras de MRSA isoladas de ICS entre 2002-2005, 87,16% pertencentes ao SCC*mec* tipo III. Como este tipo está estreitamente associado ao CEB, verificou que não houve uma diminuição significativa desta linhagem clonal. Esses dados foram corroborados pelos resultados do PFGE, no qual 128 amostras pertenciam a um único cluster relacionado a este clone (Inoue, 2008).

Os nossos resultados sugerem que houve uma diminuição da prevalência do CEB no centro 1 durante os anos estudados 2007 a 2009, o que pode indicar uma possível mudança do perfil epidemiológico de MRSA incluindo a introdução de novos tipos de clones como o Pediátrico e Nova Iorque/Japão.

Nossos dados sugerem uma disseminação interhospitalar de amostras carreando SCC*mec* tipo II. Através da técnica de PFGE observamos três isolados com 100% de similaridade com o clone Nova Iorque/Japão e outras duas amostras fortemente relacionadas (SCC*mec* tipo II) oriundas de diferentes centros localizados na cidade de São Paulo.

Observamos a persistência do CEB em amostras invasivas de MRSA. Quatro amostras com SCC*mec* tipo III clones entre si, pertenciam a três centros hospitalares diferentes, dois localizados na cidade de São Paulo e um em Goiânia. De acordo com os trabalhos conduzidos por Miranda e

colaboradores, este clone teria algumas vantagens adaptativas, como maior capacidade de produzir biofilme, aderir e invadir as vias respiratórias (de Miranda *et al.*, 2007). Estas características podem ter contribuído, em parte, para a continuidade desta linhagem desde a sua primeira descrição no Brasil em 1993 (Sader *et al.*, 1993).

Durante os dois anos avaliados no presente estudo, foi possível observar que a região Sudeste apresentou maior variabilidade de tipos de SCCmec encontrados, foi a única região na qual identificamos o tipo I. Na região Sul observamos o SCCmec tipo III apenas. As amostras com SCCmec tipo II só foram encontradas na região Sudeste e Centro-oeste em cinco hospitais diferentes. É difícil precisar o momento exato no qual se iniciou este fenômeno, porém resultados obtidos por estudos realizados em nossa instituição por Andrade (2008) e dados de Inoue (2008), corroboram a hipótese de que esta mudança se acentuou nos últimos cinco anos.

O estudo de Andrade avaliou amostras do período de 1997 a 2006 de sete centros médicos participantes do programa SENTRY localizados em três países na América Latina - Brasil, Argentina e Chile. As amostras de todas as localidades, representantes do tipo IV foram predominantemente isoladas após o ano de 2000 (Andrade, 2008).

Durante os quatro anos avaliados no estudo, Inoue (2008) observou o surgimento de amostras portadoras de SCCmec tipos I (3,9%), II (0,8%) e IV (7,7%) principalmente nos últimos dois anos analisados (2004 e 2005).

Um achado relevante em nosso estudo foram as nove amostras de MRSA com SCCmec tipo IV que diferentemente dos MRSA identificados nas cidades de Porto Alegre e Rio de Janeiro (Ribeiro *et al.*, 2005; Ribeiro *et al.*,

---

---

2007), associados aos clones USA300, USA400 e OSPC, foram predominantemente relacionados ao clone Pediátrico. Apenas uma amostra relacionou-se geneticamente ao clone USA400.

Isolados portando SCC*mec* IV são comumente relacionados a amostras provenientes da comunidade (Fey *et al.*, 2003). O clone Pediátrico, apesar de possuir SCC*mec* tipo IV, é uma exceção à regra, pois foi descrito primeiramente como uma linhagem hospitalar em Portugal (Sa-Leao *et al.*, 1999).

Dentre os nove MRSA com tipo IV, apenas um foi positivo para produção de PVL, porém não se correlacionou com nenhum dos clones internacionais. O estudo caso controle realizado no Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo por Vidal, avaliou 33 casos de pacientes com bacteremia por MRSA SCC*mec* tipo IV no período de 2002 a 2003 e não detectou a presença de PVL em nenhuma das amostras (Vidal, 2007).

Inoue (2008) analisou dez amostras com SCC*mec* subtipo IVa e uma foi positiva para o gene produtor de PVL, tal amostra correlacionou-se ao clone Pediátrico. Em nosso trabalho isolamos uma amostra produtora de PVL, porém apresentou SCC*mec* subtipo IVc e não teve similaridade com nenhum dos clones. Ambas amostras produtoras de PVL foram isoladas na cidade de São Paulo. Estes dados sugerem que, apesar de pouco frequente, outros tipos clonais contendo SCC*mec* tipo IV possam estar emergindo como causa de bacteremia na cidade de São Paulo.

Curiosamente, as amostras SCC*mec* tipo I do presente estudo não foram relacionadas ao clone Chile/Córdoba, descrito na Argentina e Chile (Sola *et al.*, 2002). Andrade atribuiu a maior parte das 23 amostras tipo I encontradas na



---

---

Argentina e Chile ao clone Chile/Córdoba, porém não foram encontrados representantes desta linhagem no Brasil (Andrade, 2008). Por estarmos diante de um SCCmec diferente do comumente relacionado ao CEB e considerando que o SCCmec destas amostras foram identificadas somente pelo protocolo de multiplex de Zhang e colaboradores (2005), novos estudos moleculares nessas amostras são recomendados para confirmação destes resultados.

Em nosso estudo tivemos duas amostras que não apresentaram bandas visíveis para os SCCmec tipo I ao V detectáveis nos protocolos utilizados (Zhang *et al.*, 2005; Milheiriço *et al.*, 2007). Considerando que já foram descritos até o momento oito tipos de SCCmec (Ito *et al.*, 2009) é possível que essas amostras possam ter alguma relação, porém seria necessário a utilização de novos protocolos.

Trabalhos publicados a respeito da clonalidade de *S. aureus* são frequentemente complementados pela técnica de MLST. A maior parte dos MRSA's circulantes destacam-se em cinco linhagens: CC8, CC5, CC30, CC45, e CC22 (Enright *et al.*, 2000; Enright *et al.*, 2002). Em nosso estudo, todas as amostras de MRSA estudadas, fazem parte somente de dois CC: CC5 e CC8.

A respeito dos clones de disseminação internacional, foram classificados por MLST como ST239 o CEB e ST5 os clones pediátrico e Nova Iorque/Japão. Entre os isolados de MRSA estudados verificou-se ST105 em amostra com SCCmec tipo I; ST5 e ST105 para amostras com SCCmec tipo II; ST239 para amostras carregando SCCmec tipo III e ST5 e ST1176 relacionados a amostras apresentando SCCmec tipo IV. No Brasil, isolados similares ao clone Nova Iorque/Japão, também ST5, foram registrados no Rio de Janeiro (de Miranda *et al.*, 2007).

É interessante notar a presença do CC5 circulante em nosso país, indicando um ancestral genético comum. Este trabalho permitiu caracterizar uma amostra com ST1176 até então inédito no banco de dados do MLST, descrito recentemente em nosso laboratório por Mirian S. do Carmo (comunicação pessoal). Estas observações nos levariam a questionar se a maioria dos isolados de infecções hospitalares por MRSA no país não seriam realmente produto de apenas quatro perfis alélicos: ST5, ST105, ST1176 e ST239.

Trabalhos nacionais de Trindade e colaboradores (2005) e Vidal e colaboradores (2009) em São Paulo, de Miranda e colaboradores (2007) e Schuenck e colaboradores (2009) no Rio de Janeiro e Souza-Junior e colaboradores (2009) em Natal, observaram resultados semelhantes com predomínio do CC5 e CC8 com diferentes ST em hospitais. Entretanto, Scribel e colaboradores (2009) em hospital de Porto Alegre, observou em infecções hospitalares por MRSA apresentando SCC*mec* tipo IV, similar ao clone OSPC e ST30, já descritos em infecções comunitárias por Ribeiro e colaboradores (2005) e Gelatti e colaboradores (2009) ambos em Porto Alegre.

Amostras de MRSA apresentando as mesmas características foram descritas recentemente por Lamaro-Cardoso e colaboradores (2009) em Goiânia, em crianças frequentadoras de creche onde encontrou MRSA carregando SCC*mec* tipo IV. D'Azevedo e colaboradores (2009) em infecção comunitária resultando em pneumonia necrotizante, encontrou amostra de MRSA com SCC*mec* tipo IV. Entretanto, amostras de MRSA com SCC*mec* tipo IV, similares ao clone OSPC com ST30 e produtoras de PVL, foram

---

---

recentemente descritas em hospitais de Porto Alegre por Scribel e colaboradores (2009).

As amostras com *SCCmec* tipo I, II e III apresentaram CIM >256 µg/ml para oxacilina por Etest® com exceção de apenas uma delas com *SCCmec* tipo II que apresentou CIM igual a 128 µg/ml. Sete das nove amostras com *SCCmec* tipo IV apresentaram CIM ≤48 µg/ml, sugerindo que amostras com menor CIM podem ter a presença do *SCCmec* tipo IV.

Observamos que houve uma diferença entre os resultados das duas metodologias de diluição em ágar e Etest® para vancomicina. Pelo Etest® observamos uma distribuição de CIM de 1,0, 1,5 e 2,0 µg/ml. Porém, por diluição em ágar, apenas duas amostras tiveram CIM igual a 2,0 µg/ml, todas as outras apresentaram valores entre 0,5 e 1,0 µg/ml.

Nossos resultados sugerem que no primeiro episódio de ICS não temos elevação da CIM para vancomicina com a maioria das amostras com CIM menor ou igual a 1,0 µg/ml. A continuidade dos testes de sensibilidade das amostras do Projeto SCOPE Brasil poderiam dar informações relevantes quanto a presença ou não do fenômeno do aumento progressivo das CIMs em nosso meio .

A presente investigação possibilitou caracterizar o perfil molecular de MRSA obtidos de hemoculturas provenientes de quinze centros participantes do projeto SCOPE - Brasil, no período de Junho de 2007 a Julho de 2009. Este estudo adiciona elementos no conhecimento de infecções hospitalares por MRSA no Brasil tais como: (i) a continuidade da predominância de amostras *SCCmec* tipo III; (ii) a ausência de representantes do *SCCmec* tipo V e o surgimento do *SCCmec* tipo II e I além do IV; (iii) a emergência de novos clones,

diferentes do CEB (Nova Iorque/Japão e Pediátrico); (iv) a heterogeneidade na distribuição dos tipos de SCC*mec* entre as regiões brasileiras e (v) a ausência da resistência a vancomicina nas amostras estudadas.

## 7. CONCLUSÕES

- Houve predomínio de amostras de MRSA carreadoras de *SCCmec* tipo III e relacionadas geneticamente ao clone CEB;
- Foram detectadas amostras portando *SCCmec* tipo II e IV relacionados aos clones Nova Iorque/Japão e Pediátrico respectivamente em diferentes hospitais e regiões do país;
- A tipagem molecular por PFGE sugere disseminação clonal interhospitalar de amostras carreando *SCCmec* tipo II e III;
- Apenas uma amostra com *SCCmec* tipo IV não relacionada a nenhum clone foi produtora de PVL;
- Amostras com menor CIM podem ter a presença do *SCCmec* tipo IV;
- Não foram detectadas amostras resistentes à vancomicina;
- Apenas dois ancestrais genéticos comuns (CC5 e CC8) foram observados pela técnica de MLST, sendo caracterizado um novo ST1176.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aires de SM, Crisostomo MI, Sanches IS, Wu JS, Fuzhong J, Tomasz A and de Lencastre H (2003). 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.

Aires de SM, de LH, Santos SI, Kikuchi K, Totsuka K and Tomasz A (2000) Similarity of antibiotic resistance patterns and molecular typing properties of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates widely spread in hospitals in New York City and in a hospital in Tokyo, Japan. *Microb Drug Resis.* 6, 253-258.

Aires de SM, Miragaia M, Sanches IS, Avila S, Adamson I, Casagrande ST, Brandileone MC, Palacio R, Dell'Acqua L, Hortal M, Camou T, Rossi A, Velazquez-Meza ME, Echaniz-Aviles G, Solorzano-Santos F, Heitmann I and de Lencastre H (2001) Three-year assessment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America from 1996 to 1998. *J Clin Microbiol* 39, 2197-2205.

Andrade SS. Epidemiologia molecular de *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina isolados na Argentina, Brasil e Chile no período de 1997 a 2006. Tese de Doutorado - UNIFESP. 2008, 87p.

Bantar C, Famiglietti A and Goldberg M (2000) Three-year surveillance study of nosocomial bacterial resistance in Argentina. The Antimicrobial Committee; and the National Surveillance Program (SIR) Participants Group. *Int J Infect Dis.* 4, 85-90.

Biedenbach DJ, Moet GJ, Jones RN. (2004) Occurrence and antimicrobial resistance pattern comparisons among bloodstream infection isolates from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2002). *Diagn Microbiol Infect Dis.* 50, 59–69.

Boyle-Vavra S and Daum RS. (2007) Community- acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: The role of Panton-Valentine leukocidin. *Lab Invest.* 87, 3-9.

Brumfitt W and Hamilton-Miller J. (1989) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *N Engl J Med.* 320, 1188-1196.

Calfee DP, Durbin LJ, Germanson TP, Toney DM, Smith EB and Farr BM (2003) Spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) among household contacts of individuals with nosocomially acquired MRSA. *Infect Control Hosp Epidemiol* 24, 422-426.

Carnicer-Pont D, Bailey KA, Mason BW, Walker AM, Evans MR and Salmon RL (2006) Risk factors for hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia: a case-control study. *Epidemiol Infect* 134, 1167-1173.

Center for Disease Control and Prevention - CDC. (1999) Four pediatrics deaths from community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Minnesota and North Dakota, 1997-1999. *MMWR*. 48, 407-410.

Center for Disease Control and Prevention – CDC (2002) Morbidity and Mortality Weekly Report: Notice to Readers: CDC's campaign to prevent antimicrobial resistance in health-care settings. April 19.

Chambers HF (1997) Methicillin Resistance in Staphylococci: Molecular and Biochemical Basis and Clinical Implications. *Clin Microbiol Rev*. 781–791.

Chambers HF (2001) The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? *Emerg Infect Dis*. 7, 178–182.

Chambers HF and Sachdeva M (1990) Binding of beta-lactam antibiotics to penicillin-binding proteins in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis*. 161, 1170-1176.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth Informational Supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Approved Standard M100-S19 (2009).

Conterno LO. Avaliação dos aspectos epidemiológicos e evolutivos das bacteremias por *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina. Comparação entre dois períodos: 1991 - 1992 e 1995 - 1996. Tese de Doutorado - UNIFESP. 1999, 110p.

Conterno LO, Wey SB and Castelo A (1998) Risk factors for mortality in *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 19, 32-37.

Cuevas O, Cercenado E, Bouza E, Castellares C, Trincado P, Cabrera R and Vindel A (2007) Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Spain: a multicentre prevalence study (2002). *Clin Microbiol Infect.* 13, 250-256.

d'Azevedo PA, Inoue FM, Andrade SS, Tranchesi R, Pignatari AC (2009) Necrotizing pneumonia due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Rev Soc Bras Med Trop.* 42, 461-2.

de Miranda OP, Silva-Carvalho MC, Ribeiro A, Portela F, Cordeiro RP, Caetano N, Vidal CF and Figueiredo AM (2007) Emergence in Brazil of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates carrying SCCmecIV that are related genetically to the USA800 clone. *Clin Microbiol Infect.* 13, 1165-1172.

Deresinski S (2005) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an evolutionary, epidemiologic and therapeutic odyssey. *Clin Infect Dis.* 40, 562-73.

de Trindade PA, Pacheco RI, Costa SF, Rossi F, Barone AA, Mamizuka EM, Levin AS (2005) Prevalence of SCCmec type IV in nosocomial bloodstream isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 43, 3435-3437.

Diekema DJ, Beekmann SE, Chapin KC, Morel KA, Munson E, Doern GV (2003) Epidemiology and outcome of nosocomial and community-onset bloodstream infection. *J Clin Microbiol* 41, 3655-3660.

Diekema DJ, Pfaller MA, Jones RN (2002) Age-related trends in pathogen frequency and antimicrobial susceptibility of bloodstream isolates in North America. SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-2000. *Int J Antimicrob Agents* 20, 412-418.

Edmond MB, Wallace SE, McClish DK, Pfaller MA, Jones RN, Wenzel RP. (1999) Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: A three-year analysis. *Clin Infect Dis.* 29, 239-244.

Enright MC, Day NPJ, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG (2000) Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 38, 1008-1015.



Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H and Spratt BG (2002) The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 99, 7687-7692.

Feil EJ, Li BC, Aanensen DM, Hanage WP, Spratt BG (2004) eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *J Bacteriol.* 186, 1518-30.

Fey PD, Said-Salim B, Rupp ME, Hinrichs SH, Boxrud DJ, Davis CC, Kreiswirth BN and Schlievert PM (2003) Comparative molecular analysis of community- or hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 47, 196-203.

Frank AL, Marcinak JF, Mangat PD, Schreckenberger PC (1999) Increase in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children. *Clin Infect Dis.* 29, 935–936.

García-Vázquez E, Gómez J, Baños R, Canteras M, Ruiz J, Baños V, Herrero JA and Valdés M (2007) A comparative study of patients with methicillin susceptible versus methicillin resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia: epidemiology and prognostic factors. *Med Clin (Barc)* 128, 681-686.

Gelatti LC, Sukiennik T, Becker AP, Inoue FM, do Carmo MS, Castrucci FM, Pignatari AC, Ribeiro LC, Bonamigo RR, d'Azevedo PA (2009) Sepsis due to community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in southern Brazil *Rev Soc Bras Med Trop.* 42, 458-60.

Gomes AR, Sanches IS, Aires de SM, Castaneda E and de Lencastre H (2001) Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Colombian hospitals: dominance of a single unique multidrug-resistant clone. *Microb Drug Resist.* 7, 23-32.

Gorak EJ, Yamada SM, Brown JD (1999) Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospitalized adults and children without known risk factors. *Clin Infect Dis.* 29, 797–800.

Grundmann H, Hori S and Tanner G (2001) Determining confidence intervals when measuring genetic diversity and the discriminatory ability of typing methods for microorganisms. *J Clin Microbiol.* 39, 4190–4192.

Guilarde AO, Turchi MD, Martelli CM and Primo MG (2006) *Staphylococcus aureus* bacteraemia: incidence, risk factors and predictors for death in a Brazilian teaching hospital. *J Hosp Infect.* 63, 330-336.

Hiramatsu K, Cui L, Kuroda M, Ito T. (2001) The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* 9, 486–493.

Hiramatsu K, Katayama Y, Yuzawa H and Ito T (2002) Molecular genetics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol.* 292, 67-74.

Hussain FM, Boyle-Vavra S, Bethel CD, Daum RS (2000) Current trends in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at a tertiary care pediatric facility. *Pediatr Infect Dis J.* 19, 1163– 1166.

Inoue FM. Infecções da corrente sanguínea por *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina no Hospital São Paulo (2002-2005): fatores de risco e diversidade genética. Tese de Doutorado - UNIFESP. 2008, 87p.

Ito T, Hiramatsu K, Oliveira DC, de Lencastre H, Zhang K, Westh H, O'Brien F, Giffard PM, Coleman D, Tenover FC, Boyle-Vavra S, Skov RL, Enright MC, Kreiswirth B, Ko KS, Grundmann H, Laurent F, Sollid JE, Kearns AM, Goering R, John JF, Daum R, Soderquist B (2009) Classification of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec): guidelines for reporting novel SCCmec elements. *Antimicrob Agents Chemother.* 53, 4961-7.

Ito T, Katayama Y, Asada K, Mori N, Tsutsumimoto K, Tiensasitorn C and Hiramatsu K (2001) 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.

Ito T, Katayama Y and Hiramatsu K (1999) Cloning and nucleotide sequence determination of the entire mec DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. *Antimicrob Agents Chemother.* 43, 1449-1458.

Ito T, Ma XX, Takeuchi F, Okuma K, Yuzawa H and Hiramatsu K (2004) Novel type V staphylococcal cassette chromosome mec driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccrC*. *Antimicrob Agents Chemother.* 48, 2637-2651.

Jolley KA, Feil EJ, Chan MS, Maiden MC (2001) Sequence type analysis and recombinational tests (START). *Bioinformatics.* 17, 1230-1.

Katayama Y, Ito T and Hiramatsu K (2000) A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 44, 1549-1555.

Katayama Y, Ito T and Hiramatsu K (2001) Genetic organization of the chromosome region surrounding *mecA* in clinical staphylococcal strains: role of IS431-mediated *mecI* deletion in expression of resistance in *mecA*-carrying, low-level methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 45, 1955-1963.

Lamaro-Cardoso J, de Lencastre H, Kipnis A, Pimenta FC, Oliveira LS, Oliveira RM, Nouer SS, Aires-de-Sousa M, Milheiriço C, Andrade AL (2009) Molecular epidemiology and risk factors for nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* in infants attending day care centers in Brazil. *J Clin Microbiol.* 47, 3991-7.

Libert M, Elkholti M, Massaut J, Karmali R, Mascart G and Cherifi S (2008) Risk factors for methicillin resistance and outcome of *Staphylococcus aureus* bloodstream infection in a Belgian university hospital. *J Hosp Infect.* 68, 17-24.

Lowy FD. (2003) Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest.* 111, 1265–1273.

Lyon BR and Skurray R (1987) Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*: genetic basis. *Microbiol Rev.* 51, 88-134.

Ma XX, Ito T, Tiensasitorn C, Jamklang M, Chongtrakool P, Boyle-Vavra S, Daum RS and Hiramatsu K (2002) Novel type of staphylococcal cassette chromosome mec identified in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 1147-1152.

McDougal LK, Steward CD, Killgore GE, Chaitram JM, McAllister SK and Tenover FC (2003) Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database. *J Clin Microbiol.* 41, 5113-5120.

Melo MC, Silva-Carvalho MC, Ferreira RL, Coelho LR, Souza RR, Gobbi CN, Rozenbaum R, Solari CA, Ferreira-Carvalho BT and Figueiredo AM (2004) 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.

Milheirico C, Oliveira DC and de Lencastre H (2007) Update to the multiplex PCR strategy for assignment of mec element types in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 51, 3374-3377.

Moet GJ, Jones RN, Biedenbach DJ, Stilwell MG and Fritsche TR (2007) Contemporary causes of skin and soft tissue infections in North America, Latin America, and Europe: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1998-2004). *Diagn Microbiol Infect Dis.* 57, 7-13.

Monteiro J. Avaliação Comparativa de Protocolos Rápidos versus Protocolos Convencionais para Tipagem Molecular de Amostras Clínicas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* pela técnica de *Pulsed Field Gel Electrophoresis*. Tese de Mestrado – UNIFESP, 2005, 98p.

Moran GJ, Mount J (2003) *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin United States, 2002. *Ann Emerg Med.* 41, 148–151.

Moreira M, Medeiros EA, Pignatari AC, Wey SB and Cardo DM (1998) Effect of nosocomial bacteremia caused by oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* on mortality and length of hospitalization *Rev Assoc Med Bras.* 44, 263-268.

Moreno CA, Rosenthal VD, Olarte N, Gomez WV, Sussmann O, Agudelo JG, Rojas C, Osorio L, Linares C, Valderrama A, Mercado PG, Bernate PH, Vergara GR, Pertuz AM, Mojica BE, Navarrete MP, Romero AS and Henriquez D (2006) Device-associated infection rate and mortality in intensive care units of 9 Colombian hospitals: findings of the International Nosocomial Infection Control Consortium. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 27, 349-356.

Murchan S, Kaufmann ME, Deplano A, de Ryck R, Struelens M, Zinn CE, Fussing V, Salmenlinna S, Vuopio-Varkila J, El Solh N, Cuny C, Witte W, Tassios PT, Legakis N, van Lwwuwen W, van Belkum A, Vindel A, Laconcha I, Garaizar J, Haeggman S, Olsson-Liljequist B, Ransjo U, Coombes G and Cookson B (2003) 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.

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

Okuma K, Iwakawa K, Turnidge JD, Grubb WB, Bell JM, O'Brien FG, Coombs GW, Pearman JW, Tenover FC, Kapi M, Tiensasitorn C, Ito T, Hiramatsu K (2002) Dissemination of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in the community. *J Clin Microbiol.* 40, 4289-94.

Oliveira DC, Milheiric C, Lencastre H (2006) Redefining a Structural Variant of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*, SCC*mec* Type VI. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 50, 3457–3459.

Oliveira DC, Tomasz A, de Lencastre H (2002) Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet Infect Dis.* 2, 180-189.

Oliveira GA, Faria JB, Levy CE, Mamizuka EM (2001) Characterization of the Brazilian endemic clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from hospitals throughout Brazil. *Braz J Infect. Dis.* 5, 163-170.

Oztoprak N, Cevik MA, Akinci E, Korkmaz M, Erbay A, Eren SS, Balaban N and Bodur H (2006) Risk factors for ICU-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Am J Infect Control* 34, 1-5.

Pfaller MA, Hollis RJ, Sader HS (1992) Molecular biology - PFGE analysis of chromosomal restriction fragments. In: ISENBERG, H.D. - Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington: ASM Press,. p.10.5.c.1-10.5.c.11.

Projan SJ, Novick RP (1997) The molecular basis of pathogenicity, p. 55–81. In K. B. Crossley and G. L. Archer (ed.), The staphylococci in human disease. Churchill Livingstone, New York, N.Y.

Rezende NA, Blumberg HM, Metzger BS, Larsen NM, Ray SM and McGowan JE, Jr (2002) Risk factors for methicillin-resistance among patients with *Staphylococcus aureus bacteremia* at the time of hospital admission. *Am J Med Sci.* 323, 117-123.

Ribeiro A, Dias C, Silva-Carvalho MC, Berquó L, Ferreira FA, Santos RNS, Ferreira-Carvalho BT, Figueiredo AM (2005) First report of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in South America. *J Clin Microbiol.* 43, 1985-88.

Ribeiro A, Coronado AZ, Silva-Carvalho MC, Ferreira-Carvalho BT, Dias C, Rozenbaum R, Del Peloso PF, da Costa Ferreira LC, Teixeira LA and Figueiredo AM (2007) Detection and characterization of international community-acquired infections by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Rio de Janeiro and Porto Alegre cities causing both community- and hospital-associated diseases. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 59, 339-345.

Roberts RB, Tennenberg AM, Eisner W, Hargrave J, Drusin LM, Yurt R and Kreiswirth BN (1998) Outbreak in a New York City teaching hospital burn center caused by the Iberian epidemic clone of MRSA. *Microb Drug Resist.* 4, 175-183.

Sader HS, Pignatari AC, Hollis RJ, Leme I and Jones RN (1993) Oxacillin- and quinolone-resistant *Staphylococcus aureus* in Sao Paulo, Brazil: a multicenter molecular epidemiology study. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 14, 260-264.

Sader HS, Jones RN and Silva JB (2002a) Skin and soft tissue infections in Latin American medical centers: four-year assessment of the pathogen frequency and antimicrobial susceptibility patterns. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 44, 281-288.

Sader HS, Jones RN, Andrade-Baiocchi S and Biedenbach DJ (2002b) Four-year evaluation of frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility patterns of bacteria from bloodstream infections in Latin American medical centers. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 44, 273-280.

Sader HS, Jones RN, Gales AC, Pfaller MA, Mendes RE, Zoccoli C, Barth A, Jones RN. (2001) Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian Hospitals: Summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *J Infect Dis.* 5, 200-214.

Sader HS, Pignatari AC, Hollis RJ, Jones RN (1994) Evaluation of interhospital spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Sao Paulo, Brazil, using pulsed-field gel electrophoresis of chromosomal DNA. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 15, 320-323.

Sa-Leao R, Santos Sanches I, Dias D, Peres I, Barros RM and de Lencastre H (1999) Detection of an archaic clone of *Staphylococcus aureus* with low-level resistance to methicillin in a pediatric hospital in Portugal and in international samples: relics of a formerly widely disseminated strain? *J Clin Microbiol* 37, 1913-1920.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a Laboratory Manual*, 2<sup>nd</sup> ed., Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sanches IS, Aires de SM, Sobral L, Calheiros I, Felicio L, Pedra I and de Lencastre H (1995) Multidrug-resistant Iberian epidemic clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* endemic in a hospital in northern Portugal. *Microb Drug Resist.* 1, 299-306.

Schuenck RP, Nouér SA, Winter Cde O, Cavalcante FS, Scotti TD, Ferreira AL, Giambiagi-de Marval M, dos Santos KR (2009) Polyclonal presence of non-multiresistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates carrying SCCmec IV in health care-associated infections in a hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 64, 434-41.

Scribel LV, Silva-Carvalho MC, Souza RR, Superti SV, Kvitko CH, Figueiredo AM, Zavascki AP (2009) Clinical and molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying SCCmec IV in a university hospital in Porto Alegre, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 65457-61.

Sharma VK, Hackbarth CJ, Dickinson TM and Archer GL (1998) Interaction of native and mutant Mecl repressors with sequences that regulate mecA, the gene encoding penicillin binding protein 2a in methicillin-resistant staphylococci. *J Bacteriol.* 180, 2160-2166.

Sola C, Gribaudo G, Vindel A, Patrino L and Bocco JL (2002) Identification of a novel methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* epidemic clone in Cordoba, Argentina, involved in nosocomial infections. *J Clin Microbio.* 40, 1427-1435.

Sousa-Junior FC, Silva-Carvalho MC, Fernandes MJ, Vieira MF, Pellegrino FL, Figueiredo AM, de Melo MC, Milan EP (2009) Genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates obtained in the Northeast region of Brazil. *Braz J Med Biol Res.* 42, 877-81.

Teixeira LA, Resende CA, Ormonde LR, Rosenbaum R, Figueiredo AM, de Lencastre H, Tomasz A. (1995) Geographic spread of epidemic multiresistant *Staphylococcus aureus* clone in Brazil. *J Clin Microbiol.* 33, 2400-2404.

Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH and Swaminathan B (1995) Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 33, 2233-2239.

Trindade PA. Caracterização molecular da resistência a oxacilina em isolados de *Staphylococcus aureus* hospitalares e comunitárias. Tese de Mestrado. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo; 2005, 76p.

van Soolingen D, Hermans PW, de Haas PE, Soll DR, van Embden JD (1991) Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 29, 2578-86.



Vidal PM. Fatores associados à infecção de corrente sanguínea por *Staphylococcus aureus* portador de SCCmec tipo IV. Tese de Mestrado - FM USP. 2007, 80p.

Vidal PM, Trindade PA, Garcia TO, Pacheco RL, Costa SF, Reinert C, Hiramatsu K, Mamizuka EM, Garcia CP, Levin AS (2009) Differences between "classical" risk factors for infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and risk factors for nosocomial bloodstream infections caused by multiple clones of the staphylococcal cassette chromosome mec type IV MRSA strain. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 30,139-45.

Wang FD, Chen YY, Chen TL and Liu CY (2008) Risk factors and mortality in patients with nosocomial *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Am J Infect Control.* 36, 118-122.

Wenzel RP, Edmond MB. (2001) The impact of hospital-acquired bloodstream infections. *Emerg Infect Dis.* 7, 174-177.

Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP and Edmond MB (2004) Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis.* 39, 309-317.

Wu SW, de Lencastre H, Tomasz A (2001) Recruitment of the mecA gene homologue of *Staphylococcus sciuri* into a resistance determinant and expression of the resistant phenotype in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 183, 2417–2424.

Zhang K, McClure JA, Elsayed S, Louie T and Conly JM (2005) Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome mec types I to V in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 43, 5026-5033.

---

---

## RESUMO

**Objetivo geral:** Caracterização fenotípica e genotípica de *S. aureus* resistentes a oxacilina (MRSA), coletados de hemoculturas provenientes de diversos centros participantes do projeto SCOPE - Brasil, no período de Junho de 2007 a Julho de 2009. **Objetivos específicos:** (i) avaliar a distribuição dos tipos de SCC*mec* através das técnicas de PCR convencional e PCR multiplex das diferentes instituições participantes; (ii) detectar a possível presença do gene *lukF* codificador da toxina PVL (Panton Valentine Leukocidin); (iii) avaliar a similaridade genética das amostras utilizando as técnicas de PFGE e MLST e (iv) determinar as concentrações inibitórias mínimas à oxacilina e vancomicina. **Material e Métodos:** Foram avaliados 62 isolados de MRSA provenientes do primeiro episódio de infecção de corrente sanguínea (ICS) de pacientes hospitalizados em 11 centros médicos de diferentes regiões do país. Os isolados resistentes a oxacilina foram submetidos a PCR convencional para a detecção do gene *nuc* e *lukF* e PCR multiplex para identificar os tipos de SCC*mec*. Foi feita diluição em ágar e Etest® para vancomicina, PFGE e MLST. **Resultados:** Do total de 62 amostras, 29 amplificaram para o SCC*mec* tipo III, 16 amplificaram para o SCC*mec* tipo II, 9 amostras amplificaram para o SCC*mec* tipo IV, 6 amplificaram para SCC*mec* tipo I e 2 amostras não foram identificadas pelas metodologias de PCR multiplex utilizadas. A amostra com SCC*mec* subtipo IVc apresentou o gene que codifica PVL. As amostras com SCC*mec* tipo I, II e III apresentaram CIM >256 µg/ml para oxacilina por Etest® com exceção de uma delas com SCC*mec* tipo II com CIM igual a 128 µg/ml. Seis amostras do total de nove com SCC*mec* tipo IV apresentaram CIM ≤48 µg/ml. Observamos CIMs de 1,0, 1,5 e 2,0 µg/ml para vancomicina por Etest®. Quando feito a diluição em ágar, duas amostras tiveram CIM igual a 2,0 µg/ml, todas as outras apresentaram valores entre 0,5 e 1,0 µg/ml. Dentre as 8 amostras de MRSA que foram submetidas à técnica de MLST, verificou-se ST105 em amostras com SCC*mec* tipo I; ST5 e ST105 para amostras com SCC*mec* tipo II; ST239 para amostras carregando SCC*mec* tipo III e ST5 e ST1176 relacionados a amostras apresentando SCC*mec* tipo IV. **Conclusões:** Houve predomínio de amostras de MRSA carreadoras de SCC*mec* tipo III e relacionadas geneticamente ao clone CEB. Foram detectadas amostras portando SCC*mec* tipo II e IV relacionados aos clones Nova Iorque/Japão e Pediátrico em diferentes hospitais e regiões do país e ausência do clone Chile/Córdoba. Apenas uma amostra com SCC*mec* tipo IV (subtipo IVc) não relacionada a nenhum clone foi produtora de PVL. Apenas dois ancestrais genéticos comuns (CC5 e CC8) nas amostras estudadas foram observados pela técnica de MLST, sendo caracterizado um novo ST1176. Não foram detectadas amostras resistentes à vancomicina.

**ABSTRACT**

**General objective:** Phenotypic and genotypic characterization of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) collected from bloodcultures from several centers participants of Brazilian SCOPE Project, from June 2007 to July 2009. **Specific Objectives:** (i) to assess the different types of SCC*mec* distribution through conventional and multiplex PCR for the different participant institutions; (ii) to detect the possible presence of *lukF* gene, which codes for PVL toxin (Panton Valentine Leukocidin); (iii) to assess the genetic similarity of these samples through PFGE and MLST and (iv) to determine the oxacillin and vancomycin minimal inhibitory concentration (MIC). **Material and Methods:** Sixty two MRSA isolated from the first episode of bloodstream infection (BSI) were evaluated. These samples came from patients hospitalized at the 11 medical centers from different regions of the country. The oxacillin-resistant isolated were submitted to conventional PCR to detect *nuc* and *lukF* genes and to multiplex PCR to identify SCC*mec* types. Agar dilution and E-test for vancomycin were performed. The strains were molecular typed by PFGE and MLST. **Results:** From the total of 62 samples, 29 amplified SCC*mec* type III, 16 SCC*mec* type II, 9 SCC*mec* type IV, 6 SCC*mec* type I and 2 could not be identified. A sample with SCC*mec* subtype IVc carried the gene which codifies for PVL. Samples with SCC*mec* types I, II and III showed MIC > 256 µg/ml for oxalycin by Etest®. Just one of them, with SCC*mec* type II, presented MIC = 128 µg/ml. From the nine samples with SCC*mec* type IV, six presented MIC ≤ 48 µg/ml. MICs of 1.0, 1.5 e 2.0 µg/ml were also observed for vancomycin by Etest®. Regarding the agar dilution, two samples presented MICs of 2.0 µg/ml and all the others showed values between 0.5 e 1.0 µg/ml. From the 8 MRSA samples typed by MLST, it was observed ST105 in a sample with SCC*mec* type I; ST5 and ST105 in samples with SCC*mec* type II, ST239 with SCC*mec* type III and ST5 and ST1176 with SCC*mec* type IV. **Conclusion:** The majority of samples were MRSA carrying SCC*mec* type III and genetically related to CEB clone. Also were detected samples SCC*mec* type II and IV, related to New York/Japan and Pediatric clones in different hospitals at different regions of the country. Only one sample SCC*mec* type IV (subtype IVc) not related to any clone was positive for PVL. Only two common genetic ancestral (CC5 and CC8) were observed through MLST and a new ST1176 was characterized. No vancomycin-resistant isolate was detected.

## 9. ANEXOS

### 9.1. Ficha clínica

Número do Hospital \_\_\_\_\_ Idade \_\_\_\_\_ Sexo:  M  F N°Prontuario \_\_\_\_\_ RGLab \_\_\_\_\_

Data da admissão: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Data da 1ª hemocultura positiva \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Condições na alta:  Alta  Óbito

Diagnóstico primário: <input type="checkbox"/> Neoplasia/Leucemia/linfoma <input type="checkbox"/> Cardíaco <input type="checkbox"/> Renal <input type="checkbox"/> Hepático <input type="checkbox"/> Neurológico <input type="checkbox"/> Diabetes mellitus <input type="checkbox"/> Transplante <input type="checkbox"/> sólido <input type="checkbox"/> MO <input type="checkbox"/> Pulmonar <input type="checkbox"/> Vascular <input type="checkbox"/> Gastrointestinal <input type="checkbox"/> Trauma <input type="checkbox"/> Outro Nome do órgão _____	Unidade de internação <input type="checkbox"/> Cirurgia geral <input type="checkbox"/> Cirurgia cardíaco-torácica <input type="checkbox"/> Clínica Médica <input type="checkbox"/> Hematologia adulto/oncologia <input type="checkbox"/> Neurocirurgia <input type="checkbox"/> Obstetrícia <input type="checkbox"/> Ginecologia <input type="checkbox"/> Oftalmo/Otorrino/Cab.pescoco <input type="checkbox"/> Ortopedia <input type="checkbox"/> Pediatria <input type="checkbox"/> Ped. Hematologia/oncologia <input type="checkbox"/> Psiquiatria	Fatores risco (com 48hrs): <input type="checkbox"/> Cateter periférico <input type="checkbox"/> Cateter venoso central <input type="checkbox"/> NPP <input type="checkbox"/> Acesso arterial <input type="checkbox"/> PIC (neuro) <input type="checkbox"/> Cateter vesical <input type="checkbox"/> Hemodiálise <input type="checkbox"/> Diálise peritoneal <input type="checkbox"/> Ventilação mecânica <input type="checkbox"/> N° neutrófilos < 1,000	Fonte da bacteremia: <input type="checkbox"/> Desconhecida <input type="checkbox"/> Queimadura <input type="checkbox"/> Ouvido, nariz, garganta <input type="checkbox"/> Gastrointestinal <input type="checkbox"/> Ginecológico <input type="checkbox"/> Primária (acesso central) <input type="checkbox"/> Trato resp. inferior <input type="checkbox"/> Pele <input type="checkbox"/> Trato urinário <input type="checkbox"/> Ferida cirúrgica <input type="checkbox"/> Ferida, outra
UTI <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N	<input type="checkbox"/> Urologia <input type="checkbox"/> Outro	<input type="checkbox"/> Outro (liste) _____	<input type="checkbox"/> Outro (liste) _____

#### DADOS MICROBIOLÓGICOS

Identificação do organismo\*

- 1- \_\_\_\_\_  
 2- \_\_\_\_\_  
 3- \_\_\_\_\_

#### Resultados do antibiograma \*

Antimicrobianos	Antimicrobianos	Org. # 1	Org. # 2	Org # 3
Penicilinas	Ampicilina			
	Oxacilina			
	Penicilina			
β-lactam/inibidores de β-Lactamase	Ampicilina/Sulbactam			
	Piperacilina/Tazobactam			
	Ticarcilina/Clavulanato			
Cefalosporinas	Cefalotina/ Cefazolina			
	Cefuroxime			
	Cefoxitina			
	Cefotetan			
	Cefotaxime			
	Ceftriaxone			
	Cefoperazone			
	Ceftazidime			
Outros β - lactams	Cefepime			
	Aztreonam			
	Imipinem			
Aminoglicosídeos	meropenem			
	Ertapenem			
	Amicacina			
Fluoroquinolonas	Gentamicina			
	Tobramicina			
	Ciprofloxacina			
	Ofloxacina			
Drogas com espectro para Gram (+)	Moxifloxacina			
	Levofloxacina			
	Clindamicina			
	Eritromicina			
	Teicoplanina			
	Vancomicina			
Outras drogas	Quinupristin/Dalfopristin			
	Linezolid			
	Daptomicina			
	Rifampicina			
	Trim./Sulfa			

\* O nome dos isolados clínicos e o perfil de sensibilidade deve ser preenchido antes do transporte da cepa. A sensibilidade antimicrobiana deve ser listada pela categoria (S, I, R) de acordo com o CLSI.

**Anexo 1: Ficha SCOPE enviada pelos centros para cada amostra clínica.**

## 9.2. Produção científica

### 9.2.1. Trabalho aceito em congresso

O presente resultado do estudo foi aceito e apresentado no 48th Annual ICAAC/46th IDSA Annual Meeting que se realizou dias 25 a 28 de outubro de 2008 em Washington DC.

Segue abaixo o resumo enviado.

#### ***Staphylococcus aureus* SCCmec diversity in São Paulo (Brazil): Results from the Brazillian SCOPE Surveillance Program**

Paschoal, L.; Carmo-Rodrigues, M. S.; Inoue, F. M.; Andrade, S. S.; Marra, A.; Pignatari, A. C. C.

Federal University of São Paulo - UNIFESP, São Paulo, Brazil

**Background:** The Brazilian Epidemic Clone (BEC) of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is rightly endemic at Brazilian hospitals. The Brazillian SCOPE Surveillance Program is the first program that evaluates the epidemiology, frequency and susceptibility patterns of the pathogen isolated from nosocomial bloodstream infections in Brazil. The objective of this study was to characterize the genetic diversity of MRSA isolates at the city of São Paulo.

**Methods:** Fourteen MRSA isolates from patients at São Paulo hospitals, from June to October 2007 were studied by molecular analysis using SCCmec typing and Pantón-Valentine Leukocidin (PVL) gene detection, pulsed field gel electrophoresis (PFGE), multilocus sequence typing (MLST) and susceptibility test by disk diffusion.

**Results:** We detected 7 MRSA isolates classified as SCCmec type II. All MRSA isolates were PVL negative. DNA chromosomal analysis by PFGE showed that

4 of them were 100% similar to New York/Japan clone, and the other 3 isolates samples showed 95.2%, 83.8% e 82.1% of similarity. The last 7 MRSA isolates, 3 were classified as type IVa and only 4 (28.6%) were type III (BEC). The genetic sample that was 100% similar with New York/Japan clone was analyzed by MLST and were ST 105. The 11 isolates SCC*mec* type II and III were resistant to fluoroquinolones and clindamycin and susceptible to vancomycin, linezolid, gentamicin, rifampicin and trimethoprin/sulfamethoxazole. All the others SCC*mec* type IVa were susceptibility for all the antimicrobials tested by disk diffusion.

**Conclusions:** This is the first report of a MRSA harboring the SCC*mec* type II in the city of São Paulo, showing the introduction of a new variant in this region. Overall, we observed a decrease in the prevalence of the BEC clone, the most prevalent clone in this geographic area.

# 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](#)