

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”

EVELYN SATIE TOMITA

**Diversidade genética em *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina em
isolados de pacientes pediátricos do Hospital das Clínicas de Botucatu**

Botucatu – SP

2011

EVELYN SATIE TOMITA

**Diversidade genética em *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina em
isolados de pacientes pediátricos do Hospital das Clínicas de Botucatu**

Monografia apresentada junto ao curso de Ciência Biomédicas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus Botucatu, como requisito para obtenção de título de Bacharel.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Campos Pignatari

Co-orientadora: Profa. Dra. Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha

Botucatu – SP

2011

SUMÁRIO

ÍNDICE DE TABELAS	3
ÍNDICE DE FIGURAS	4
1. RESUMO	5
2. INTRODUÇÃO	6
3. OBJETIVOS	15
4. MATERIAIS E MÉTODOS	16
4.1. Amostras	16
4.2. Identificação de <i>Staphylococcus aureus</i>	16
4.3. Detecção do gene <i>mecA</i> de resistência à meticilina	16
4.3.1. Extração do ácido nucleico	16
4.3.2. Amplificação do ácido nucleico (PCR)	17
4.3.3. Visualização dos produtos amplificados	18
4.4. PCR multiplex para a determinação do tipo de SCC <i>mec</i>	18
4.5. Detecção da produção de PVL (Panton Valentine Leukocidin)	20
4.6. Análise do DNA cromossômico	20
5. RESULTADOS	23
5.1. Identificação das amostras	23
5.2. Caracterização genética das amostras	23
5.3. Detecção do gene <i>lukF</i>	26
5.4. Tipagem Molecular	26
6. DISCUSSÃO	29
7. CONCLUSÕES	32
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Classificação dos tipos de SCCmec identificados em cepas de <i>S. aureus</i>	12
Tabela 2: Oligonucleotídeos para a detecção do gene <i>mecA</i>	17
Tabela 3. Seqüência dos <i>primers</i> utilizados para PCR multiplex para a determinação dos tipos de SCCmec, segundo Milheiriço e colaboradores (2007)	19
Tabela 4. Distribuição das amostras nos diferentes materiais clínicos	23
Tabela 5. Distribuição das amostras MRSA e dos tipos de SCCmec encontrados nos diferentes materiais clínicos	25

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Gel de eletroforese para detecção do gene *mecA* (533 pb) nas amostras de *S. aureus* segundo protocolo de Murakami et al., 1991. Amostras positivas: 3, 12 e 14; c+ (controle positivo); c- (controle negativo); λ (peso molecular 100 bp).....24
- Figura 2.** Gel de eletroforese de PCR multiplex segundo protocolo de Milheiro et al (2007). Da esquerda para a direita, λ (peso molecular 100 bp), controles de SCCmec I a IV. Amostras negativas: 1 e 3. Amostras SCCmec III: 5, 9 e 11. Amostras SCCmec IV: 2, 4, 6, 7, 8, 10, 12, 13, 14, 1524
- Figura 3.** Gráfico da distribuição das amostras de *S.aureus* sensíveis à meticilina (MSSA) e MRSA analisadas de acordo com o tipo de SCCmec encontrado nos diferentes períodos25
- Figura 4.** Detecção do gene *lukF*, codificador da toxina PVL, pelo protocolo de Ribeiro et al. (2005). Amostras positivas: 3 e 4; c+ (controle positivo: USA 300); c- (controle negativo: USA 100); λ (peso molecular 100bp).....26
- Figura 5.** Dendrograma de similaridade entre os isolados de MRSA de SCCmec tipo III de acordo com o padrão de PFGE, construído pelo método de agrupamento UPGMA, baseado no coeficiente de Dice.27
- Figura 6.** Dendrograma de similaridade entre os isolados de MRSA de SCCmec tipo III de acordo com o padrão de PFGE, construído pelo método de agrupamento UPGMA, baseado no coeficiente de Dice28

1. RESUMO

Staphylococcus aureus é um patógeno ubíquo capaz de causar uma variedade de infecções em humanos. A resistência desse microrganismo a antibióticos como oxacilina e meticilina é um problema sério, de crescimento significativo para a terapêutica antimicrobiana clínica em pacientes acometidos por infecções estafilocócicas. A resistência à meticilina em *S. aureus* é decorrente da alteração do sítio de ação dos antibióticos β -lactâmicos, os quais agem através da inibição de enzimas que catalisam a síntese da parede celular. Essas enzimas são o sítio de ação das penicilinas, e por isso, passaram a ser chamadas de proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs). O gene *mecA* codifica a PBP2a, que substitui a função das outras PBPs neste patógeno e confere resistência a β -lactâmicos. A PBP2a exibe uma afinidade reduzida pelo anel β -lactâmico e permite que a bactéria continue a sintetizar a parede bacteriana. Este gene faz parte de um elemento genético móvel encontrado em isolados de MRSA, designado cassete cromossômico estafilocócico *mec* (SCC*mec*), integrado ao cromossomo de *S. aureus*. O objetivo do estudo foi a caracterização molecular de 139 isolados de *S. aureus* provenientes de pacientes pediátricos com bacteremia durante o período de 1991 a 2010. Métodos moleculares foram utilizados para a determinação do perfil genético das amostras, incluindo, identificação do tipo de SCC*mec*, detecção do gene codificador de leucocidina de panton valentine (PVL) e similaridade clonal em gel de eletroforese em campo pulsado (PFGE). O gene *mecA* foi detectado em 32 (23%) amostras e houve predomínio do SCC*mec* IV (68,8%) em relação ao SCC*mec* III (31,2%). A presença de PVL foi encontrada em 18 amostras (12,9%), todas sensíveis à oxacilina. O clone epidêmico brasileiro, relacionado ao SCC*mec* tipo III, esteve presente na unidade neonatal do hospital. Porém, observou-se a diminuição da incidência desse clone com o passar dos anos e a emergência de outros clones no HC-FMB.

2. INTRODUÇÃO

Staphylococcus aureus é um patógeno humano capaz de causar variedade de infecções sérias como pneumonia, bacteremias, endocardite, meningite e osteomielite, além de intoxicações, como intoxicação alimentar pela liberação de enterotoxinas nos alimentos, síndrome da pele escaldada, e síndrome do choque tóxico pela liberação de superantígenos na corrente sanguínea (Lowy D., 1998, Deurenberg & Stobberingh, 2008, Takei et al., 2010).

Trata-se da principal espécie do grupo coagulase-positiva, do gênero *Staphylococcus* e, apesar de ter o trato nasofaríngeo como reservatório primário, pode ser encontrado também na pele de humanos e no trato intestinal (Kluytmans et al., 1997, Takei et al., 2010).

Contudo, *Staphylococcus aureus* não parece estar relacionado a sérias infecções em hospedeiros saudáveis com a imunidade normal. No entanto, causa infecções severas em hospedeiros que apresentam a imunidade comprometida, tais como idosos ou crianças prematuras, e indivíduos que frequentemente necessitam de assistência médica (Matsumura et al., 1999, Deresinski, 2005).

Infecções nosocomiais são a principal causa de morbidade e mortalidade em unidades de terapia intensiva pediátrica (UTIP) e unidades de terapia intensiva neonatal (UTIN). Crianças recém-nascidas com o sistema imune imaturo que são tratadas e monitoradas em unidades de terapia intensiva são mais suscetíveis a infecções por microorganismos (Takei et al., 2010).

Staphylococcus aureus é considerado uma das principais causas de infecções de corrente sanguínea em hospitais (Marshall et al., 1998). O sistema nacional de notificação de infecções hospitalares dos Estados Unidos (“National Nosocomial Infections Surveillance System” - NNIS) considerou esse microrganismo a causa mais comum de infecções hospitalares relatada entre 1992 e 2004 (NNIS, 2004).

A rota de infecções nosocomiais inclui infecções endógenas causadas por microrganismos que habitam a faringe, cavidade nasal e pele do paciente; e infecções exógenas de outros pacientes e médicos, ou via equipamento médico. Em particular, infecções exógenas, as principais causas de infecções nosocomiais, são causadas por contato direto com as mãos dos médicos (Lowy D., 1998, Kitamoto et al., 2005).

O carreamento de *S. aureus* é importante uma vez que a maioria das infecções por *S. aureus* ocorrem em pessoas que foram previamente colonizadas com esse microorganismo e podem atuar como vetores, espalhando *S. aureus* e *S. aureus* meticilina/oxacilina resistente (MRSA/ORSA) para os ambientes hospitalar e comunitário (Cardoso-Lamaro et al., 2009, Lowy D., 1998, Gardella et al., 2011).

A leucocidina de Panton Valentine (PVL) é uma leucotoxina presente em estafilococos, que foi primeiramente descrita em 1932 (Panton & Valentine, 1932). Essa toxina é codificada pelos genes *lukS-PV* e *lukF-PV*, que são transmitidos por um fago denominado ϕ PVL. Os produtos desses genes levam à formação de poros citolíticos com atividade especificamente direcionada às membranas celulares de neutrófilos polimorfonucleares e monócitos e/ou macrófagos (Kaneko & Kamio, 2004).

O papel da PVL em infecções por MRSA não está totalmente esclarecido, mas tem sido proposto que a produção dessa exotoxina contribui para maior virulência em algumas cepas comunitárias de MRSA, além de estar relacionada à maior duração, amplitude de invasão e mortalidade em pacientes pediátricos com osteomielite e artrite séptica (Dohin et al., 2007).

A resistência à penicilina começou na década de 40, dois anos após sua introdução na prática clínica, a princípio nos hospitais e depois na comunidade (Chambers, 2001). Em 1948, mais de 50% das amostras de *S. aureus* do ambiente hospitalar eram resistentes à penicilina

(Barber e Rozwadowska-Dowzenko, 1948). Esta proporção subsequentemente cresceu para cerca de 80 a 90% (CDC, 2005).

A resistência à meticilina foi identificada um ano após sua introdução na década de 60 e se conduziu da mesma forma que a resistência à penicilina, inicialmente presente somente no ambiente hospitalar, e mais tarde se tornando prevalente no ambiente comunitário. Atualmente, a transmissão cruzada entre pacientes e profissionais de saúde tem sido um grande problema no controle de infecções relacionadas à saúde (IRAS) (Ipsen and Gahrn-Hansen, 1988; Kayser, 1975; Moreno et al., 1995; Chambers 2001).

Quando a resistência foi primeiro descrita em 1961, a meticilina era utilizada para tratar as infecções causadas por *S. aureus*. Entretanto, no início de 1990 a oxacilina, pertencente à mesma classe de antimicrobianos, foi selecionada como agente de escolha para tratamento e testes de sensibilidade, sendo a sigla MRSA (*Staphylococcus aureus* meticilina-resistente) ainda utilizada para descrever a resistência devido ao seu papel histórico (CDC, 2005).

Desde o surgimento da primeira espécie clínica no começo da década de 60, cepas de MRSA espalharam-se globalmente, tornando-se o patógeno mais importante de infecções nosocomiais (Pinho et al., 2001).

Vários relatos demonstraram 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).

Em 1974, infecções por MRSA representavam 2% do número total de infecções por *Staphylococcus aureus* em unidades de terapia intensiva (UTIs) dos Estados Unidos. Em 1995 esse número subiu para 22%; em 2004, para 64%. O Centro de Controle e Prevenção de Doenças (Centers for Disease Control and Prevention – CDC) estimou que 94.360 infecções

invasivas por MRSA ocorreram nos EUA em 2005, sendo que 18.650 dessas foram associadas a óbito (CDC, 2010).

Os fatores de risco identificados para colonização e infecção por MRSA incluem: hospitalização recente; residência por um longo prazo em uma unidade de reabilitação aguda; utilização de cateter venoso central ou urinário; feridas cirúrgicas; doença hepática crônica, pulmonar, ou vascular; exposição recente a antibióticos (quinolonas, glicopeptídeos e cefalosporinas); uso de drogas injetáveis; admissão em unidade de terapia intensiva (UTI); e exposição a um paciente com qualquer um desses fatores de risco para MRSA (Guilarde et al., 2006; Thompson et al., 1982; Gardella et al., 2011).

Um estudo realizado com 100 amostras de *S. aureus* do Hospital das Clínicas (HC) da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) avaliou a resistência à oxacilina nesse patógeno (Pereira et al., 2009). O gene *mecA* foi detectado em 18% (N=18) dos isolados de pacientes da UTI neonatal (UTIN) e da UTI pediátrica (UTIP) entre 1991 e 2007, taxa menor do que as reportadas em outros estudos, especialmente em grandes hospitais e hospitais universitários (Conterno et al., 1998, Takei et al., 2010). Os níveis de prevalência de MRSA podem variar, principalmente em função do tamanho e do tipo de instituição médica.

O mecanismo de resistência à meticilina foi descoberto em 1981 com a identificação das proteínas ligadoras de penicilina (PBPs) de baixa afinidade em MRSA (Hartman & Tomasz, 1981).

As PBPs estão envolvidas na montagem da parede celular bacteriana (Pinho et al., 2001). Essas enzimas catalisam a etapa final da síntese da parede celular, a reação de transpeptidação necessária para a união das cadeias de peptideoglicano, constituintes da parede celular bacteriana (Chambers and Sachdeva, 1990). A estratégia de resistência aos β -lactâmicos em MRSA inclui a adição de uma nova e adquirida PBP, denominada PBP2a (ou PBP2') ao complemento de quatro PBPs estafilocócicas nativas (Pinho et al., 2001). Esta

nova enzima substitui a função das demais PBPs neste patógeno, permitindo que o microrganismo sobreviva no ambiente com antimicrobianos β -lactâmicos (Chambers, 1997).

O componente genético central do mecanismo de resistência nessas bactérias é o gene *mecA*, que codifica a PBP2a, uma enzima de 78 kDa que retém efetiva atividade da transpeptidase enquanto apresenta afinidade reduzida à penicilina e outros antibióticos β -lactâmicos disponíveis (Pinho et al., 2001, Deresinski, 2005).

O complexo móvel do gene *mecA* compreende o gene *mecA* propriamente dito, e seus genes regulatórios, *mecI* e *mecR1*, e reside numa ilha genômica, o cassete cromossômico estafilocócico *mec* (SCC*mec*) que constitui 1%-2% dos ~ 2,9 milhões de pares de base do cromossomo de *S.aureus* (Katayama et al., 2000).

O gene *mecI* reprime a transcrição dos genes *mecA* e *mecR1* na ausência de um antibiótico β -lactâmico. Contudo, na presença de um β -lactâmico, *MecR1* é clivado, e o domínio da metaloprotease, que está localizado na parte citoplasmática de *MecR1*, torna-se ativo. Esta metaloprotease cliva o *MecI*, que, por sua vez, está ligado à região operadora do *mecA* permitindo a transcrição do gene *mecA* (Deurenberg & Stobberingh, 2008; Zhang et al., 2001; Archer et al., 2001).

O SCC*mec* é composto ainda, do complexo do gene *ccr* (*cassete chromosome recombinase*), que codifica recombinases responsáveis pela mobilidade do SCC*mec*. Há ainda uma região denominada J (de “junkyard”), que compõe o restante do material genético do complexo SCC*mec*. Esta região possui genes que codificam resistência a agentes antimicrobianos não β -lactâmicos e metais pesados, e é importante na classificação dos subtipos de SCC*mec* (Hiramatsu et al., 2001).

O complexo *ccr* é composto pelos genes *ccrA* e *ccrB*, duas ORFs (“open reading frames”) localizadas no complexo SCC*mec*, responsáveis pela codificação de polipeptídeos

que têm como função a excisão e integração do *SCCmec* no cromossomo estafilocócico (Katayama et al., 2000).

Atualmente são conhecidos onze diferentes tipos de *SCCmec* que são definidos pela combinação do tipo de complexo do gene *ccr* e a classe do complexo do gene *mec* (Shore et al., 2011; IWG-SCC, 2011) (Tabela 1). Muitas estruturas diferentes, incluindo sequências de inserção e transposons, foram identificadas na maioria dos tipos de *SCCmec* em regiões diferentes do complexo do gene *mec* e do complexo do gene *ccr*, ou seja, na região J. Cada tipo de *SCCmec* foi portanto, posteriormente classificado em subtipos baseados nos polimorfismos ou variações na região J, com a mesma combinação do complexo do gene *mec* e complexo do gene *ccr*. (IWG-SCC, 2009).

Tabela 1. Classificação dos tipos de SCCmec identificados em cepas de *S. aureus*.

Tipos de SCCmec	Complexo do gene <i>ccr</i>	Complexo do gene <i>mec</i>	Cepas
I	1 (A1B1)*	B	NCTC10442, COL
II	2 (A2B2)	A	N315, Mu50, Mu3, MRSA252, JH1, JH9
III	3 (A3B3)	A	85/2082
IV	2 (A2B2)	B	CA05, MW2, 8/6-3P, 81/108, 2314, cm11, JCSC4469, M03-68, E-MRSA-15, JCSC6668, JCSC6670
V	5 (C1)	C2	WIS(WBG8318), TSGH17, PM1
VI	4 (A4B4)	B	HDE288
VII	5 (C1)	C1	JCSC6082
VIII	4 (A4B4)	A	C10682, BK20781
IX	1 (A1B1)	C2	JCSC6943
X	7 (A1B6)	C1	JCSC6945
XI	8 (A1B3)	E	LGA251

Fonte: International Working Group on the Staphylococcal Cassette Chromosome elements (IWG- SCC) Disponível em http://www.sccmec.org/Pages/SCC_TypesEN.html. Acesso em: 20/07/2011.

Os SCCmec dos tipos I, IV, V, VI, VII e VIII geralmente contêm somente recombinases e genes estruturais e regulatórios para resistência à metilina (Deurenberg & Stobberingh, 2008). Por outro lado, os tipos II, III, IX, X, XI possuem elementos de transposição e genes codificadores de resistência aos antimicrobianos não β -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, Li et al., 2011, Shore et al., 2011).

São descritos cinco clones principais de MRSA disseminados internacionalmente, denominados “clones epidêmicos”. Estes clones possuem a capacidade de se disseminar e causar infecções em regiões geográficas distintas, até mesmo entre continentes. A classificação dos clones foi feita de acordo com a característica epidemiológica ou o local onde cada um deles foi inicialmente descrito. São eles: Ibérico, Brasileiro, Húngaro, Nova Iorque/Japão e pediátrico (Oliveira et al., 2002; Roberts et al., 1998; Sa-Leao et al., 1999; Aires de et al., 2003; 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 e Europa (Gomes et al., 2001; Aires de et al., 2001). No Brasil, este clone pôde ser identificado em diferentes hospitais, de todas as regiões do país, frequentemente associado a surtos epidêmicos (Oliveira et al., 2001; Teixeira et al., 1995).

Um estudo realizado com amostras de MRSA coletadas no período de 1995 a 1997, provenientes de 19 cidades brasileiras demonstrou a predominância do CEB no Brasil (Oliveira et al., 2001). A maioria dos 83 isolados selecionados para tipagem molecular (80,3%) apresentou padrão idêntico ao clone brasileiro de MRSA. Aires de Souza, em 2001, publicou um estudo envolvendo seis hospitais no Estado de São Paulo, de onde foram coletados 162 isolados de MRSA entre 1996 e 1998, e verificou que 97% deles eram relacionados ao CEB (Aires de et al., 2001).

Outro estudo, realizado no complexo do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo alguns anos depois, identificou quatro padrões de PFGE (“pulsed field gel electrophoresis”) dentre 151 isolados de MRSA obtidos de hemoculturas no período de 2002 a 2003. Foi observado, além de uma linhagem predominante relacionada ao CEB (SCC*mec* IIIa), um perfil distinto contendo SCC*mec* IV em um número expressivo, sugerindo uma

linhagem emergente de MRSA (de Trindade et al., 2005; Trindade, 2005). O caráter intra-hospitalar dessas amostras e a ausência da produção de PVL sugerem que sejam relacionadas ao clone pediátrico (Trindade, 2005; Vidal, 2007).

Em um estudo realizado no Hospital São Paulo (HSP), pertencente à UNIFESP (Inoue, 2008), que analisou amostras de 2002 a 2005, observou-se a persistência do clone epidêmico brasileiro dentro do ambiente hospitalar (86% das amostras pertenciam a um único cluster relacionado a este clone), além da emergência de novos clones, diferentes do CEB, nos últimos anos avaliados, o que poderia indicar a evolução temporal deste clone nos ambientes nosocomiais.

3. OBJETIVOS

- Avaliar o perfil molecular de *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina (MRSA), coletados de pacientes pediátricos admitidos no Hospital das Clínicas de Botucatu, no período de 1991 a 2010, através da detecção dos diferentes tipos de elementos genéticos móveis utilizando-se técnicas de PCR multiplex e detecção de similaridade genética pela técnica de PFGE;
- Avaliar a prevalência do clone epidêmico brasileiro no Hospital das Clínicas de Botucatu no período analisado;
- Detectar a possível presença de leucocidina de Panton Valentine nas amostras de *Staphylococcus aureus*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostras

Foram analisadas 139 amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de materiais clínicos provenientes de pacientes pediátricos internados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Botucatu, entre 1991 e 2010. O isolamento das linhagens foi realizado conforme as normas descritas por Koneman et al., 1997.

4.2 Identificação de *S. aureus*

As colônias típicas de *Staphylococcus* spp. em ágar sangue foram coradas pelo método de Gram objetivando-se sua pureza e a observação de sua morfologia e coloração específica. Após a confirmação dessas características, as linhagens foram submetidas às provas de catalase e coagulase para diferenciação do gênero *Streptococcus* e do grupo coagulase-negativa dos *Staphylococcus*, respectivamente (Koneman et al., 1997).

4.3 Detecção do gene *mecA* de resistência à meticilina

Os isolados foram submetidos à determinação da resistência à oxacilina pela detecção do gene *mecA* por PCR (Murakami et al., 1991), considerado o método padrão-ouro para identificação de isolados resistentes à oxacilina.

4.3.1 Extração do ácido nucleico

O ácido nucléico total foi extraído a partir de linhagens de *S. aureus* cultivadas em ágar sangue e inoculadas individualmente em caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI) e incubadas a 37°C por 24 horas.

A extração foi realizada com o Kit Illustra (GE Healthcare) que consiste na digestão inicial das células de estafilococos com lisozima (10mg/ml) e proteinase K (20mg/ml). A

seguir, 500µl da solução de extração foram adicionados à mistura e esta foi centrifugada a 5000 x g por 1minuto. Após, o sobrenadante foi transferido para a coluna e centrifugado a 5000 x g por 1minuto. Descartou-se o líquido coletado e 500µl de solução de extração foram adicionados novamente à coluna. Após a centrifugação e descarte do líquido coletado, 500µl da solução de lavagem foram adicionados à coluna e esta centrifugada a 14000 x rpm por 3min. A seguir, a coluna foi transferida para um tubo de 1,5ml e 200µl de água Milli Q aquecida a 70°C foram utilizados para a eluição. As amostras foram centrifugadas a 5000 x g por 1 minuto, e a coluna desprezada. O DNA extraído foi guardado em freezer a -20°C.

4.3.2 Amplificação do ácido nucléico (PCR)

As reações de PCR foram realizadas em tubos de microcentrífuga de 0,5ml em volumes totais de 25µl contendo 10pmol de cada *primer* (Tabela 2), 2,5U de Taq DNA polimerase, 200µM de desoxiribonucleotídeos trifosfatados, 20mM de Tris-HCl (pH 8,4), 0,75mM de MgCl₂ e 3µL da amostra. A incubação foi realizada em termociclador apropriado, empregando os parâmetros descritos por Murakami et al. (1991) que consistem de: 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 30s, anelamento dos *primers* a 55,5°C por 30s e extensão a 72°C por 1min. Após completar os 40 ciclos, os tubos foram mantidos a 72°C por 5min antes de resfriar a 4°C. Em todas as reações realizadas foram utilizadas linhagens de referência internacional como controle positivo (*S. aureus* ATCC 33591) e negativo (*S. aureus* ATCC 25923).

Tabela 2: Oligonucleotídeos para a detecção do gene *mecA*.

Função	Nome	Sequência de nucleotídeos 5'a 3'	Produto amplificado
<i>Primer</i>	<i>mecA1</i>	AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG	533 bp
<i>Primer</i>	<i>mecA2</i>	AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG	533 bp

Fonte: Murakami et al., 1991.

4.3.3. Visualização dos produtos amplificados

A eficiência das amplificações foi monitorada pela eletroforese da reação em gel de agarose a 2% preparado em tampão 0,5 X TBE e corado com sybr safe. Os tamanhos dos produtos amplificados foram comparados com o padrão de 100bp e posteriormente fotografados sob transiluminação UV.

Como controle positivo, foi utilizado um representante do clone de MRSA previamente conhecido, cuja caracterização bioquímica e perfil de DNA em PFGE já foram descritos (Sader et al., 1994).

4.4 PCR Multiplex para a determinação do tipo de SCCmec

A determinação do tipo de SCCmec foi realizada utilizando o método de reação PCR-Multiplex com o *primers* descritos na Tabela 3, conforme descrito por Milheiriço et al (2007).

Foram utilizados 8 *loci* (A-H), selecionados com base nas sequências do elemento *mec* descritas previamente (Ito et al., 1999, 2001; Oliveira et al.; 2001; Milheiriço et al., 2007). O *locus* A está localizado downstream ao gene *pls* e é específico para o SCCmec tipo I; o *locus* B é um fragmento interno do operon *kdp*, que é específico para o SCCmec tipo II; o *locus* C é um fragmento interno do gene *mecl* presente nos SCCmec tipos II e III; o *locus* D é um fragmento interno da região *dcs*, presente nos SCCmec tipos I, II e IV; o *locus* E está localizado na região entre o plasmídeo pl258 e o transposon Tn554, sendo específico para SCCmec tipo III; o *locus* F, também específico para o SCCmec tipo III, está localizado entre o Tn554 e a junção cromossômica direita (*orfX*). Os *loci* G e H foram incluídos para distinguir as variantes estruturais IA e IIIA, respectivamente. O *locus* G corresponde à junção esquerda entre a sequência de inserção IS431 e o plasmídeo pUB110; o *locus* H corresponde à junção esquerda entre a sequência de inserção IS431 e o plasmídeo pT181.

Como controle para a tipagem do *SCCmec* foram utilizadas as cepas COL para *SCCmec* tipo I; N315 para *SCCmec* tipo IA; PER34 para o *SCCmec* tipo II; AN546 para o *SCCmec* tipo III; HU25 para o *SCCmec* tipo IIIA e MW2 para o *SCCmec* tipo IV. Como controle negativo foi utilizado água destilada deionizada estéril.

Tabela 3. Sequência dos *primers* utilizados para PCR multiplex para a determinação dos tipos de *SCCmec*, segundo Milheiriço e colaboradores (2007).

<i>Primer</i>		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	GTACTCGTTACAATGTTTGG ATAATGGCTTCATGCTTACC	449	<i>SCCmec</i> tipo V
RIF5 F10	RIF5 R13	TTCTTAAGTACACGCTGAATCG GTCACAGTAATTCCATCAATGC	414	<i>SCCmec</i> tipo III
<i>SCCmec</i> V J1 F 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 CCGATATAGAAWGGGTTAGC	311	<i>SCCmec</i> tipos II e IV
kdp F1	kdp R1	AATCATCTGCCATTGGTGATGC CGAATGAAGTGAAAGAAAGTGG	284	<i>SCCmec</i> tipo II
<i>SCCmec</i> III J1 F III J1 R		CATTTGTGAAACACAGTACG GTTATTGAGACTCCTAAAGC	243	<i>SCCmec</i> tipo III, J1
mecI P2	mecI P3	ATCAAGACTTGCATTACAGGC GCGGTTTCAATTCACCTTGTC	209	<i>SCCmec</i> tipos II e III
mecA P4	mecA P7	TCCAGATTACAACCTTACCAGG CCACTTCATATCTTGTAACG	162	<i>mecA</i> (controle interno)

4.5 Detecção de Produção de PVL (Panton Valentine Leukocidin)

A detecção do gene responsável pela síntese da leucocidina Panton Valentine foi realizada 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.

5' ATCCGAGAGACTATTTTGTGC 3' P1 pvl

5' CATCAACCTTTTCTCACTTAC 3' P2 pvl

A extração do DNA genômico foi realizada com o Kit Illustra (GE Healthcare), conforme descrito anteriormente.

A reação de amplificação foi realizada utilizando-se 5µL de GoTaq Green Master Mix (Promega, Madison, WI, EUA), um total de 1µL de *primers*, 3,5µL de água estéril deionizada e 0,5 µL do produto da extração bacteriana. A reação de amplificação foi realizada no termociclador MasterCycler gradient (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), utilizando o seguinte programa: 5min a 95°C, seguido por 35 ciclos de 15s a 95°C, 15s a 53°C e 1min a 72°C. O programa termina com uma extensão adicional de 10min a 72°C e mantidos a 20°C até o momento da eletroforese.

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% preparado em tampão 0,5 X TBE e corado com sybr safe. Os tamanhos dos produtos amplificados foram comparados com o padrão de 100bp e posteriormente fotografados sob transiluminação UV.

4.6 Análise do DNA cromossômico

A análise do DNA cromossômico dos isolados de *S. aureus* resistentes à oxacilina foi realizada pela técnica de eletroforese em gel em campo pulsado (*pulsed-field gel electrophoresis* – 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 longos permite a digestão do cromossomo em fragmentos maiores (McDougal et al., 2003).

Após 18-24 horas de incubação da amostra bacteriana em 10ml de caldo tripticase de soja (TSB – OXOID, Inglaterra), os tubos foram centrifugados por 15 minutos. Em seguida, o centrifugado (células) foi diluído em 1ml de solução salina e transferido para um tubo de microcentrífuga de peso conhecido. Os tubos foram então centrifugados (15000 rpm) por aproximadamente 30 segundos e o sobrenadante cuidadosamente aspirado e desprezado. Com a finalidade de se determinar o peso do centrifugado (células), os tubos foram novamente pesados. O centrifugado foi diluído em solução salina na proporção de 1:1, isto é, o volume da salina em µl ficou equivalente ao peso do centrifugado em µg. Um volume de 10µl foi transferido para outro tubo, onde foram adicionados 15µl de lisostafina diluída e 300µl da solução tampão TEM (Tris 0,1M; pH 7,5; EDTA 0,1M; NaCl 0,1M). Essa solução foi homogeneizada e misturada com 340µl de gel de agarose “low-melt” a 2% para formação de pequenos blocos de gel contendo DNA cromossômico. A seguir, os blocos foram incubados por um período mínimo de 5 horas em solução EC (Tris 6mM; pH 7,5; NaCl 1M; EDTA 0,01M; Brij 58 0,5%; Sarcosil 0,5%; Deoxicolato 0,2% e água destilada, contendo 200µl de lisozima) à 37°C e incubados em 2 ml da solução ES (EDTA 0,4M; pH 9,3; Sarcosil 1%) contendo 100µl de proteinase K (20mg/ml, Sigma – P4914) por um período mínimo de 12 horas. A seguir, os blocos de géis foram lavados várias vezes em solução tampão CHEF-TE (Tris 0,1M; pH 7,5; EDTA 0,1M; pH 7,5) e armazenados nesta solução até serem submetidos à digestão eletroenzimática e eletroforese.

O DNA das amostras de *S. aureus* foi digerido com a enzima *Sma*I e a eletroforese realizada em gel de agarose a 1% no sistema CHEF-DRIII (Bio-Rad Laboratories, EUA). Os fragmentos de restrição resultantes foram colocados no aparelho de eletroforese com corrente alternada de 5 a 60 segundos a 6 v/cm e temperatura de 13°C durante 23 horas em gel de agarose a 1%. Os géis foram corados com GelRed (15µl em 400ml de água destilada) por 45 minutos e fotografados sob luz com filme “Polaroid” (Kodak).

Os géis foram incluídos e processados no programa BioNumerics versão 5.0 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). As cepas de *S. aureus* de cada gel foram normalizadas entre si e com a cepa de referência universal NCTC 8325 (Murchan et al. 2003). Em todas as imagens, a definição de bandas foi realizada automaticamente pelo programa e depois conferida visualmente. O coeficiente de similaridade de Dice foi utilizado, e o dendrograma foi construído utilizando o algoritmo de análise filogenética UPGMA (“Unweighted Pair-Groups Method using arithmetic averages”) (Sneath and Sokal 1973). Os valores de otimização e tolerância utilizados para o conjunto de isolados foram de 0,5 e 1,25%, respectivamente. Um coeficiente de similaridade acima de 80% foi selecionado para definir cada cluster de isolados (McDougal et al. 2003; Struelens et al. 1992).

Como controle do CEB, foi utilizada a cepa de *S. aureus* HU25, representante do clone de MRSA previamente conhecido (Sader et al., 1993).

5. RESULTADOS

5.1 Identificação das amostras

Foram estudadas 139 amostras de *Staphylococcus aureus* de pacientes internados nas unidades Neonatal e Pediatria do Hospital das Clínicas (HC) da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) entre os anos 1991 e 2010. Os isolados foram feitos dos seguintes materiais clínicos: hemocultura, secreção, cateter, cânula e dreno torácico (Tabela 4).

Todas as amostras foram confirmadas para a espécie *S. aureus* através dos testes de Gram, prova da catalase para diferenciação do gênero *Streptococcus* e prova da coagulase para diferenciação do grupo coagulase-negativa dos *Staphylococcus*.

Tabela 4. Distribuição das amostras nos diferentes materiais clínicos.

Material	Número de Amostras	Porcentagem (%)
Hemocultura	74	53,2
Secreção	28	20,1
Cateter	20	14,4
Cânula	11	7,9
Dreno torácico	6	4,3

Com relação à procedência das amostras, 108 (77,7%) eram da unidade Neonatal, 28 (20,1%) da Pediatria e três (2,2%) não tiveram sua origem informada.

5.2 Caracterização genética das amostras

O gene *mecA* foi encontrado em 32 (23%) amostras (Figura 1).

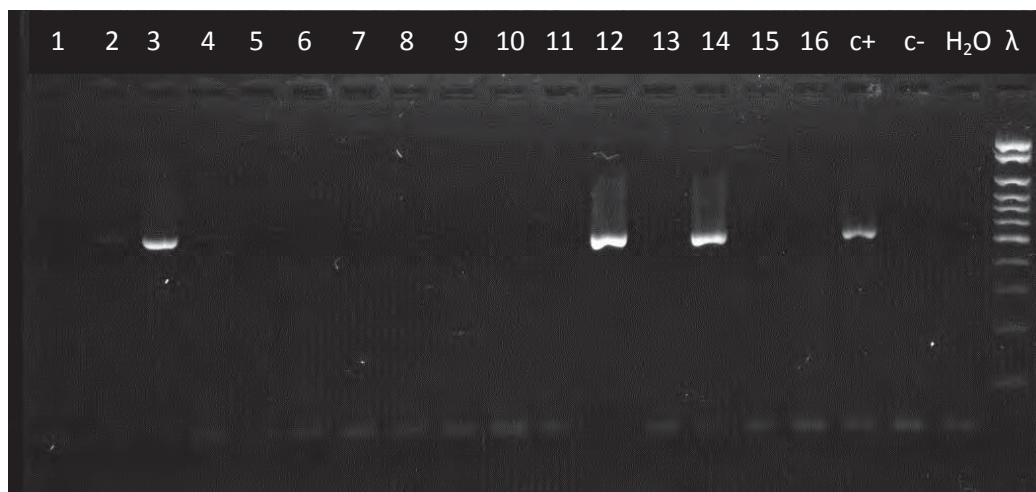


Figura 1. Gel de eletroforese para detecção do gene *mecA* (533 pb) nas amostras de *S. aureus* segundo protocolo de Murakami et al., 1991. Amostras positivas: 3, 12 e 14; c+ (controle positivo); c- (controle negativo); λ (peso molecular 100 bp).

As amostras que apresentaram o gene *mecA* foram tipadas quanto ao tipo de *SCCmec* que carregavam, pelo método de PCR multiplex segundo protocolo de Milheiriço et al. (2007). Das 32 amostras positivas para o gene de resistência à oxacilina, 10 (31,2%) possuíam *SCCmec* do tipo III e 22 (68,8%) possuíam *SCCmec* tipo IV (Figura 2).

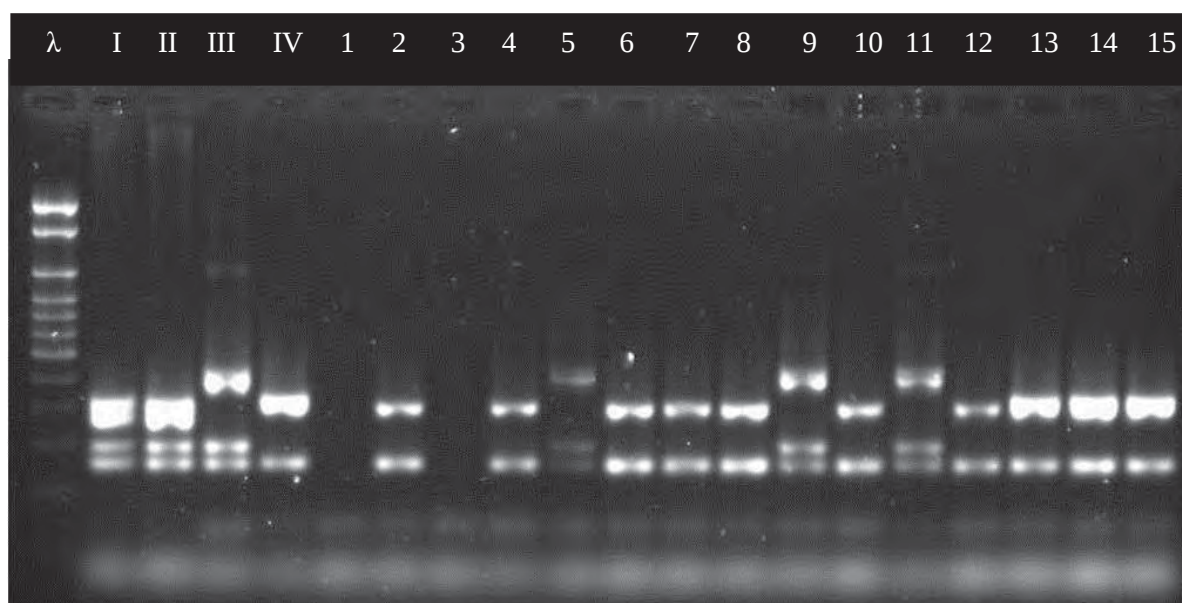


Figura 2. Gel de eletroforese de PCR multiplex segundo protocolo de Milheiriço et al (2007). Da esquerda para a direita, λ (peso molecular 100 bp), controles de *SCCmec* I a IV. Amostras negativas: 1 e 3. Amostras *SCCmec* tipo III: 5, 9 e 11. Amostras *SCCmec* tipo IV: 2, 4, 6, 7, 8, 10, 12, 13, 14, 15.

A distribuição das amostras que possuem o gene *mecA* e dos tipos de SCC*mec* encontrados de acordo com os diferentes materiais clínicos encontra-se na Tabela 5.

Tabela 5. Distribuição das amostras MRSA e dos tipos de SCC*mec* encontrados nos diferentes materiais clínicos.

MRSA				
Material	Número de Amostras	Porcentagem (%)	SCC <i>mec</i> tipo III (N)	SCC <i>mec</i> tipo IV (N)
Hemocultura	12	37,5	3	9
Secreção	6	18,7	2	4
Cateter	7	21,9	4	3
Cânula	5	15,6	1	4
Dreno torácico	2	6,3	0	2
Total	32	100	10	22

Observou-se uma variação na distribuição do tipo de SCC*mec* de acordo com os anos avaliados. Nos anos 1991 e 1992, todas as amostras *mecA* positivas apresentavam SCC*mec* tipo III. Somente a partir de 1993 o SCC*mec* tipo IV surgiu nas amostras estudadas, tornando-se predominante a partir de 2005 (Figura 3).

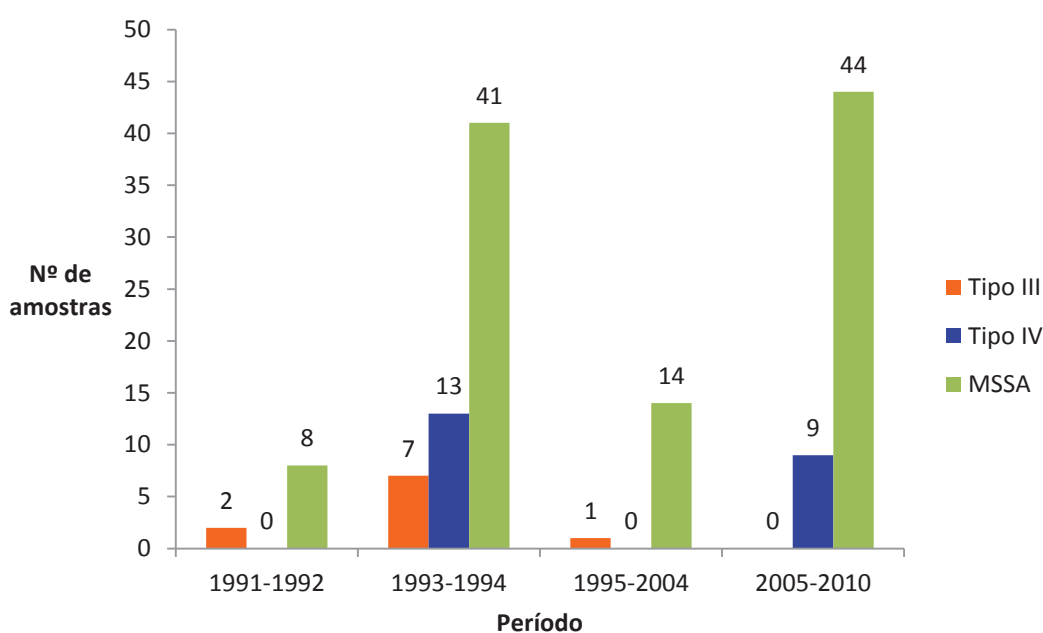


Figura 3. Gráfico da distribuição das amostras de *S.aureus* sensíveis à meticilina (MSSA) e MRSA analisadas de acordo com o tipo de SCC*mec* encontrado nos diferentes períodos.

5.3 Detecção do gene *lukF*

Todas as amostras estudadas foram investigadas quanto à presença do gene codificador da toxina PVL. O gene foi encontrado em 18 (12,9%) amostras, sendo que nenhuma era resistente à oxacilina (Figura 4).

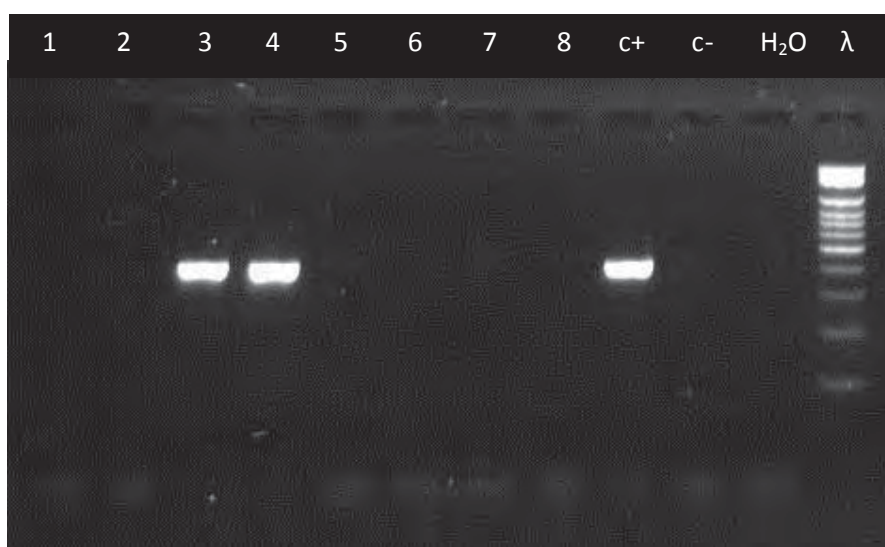


Figura 4. Detecção do gene *lukF*, codificador da toxina PVL, pelo protocolo de Ribeiro et al. (2005). Amostras positivas: 3 e 4; c+ (controle positivo: USA 300); c- (controle negativo: USA 100); λ (peso molecular 100bp).

5.4 Tipagem Molecular

Todas as amostras que apresentaram o gene *mecA* foram submetidas à técnica de PFGE para tipagem molecular e analisadas com o programa BioNumerics versão 5.0 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). Apenas uma das amostras, que apresentava *SCCmec* do tipo III, não era tipável pelo método utilizado.

A análise do DNA cromossômico identificou quatro principais clusters com mais de 80% de similaridade pelo coeficiente de Dice, sendo um cluster de *SCCmec* III e três de *SCCmec* IV.

O cluster relacionado ao SCCmec III possui 6 amostras, apresentou 84% de similaridade e relacionou-se com a cepa HU 25, representante do CEB. Dentro desse cluster, observa-se a presença de dois “sub-clusters”, um com duas amostras com 95,7% de similaridade e outro contendo três amostras com 100% de similaridade (Figura 5).

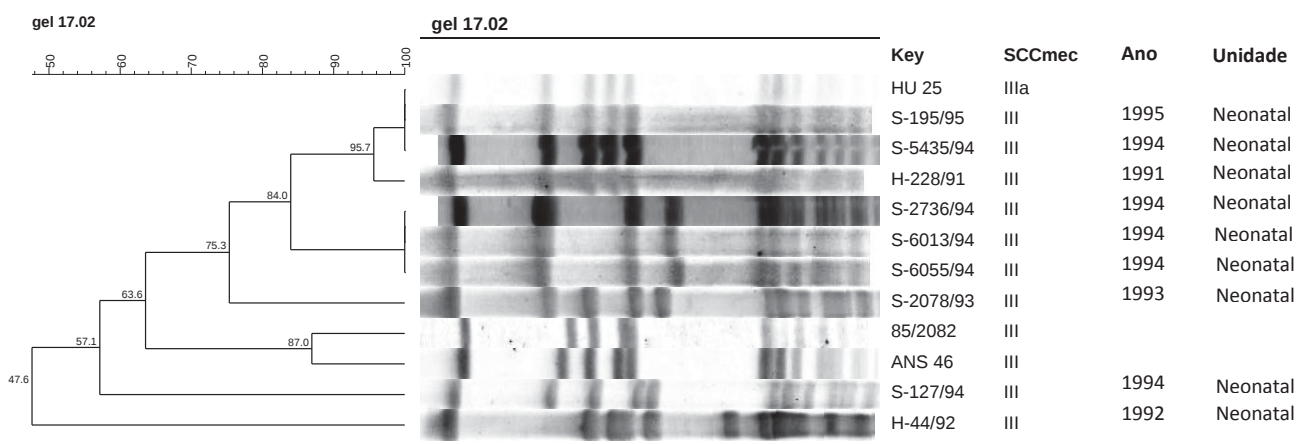


Figura 5. Dendrograma de similaridade entre os isolados de MRSA de SCCmec tipo III de acordo com o padrão de PFGE, construído pelo método de agrupamento UPGMA, baseado no coeficiente de Dice.

Todas as amostras do cluster relacionado ao CEB foram isoladas na unidade neonatal do HC-FMB. As demais amostras que contêm SCCmec tipo III não foram relacionadas a nenhuma outra amostra.

Na análise do DNA cromossômico das amostras de SCCmec de tipo IV, encontramos três principais clusters (Figura 6). Um deles agrupa oito amostras com 100% de similaridade, mas não está relacionado a nenhum clone epidêmico.

O segundo cluster de importância, apresenta 89,1% de similaridade entre as amostras, todas da unidade neonatal, e com a presença de “sub-clusters” de 91,7% e 100% de similaridade. Esse cluster também não apresentou relação com nenhum clone epidêmico conhecido.

Outro cluster encontrado apresenta três amostras idênticas entre si (100% de similaridade), mas mais uma vez sem nenhuma relação com clones epidêmicos.

Uma amostra apresentou 90% de semelhança com uma cepa controle, a JCSC 4469 e 80,9% de semelhança com a cepa controle USA 500. Outra amostra analisada apresentou 84,2% de similaridade com a cepa controle USA 800, e uma das amostras analisadas não apresentou relação com nenhuma outra amostra.

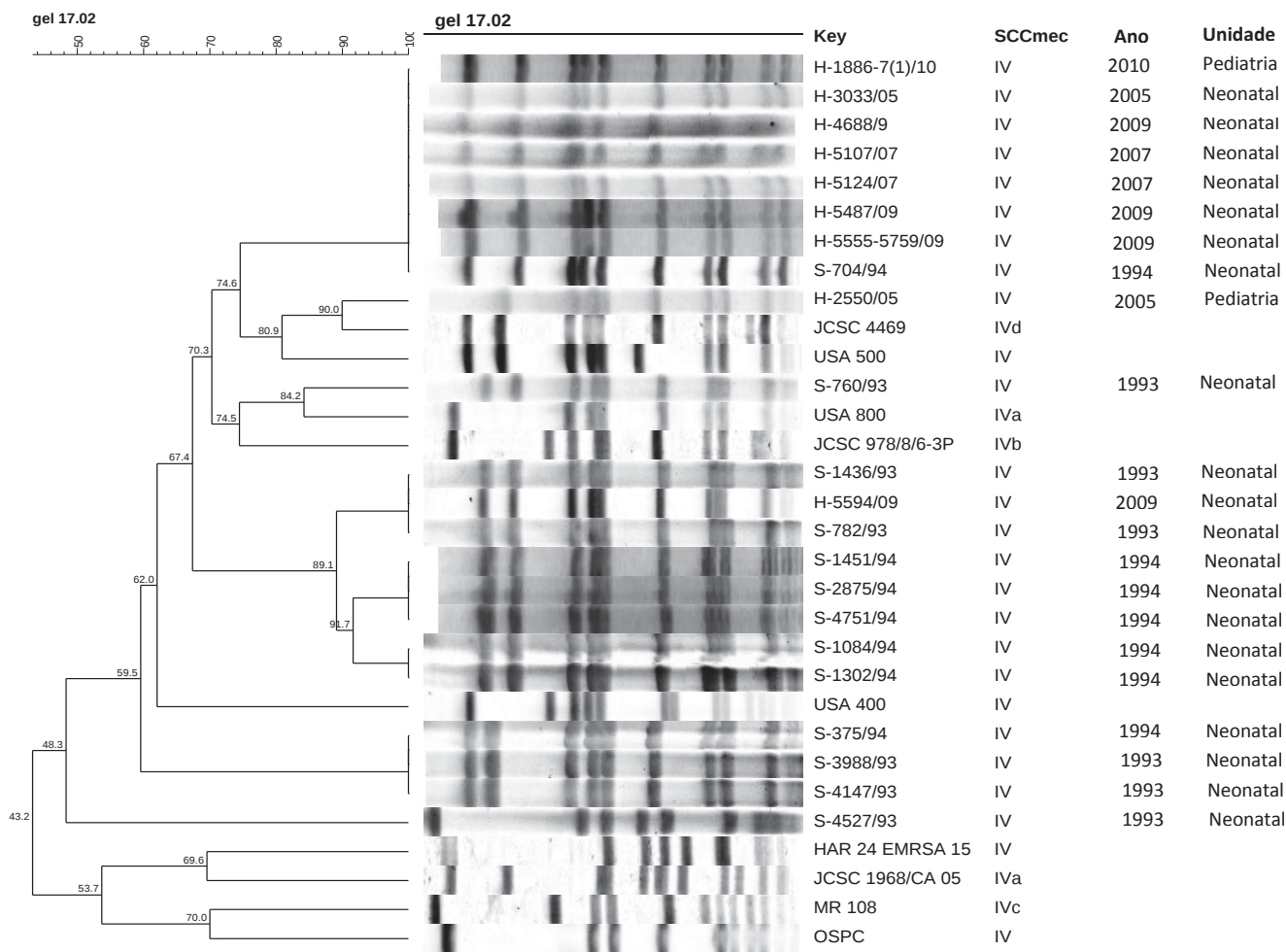


Figura 6. Dendrograma de similaridade entre os isolados de MRSA de SCCmec tipo III de acordo com o padrão de PFGE, construído pelo método de agrupamento UPGMA, baseado no coeficiente de Dice.

6. DISCUSSÃO

Staphylococcus aureus continua sendo um preocupante patógeno no ambiente hospitalar. No entanto, há poucos estudos que descrevem a prevalência de cepas resistentes desse patógeno em pacientes pediátricos no Brasil. Este estudo permitiu avaliar a diversidade genética em *Staphylococcus aureus*, encontrando os seguintes dados: (i) o aumento da porcentagem de MRSA encontrada em relação a outros estudos; (ii) a maior incidência de SCCmec tipo IV em relação ao tipo III e (iii) a diminuição da prevalência do clone epidêmico brasileiro (CEB) dentro do ambiente hospitalar e a emergência de clones internacionais.

Aumento da incidência de MRSA

No presente estudo, a porcentagem de amostras resistentes à oxacilina encontrada (23%) foi maior que a encontrada em outro estudo feito com amostras pediátricas do HC-FMB no período de 1991 a 2007 (Pereira et al., 2009), que encontrou 18% dos isolados resistentes à oxacilina, mostrando que a presença desse patógeno tem aumentado nos últimos anos em unidades pediátricas. Lamaro-Cardoso e colaboradores encontraram 7,5% de MRSA em crianças que foram colonizadas por *S. aureus* em Goiânia (Lamaro-Cardoso et al., 2007). Outro estudo realizado no Brasil encontrou 2,2% de MRSA em pacientes de pediatria admitidos em um hospital público e universitário (Santos et al., 2010).

Porém, estudos realizados em outros países mostraram taxas bem maiores de MRSA. Um estudo conduzido na Índia encontrou 66% de prevalência de *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina entre pacientes da UTI neonatal (Karthikeyan & Premkumar, 2001). Taxas similares foram encontradas no Japão e em Israel, com taxas de infecção por MRSA de 52,5% e 60%, respectivamente, em pacientes recém-nascidos (Fujimura et al., 2004; Kuint et al., 2007) .

Evolução do CEB no HC-FMB

Apesar da maioria das amostras resistentes serem de hemocultura (37,5%), o que inicialmente aumentaria a incidência de SCCmec tipo III, encontrou-se mais amostras de SCCmec do tipo IV (75%). Talvez isso se justifique pelo tipo de paciente dos quais se isolou as amostras de *Staphylococcus aureus*.

A maioria dos isolados de SCCmec tipo III (60%) foram relacionados ao CEB, mostrando que esse clone ainda é prevalente em infecções hospitalares no Brasil.

Contudo, com o passar dos anos, observou-se aumento de MRSA com SCCmec tipo IV e diminuição do SCCmec tipo III, confirmando a tendência mundial de aumento da presença de SCCmec tipo IV no ambiente hospitalar e diminuição da prevalência de outros clones hospitalares. (Robison and Enright, 2003; Gardella et al., 2011).

Emergência de outras linhagens de MRSA no HC-FMB

A análise do DNA cromossômico mostrou um cluster com amostras descritas tanto na unidade neonatal como na unidade pediátrica, sugerindo possível transmissão cruzada entre as unidades. As duas unidades não estão fisicamente próximas, o que corrobora a ideia de que pode ter havido transmissão através do profissional da saúde, ou ainda, que o paciente possa ter sido transferido de uma unidade à outra.

Algumas amostras que apresentaram SCCmec tipo IV mostraram similaridade com clones internacionais como JCSC4469, USA500 e USA800, sugerindo que esses clones podem estar inseridos em nosso país.

Em nenhuma amostra que possuía SCCmec tipo IV foi detectado o gene codificador da PVL, indicando que talvez essas amostras possam estar relacionadas ao clone pediátrico, uma vez que a ausência dessa toxina é característica desse clone. Isolados portando SCCmec

IV são comumente relacionados a amostras de origem comunitária (Fey et al., 2003). O clone pediátrico, apesar de possuir *SCCmec* tipo IV, é uma exceção à regra, pois foi descrito primeiramente como uma linhagem hospitalar em Portugal (Sa-Leão et al., 1999). O clone pediátrico estaria intimamente ligado a populações jovens, talvez relacionado às características mais rigorosas da política do uso racional de antimicrobianos nestas unidades, como sugerido pelos pesquisadores portugueses (Sa-Leão et al., 1999). Este ambiente, de menor pressão seletiva e baixa rotatividade de pacientes, auxiliaria na disseminação e manutenção de linhagens específicas – no caso, o clone pediátrico – nestas unidades.

Outros estudos realizados na região sudeste do Brasil, que descreveram a predominância do clone pediátrico em nosso meio hospitalar, também corroboram com os dados encontrados no presente estudo (Inoue, 2008; Trindade, 2005).

7. CONCLUSÕES

- O estudo permitiu avaliar o perfil molecular de *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina (MRSA), coletados de pacientes pediátricos admitidos no Hospital das Clínicas de Botucatu, no período de 1991 a 2010. A técnica de PCR multiplex mostrou presença dos SCCmec tipo III e tipo IV, e a técnica de PFGE permitiu detectar diferentes clones entre as amostras isoladas.
- A prevalência do clone epidêmico brasileiro no Hospital das Clínicas de Botucatu no período analisado diminuiu com o passar dos anos, e novos clones emergiram, com a predominância do SCCmec IV .
- A presença de PVL foi detectada em 12,9% das amostras de *Staphylococcus aureus*, e nenhuma delas apresentava resistência à oxacilina.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aires de, S.M., Crisostomo, M., Sanches, I., Wu, J., Fuzhong, J., Tomasz, A., de L. (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, S.M., Miragaia, M., Sanches, I., Avila, S., Adamson, I., Casagrande, S. et al. (2001) Three-year assessment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America from 1996 to 1998. *J Clin Microbiol.* **39**(6), 2197-205.
- Archer, G.L., Bosilevac, J.M. (2001) Signaling antibiotic resistance in staphylococci. *Science.* **291**, 1915–6.
- Barber, M., Rozwadowska-Dowzenko, M. (1948) Infection by penicillin-resistant staphylococci. *Lancet.* **2**(6530), 641-4.
- Cardoso-Lamaro, J., Kipnis, A., Pimenta, F., Oliveira, L., Oliveira, R., Nouer, S., Aires-De-Souza, M., Milheriço, C., Sgambatti, A. (2009) Molecular epidemiology and risk factors for nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* in infants attending day care in Brazil. *J. Clin. Microbiol.* **47** (12), 3991-3997.
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention) (2005). Laboratory detection of: oxacillin/methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention) (2010). Healthcare-associated Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (HA-MRSA).
- Chambers, H.F., Sachdeva, M. (1990) Binding of beta-lactam antibiotics to penicillin-binding proteins in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis.* **161**(6), 1170-6.

- Chambers, H.F. (2001) The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? *Emerg Infect Dis.* **7**, 178-82.
- Chambers, H.F. (1997) Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin Microbiol Rev.* **10**(4),781-91.
- Conterno, L., Wey, S., Castelo, A. (1998) Risk factors for mortality in *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Infect Control Hosp Epidemiol.* **19**(1),32-7.
- de Miranda, O., Silva-Carvalho, M., Ribeiro, A., Portela, F., Cordeiro, R., Caetano, N., Vidal, C. and Figueiredo, A. (2007) Emergence in Brazil of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates carrying SCCmec IV that are related genetically to the USA800 clone. *Clin. Microbiol. Infect.* **13**, 1165-1172.
- de Oliveira, Conterno, L., Wey, S., Castelo, A. (2002) *Staphylococcus aureus* bacteremia: comparison of two periods and a predictive model of mortality. *Braz J Infect Dis.* **6**(6),288-97.
- de Trindade, P., Pacheco, R., Costa, S., Rossi, F., Barone, A., Mamizuka, E., et al. (2005) Prevalence of SCCmec type IV in nosocomial bloodstream isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* **43**(7),3435-7.
- Deresinski, S. (2005) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an evolutionary, epidemiologic, and therapeutic odyssey. *Clin Infect Dis.* **40** (4), 562-73.
- Deurenberg, R.H., and Stobberingh, E.E. (2008) The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infect, Genet Evol.* **8**, 747-763.

Dohin, B., Gillet, Y., Kohler, R., Lina, G., Vandenesch, F., Vanhems, P., Floret, D., Etienne, J. (2007) Pediatric bone and joint infections caused by Panton-Valentine leukocidin-positive *Staphylococcus aureus*. *Pediatr Infect Dis J.* **26**(11),1042-48.

Fey, P.D., Said-Salim, B., Rupp, M.E., Hinrichs, S.H., Boxrud, D.J., Davis, C.C., Kreiswirth, B.N. and Schlievert, P.M. (2003) Comparative molecular analysis of community- or hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 196-203.

Fujimura, S., Kato, S., Hashimoto, M., Takeda, H., Maki, F., Watanabe, A. (2004) Survey of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from neonates and the environment in the NICU. *Journal of Infection and Chemotherapy.* **10**,2.

Gardella, N., Murzicato, S., Di Gregorio, S., Cuirolo, A., Desse, J., Crudo, F., Gutkind, G., Mollerach, M. (2011) Prevalence and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among healthy children in a city of Argentina. *Infect, Genet Evol.* **11**, 1066-1071.

Gomes, A., Sanches, I., Aires de, S.M., Castañeda, E., 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**(1),23-32.

Guilarde, A.O., Turchi, M.D., Martelli, C.M. and Primo, M.G. (2006) *Staphylococcus aureus* bacteraemia: incidence, risk factors and predictors for death in a Brazilian teaching hospital. *J. Hosp. Infect.* **63**, 330-336.

Hartman, A., Tomasz, B. (1981) Altered penicillin-binding proteins in methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* **19**,726–35.

Hiramatsu, K., Cui, L., Kuroda, M. and Ito, T. (2001) The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* **9**(10), 591-595.

Inoue, F. (2008) Caracterização do perfil epidemiológico e molecular de *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina isolados de hemoculturas de pacientes admitidos no Hospital São Paulo. Tese de Mestrado – UNIFESP. 2008, 127p.

International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC) (2009). Classification of staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*): guidelines for reporting novel SCC*mec* elements. *Antimicrob Agents Chemother.* **53**(12),4961-7.

International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome elements (IWG-SCC) (2011) http://www.sccmec.org/Pages/SCC_TypesEN.html Acesso em:20/07/2011

Ipsen, T. and Gahrn-Hansen, B. (1988) Occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a department of orthopedic surgery 1970 to 1986. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **7**, 400-403.

Ito, T., Katayama, Y., Hiramatsu, K. (1999) Cloning and nucleotide sequence determination of the entire *mec* DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. *Antimicrob Agents Chemother.* **43**(6),1449-58.

Kaneko, J., Kamio, Y. (2004) Bacterial two-component and hetero-heptameric pore-forming cytolytic toxins: structures, pore-forming mechanism, and organization of the genes. *Biosci Biotechnol Biochem*, **68**, 981–1003.

Karthikeyan, G., Premkumar, K. (2001) Neonatal Sepsis: *Staphylococcus aureus* as the predominant pathogen. *Indian Journal of Pediatrics.* **68**,8.

Katayama, Y., Ito, T., Hiramatsu, K. (2000) A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*.

Antimicrob Agents Chemother. **44**,1549–55.

Kayser, F.H. (1975) Methicillin-resistant staphylococci 1965-75. *Lancet* **2**, 650-653.

Kitamoto, N., Kato, Y., Kanzya, S., Katai, A., and Tanaka T. (2005) Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by pulsed-field gel electrophoresis.

Kansenshogaku Zasshi, **79**, 129-137.

Kluytmans, J., van Belkum, A., Verbrugh, H. (1997) Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms and associated risks. *Clin Microbiol Rev.* **10** (3); 505-520.

Koneman, E., Allen, S., Janda, W., Schreckenberger, P., Winn Jr., W., (1997). Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 5th ed., Lippincott, Philadelphia, +1395pp.

Kuint, J., Barzilai, A., Regev-Yochay, G., Rubinstein, E., Keller, N., Maayan-Metzger, A.

(2007) Comparison of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

bacteremia to other staphylococcal species in a neonatal intensive care unit. *Eur J Ped.* **166**,4.

Lamaro-Cardoso, J., Castanheira, M., de Oliveira, R.M., Silva, S.A., Pignatari, A.C., Mendes, R.E., Pimenta, F.C., Andrade, A.L. (2007) Carriage of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Children in Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis.* **57**, 467-470.

Li, S., Skov, R.L., Han, X., Larsen, A.R., Larsen, J., Sorum, M., Wulf, M., Voss, A.,

Hiramatsu, K. and Ito, T. (2011) Novel types of staphylococcal cassette chromosome *mec*

elements identified in clonal complex 398 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains.

Antimicrob. Agents Chemother. **55**(6), 3046-3050.

Lowy, M.D., Franklin, D. (1998) *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med.* **339** (8); 520-532

Marshall, S., Wilke, W., Pfaller, M., Jones, R. (1998) *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci from blood stream infections: frequency of occurrence, antimicrobial susceptibility and molecular (*mecA*) characterization of oxacilin resistance in the SCOPE program. *Diagn Microbiol Infect Dis.* **30**(3), 205-214.

Matsumura, K., Takahashi, A., and Sakata, H. (1999) Colonization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in low-birth-weight infants in a neonatal intensive care unit. *Kankyo kansen*, **14**, 189-191.

McDougal, L., Steward, C., Killgore, G., Chaitram, J., McAllister, S., Tenover, F. (2003) Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database. *J Clin Microbiol.* **41**(11):5113-20.

Milheiro, C., Oliveira, D.C. and de Lencastre, H. (2007) Update to the Multiplex PCR Strategy for Assignment of *mec* Element Types in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* **51**(9), 3374–3377.

Moreira, M., Medeiros, E.A., Pignatari, A.C., Wey, S.B. and Cardo, D.M. (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, F., Crisp, C., Jorgensen, J.H. and Patterson, J.E. (1995) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a community organism. *Clin. Infect. Dis.* **21**, 1308-1312.

Murakami, K., Minamide, W., Wada, K., Nakamura, E., Teraoka, H., Watanabe, S. (1991) Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. *Rinsho Byori.* **39**(12), 1325-30.

Murchan,S., Kaufmann,M.E., Deplano,A., de,R.R., Struelens,M., Zinn,C.E., Fussing,V., Salmenlinna,S., Vuopio-Varkila,J., El,S.N., Cuny,C., Witte,W., Tassios,P.T., Legakis,N., van,L.W., van,B.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.

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

Oliveira, D., de Lencastre, H. (2002) Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* **46**(7), 2155-61.

Oliveira, G., Faria, J., Levy, C., Mamizuka, E. (2001) Characterization of the Brazilian endemic clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from hospitals throughout Brazil. *Braz J Infect Dis.* **5**(4):163-70.

Panton, P.N., Valentine, F.C.O. (1932) Staphylococcal toxin. *Lancet*, **222**,506–8.

Pereira, V.C., Martins, A., Cunha, M.L.R. (2009) Detection of oxacillin resistance in *Staphylococcus aureus* from the neonatal and pediatric units of a Brazilian teaching hospital. *Clin Med Pediat.* **3**, 23-31.

Pinho, M.G., Lencastre, H., Tomasz, A. (2001) An acquired and a native penicillin-binding protein cooperate in building the cell wall of drug-resistant staphylococci. *PNAS*. **98**(19), 10886-10891.

Ribeiro, A., Dias, C., Silva-Carvalho, M., Berquó, L., Ferreira, F., Santos, R., et al. (2005) First report of infection with community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in South America. *J Clin Microbiol*. **43**(4),1985-8.

Roberts, R., Tennenberg, A., Eisner, W., Hargrave, J., Drusin, L., Yurt, R. and Kreiswirth, B. (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.

Robinson, D.A. and Enright, M.C. (2003) Evolutionary models of the emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* **47**(12), 3926-3934.

Sa-Leao, R., Santos, S., Dias, D., Peres, I., Barros, R. and de L. (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.

Sader, H., Pignatari, A., Hollis, R., Jones, R. (1994) Evaluation of interhospital spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in São Paulo, Brazil, using pulsed-field gel electrophoresis of chromosomal DNA. *Infect Control Hosp Epidemiol.* **15**(5),320-3.

Sader, H., Pignatari, A., Hollis, R., Leme, I., Jones, R. (1993) Oxacillin- and quinolone-resistant *Staphylococcus aureus* in Sao Paulo, Brazil: a multicenter molecular epidemiology study. *Infect Control Hosp Epidemiol.* **14**(5),260-4.

Santos, H.B., Machado, D.P., Camey, S.A., Kuchenbecker, R.S., Barth, A.L., Wagner, M.B. (2010) Prevalence and acquisition of MRSA amongst patients admitted to a tertiary-care hospital in Brazil. *BMC Infect Dis.* **10**,1471-78.

Shore, A.C., Deasy, E.C., Slickers, P., Brennan, G., O'Connell, B., Monecke, S., Ehricht, R. and Coleman, D.C. (2011) Detection of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Type XI Carrying Highly Divergent *mecA*, *mecI*, *mecR1*, *blaZ*, and *ccr* Genes in Human Clinical Isolates of Clonal Complex 130 Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* **55**(8),3765-73.

Sneath, P. H. A. and Sokal, R. R. (1973) Numerical taxonomy. pp. 573.

Struelens, M.J., Deplano, A., Godard, C., Maes, N. and Serruys, E. (1992) Epidemiologic typing and delineation of genetic relatedness of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by macrorestriction analysis of genomic DNA by using pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* **30**, 2599-2605.

Takei, Y., Yokoyama, K., Katano, H., Tsukiji, M., and Ezaki, T. (2010) Molecular Epidemiological Analysis of Methicillin-Resistant *Staphylococci* in a Neonatal Intensive Care Unit. *Biocontrol Sci.*, **15** (4), 129-138.

Teixeira, L., Resende, C., Ormonde, L., Rosenbaum, R., Figueiredo, A., de Lencastre, H., et al. (1995) Geographic spread of epidemic multiresistant *Staphylococcus aureus* clone in Brazil. *J Clin Microbiol.* **33**(9),2400-4.

Thompson, R.L., Cabezudo, I., Wenzel, R.P. (1982) Epidemiology of nosocomial infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Ann Intern Med.* **97**, 309-17.

Trindade, P.A. (2005) Caracterização Molecular da resistência à oxacilina em isolados de *Staphylococcus aureus* hospitalares e comunitários. Tese de Doutorado – FMUSP. 2005, 90p.

Vidal, P. (2007) Fatores associados à infecção de corrente sanguínea por *Staphylococcus aureus* portador de SCCmec tipo IV. Tese de Mestrado – FMUSP. 2007, 80p.

Zhang, H.Z., Hackbarth, C.J., Chansky, K.M., Chambers, H.F. (2001) A proteolytic transmembrane signaling pathway and resistance to b-lactams in staphylococci. *Science*. **291**,1962–5.