LARISSA MARQUES DE OLIVEIRA

“Detecção e caracterização molecular de *Staphylococcus aureus* metilicina resistente em amostras de pacientes hepatopatas”

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientadora: Profa. Dra. Silvia Figueiredo Costa

São Paulo

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Oliveira, Larissa Marques de

Detecção e caracterização molecular de *Staphylococcus aureus* metilina resistente em amostras de pacientes hepatopatas / Larissa Marques de Oliveira. -- São Paulo, 2014.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientadora: Sílvia Figueiredo Costa.

Descritores: 1.Infecção hospitalar 2.Colonização 3. *Staphylococcus aureus* resistente à metilina 4.Hepatopatas 5.Transplante de fígado 6.Caracterização molecular

USP/FM/DBD-403/14

Ao meu grande exemplo de dignidade, meu pai Everton Chaves de Oliveira, por sempre acreditar e apoiar meus sonhos; e à minha mãe, meu exemplo de sabedoria, Selma Neves Marques de Oliveira, pelos ensinamentos, pela dedicação, apoio e compreensão incondicional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me fazer sentir abençoada ao ter chegado até aqui, por sempre guiar e iluminar meu caminho, por abrir portas e me dar forças em situações difíceis.

Aos meus pais, meus maiores incentivadores.

À Profa. Dra. Silvia Figueredo Costa, pela orientação, pelos ensinamentos, pelo apoio e confiança para a realização deste trabalho e pela constante contribuição para o meu crescimento profissional e também pessoal. Admiro a sua inteligência e exemplo de profissionalismo. Obrigado por tudo!

A minha amiga e companheira de projeto, Inneke van der Heijden, um anjo que me acolheu e me acompanhou desde o início deste trabalho, pelos valiosos conhecimentos compartilhados, pela preciosa amizade e imenso apoio nesta caminhada. Sou muito grata por tudo e feliz por tê-la em minha vida!

Ao meu noivo, Luciano Pereira Garcia, pelo companheirismo, pela paciência e compreensão nos momentos de ausência.

Ao Prof. Dr. Mauro Cintra Giudice e às minhas colegas de laboratório, Liang Fung e Juliana Ferraz Rosa, que pacientemente muito me ensinaram quando eu ainda era estagiária e participaram diretamente da minha evolução profissional.

À Andréia de Sousa Alcaia, secretária do LIM e amiga, por estar sempre disposta a ajudar, pelo apoio prestado, pelos conselhos e pela amizade.

A todos os amigos do LIM: alunos, estagiários e funcionários, por acompanharem a minha trajetória e que de alguma forma me ajudaram, me ensinaram e colaboraram para a realização deste trabalho. Obrigado por esses anos prazerosos de companheirismo e amizade.

Aos colegas Dr. Carlos Henrique Camargo e Dr. John Anthony McCulloch pelos ensinamentos em Bioinformática que muito acrescentaram a este trabalho.

Ao Prof. Dr. George Golding (Laboratório Nacional de Microbiologia do Canadá) que gentilmente se prontificou a ajudar-nos e colaborou com nossos avanços referentes à técnica de *spa typing*.

A todos os funcionários do Hospital das Clínicas que ajudaram na realização das coletas e contribuíram com todas as informações necessárias dos pacientes.

Aos pacientes. Sem o consentimento e participação de cada um seria impossível a realização deste trabalho.

Ao CNPQ por subsidiar-me com bolsa de estudos.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo financiamento deste projeto.

Em especial, agradeço de coração aos meus irmãos, amigos e toda família, por compreenderem a distância que foi necessária para galgar esse degrau em minha vida, pela compreensão dos momentos de ausência e exclusão, por dividirem comigo os momentos de alegria e me apoiarem incondicionalmente. Amo todos vocês!

Esta dissertação ou tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	8
LISTA DE TABELAS.....	9
LISTA DE SIGLAS.....	10
RESUMO.....	12
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Resistência antimicrobiana	16
1.2 <i>S. aureus</i> no Brasil.....	21
1.3 <i>S. aureus</i> no paciente hepatopata	22
1.4 Identificação de MRSA	24
1.5 Prevenção de infecção por MRSA.....	26
1.6 Caracterização Molecular de MRSA.....	27
1.7 Justificativa.....	30
2 OBJETIVOS.....	31
2.1 Objetivo geral	32
2.2 Objetivos específicos.....	32
3 MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1 Coleta de material e identificação fenotípica e genotípica de portadores de MRSA.....	35
3.1.1 Coleta de material clínico	35
3.1.2 Identificação fenotípica	37
3.1.3 Identificação genotípica de amostras clínicas	38
3.1.4 Perfil de sensibilidade de isolados MRSA.....	39
3.1.5 Caracterização genotípica de isolados MRSA.....	40
3.2 Caracterização e tipagem molecular de MRSA.....	40
3.2.1 Caracterização de SCC <i>mec</i>	40

3.2.2	Análise do polimorfismo do DNA por eletroforese de campo pulsado (PFGE).....	41
3.2.3	Tipagem molecular por <i>spa typing</i>	42
3.3	Análise dos dados obtidos.....	43
4	RESULTADOS.....	47
4.1	População estudada.....	47
4.2	Coleta de material.....	47
4.3	Caracterização fenotípica de amostras clínicas	48
4.3.1	Cultura microbiológica.....	48
4.3.2	Determinação da Concentração Inibitória Mínima de isolados MRSA.....	49
4.4	Caracterização genotípica diretamente de amostras clínicas.....	50
4.4.1	Detecção de genes 16S rRNA diretamente de amostras clínicas.....	50
4.4.2	Detecção do gene <i>coA</i> e gene <i>mecA</i> diretamente de amostras clínicas....	51
4.4.3	Caracterização do SCC <i>mec</i> diretamente de amostras clínicas.....	54
4.5	Técnicas genotípicas dos isolados identificados como MRSA por cultura microbiológica	55
4.5.1	Detecção dos genes <i>coA/MecA</i> e caracterização de SCC <i>mec</i> em isolados identificados como MRSA por cultura microbiológica.....	55
4.5.2	Análise do polimorfismo do DNA por eletroforese em campo pulsado (PFGE) identificados como MRSA por cultura microbiológica.....	57
4.5.3	<i>spa typing</i> de isolados identificados como MRSA por cultura microbiológica.....	61
5	DISCUSSÃO.....	66
6	CONCLUSÕES.....	77
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	78
	ANEXOS.....	79
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Desenho esquemático de SCCmec, tipo I ao XI.....	18
Figura 2 – Fluxograma do estudo.....	45
Figura 3 – PCR do gene 16S rRNA de amostras clínicas coletadas de pacientes hepatopatas acompanhados no HC-FMUSP.....	51
Figura 4 – PCR para detecção dos genes <i>coA</i> (117bp) e <i>mecA</i> (214bp) de amostras clínicas coletadas de pacientes hepatopatas acompanhados no HC-FMUSP.....	51
Figura 5 – Distribuição dos tipos de SCCmec dos 44 isolados de MRSA de colonização obtidos de pacientes hepatopatas e transplantados hepáticos do HC-FMUSP, no período de 2010 à dezembro de 2011.....	56
Figura 6 – PCR multiplex para determinação do tipo de SCCmec em amostras de <i>S. aureus</i> isolados em pacientes hepatopatas.....	57
Figura 7 – Representação do perfil molecular predominante dos isolados de MRSA.....	58
Figura 8 – Perfis moleculares encontrados em isolados de MRSA.....	58
Figura 9 – Dendrograma de 32 isolados MRSA.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tipos de <i>SCCmec</i> descritos em MRSA até 2013.....	19
Tabela 2 – Estudos com tipagem de <i>SCCmec</i> realizados no Brasil.....	22
Tabela 3 – Sequência do <i>primer</i> utilizado na PCR para rRNA 16S.....	38
Tabela 4 – Iniciadores empregados na reação de M-PCR para detecção de genes <i>coA</i> e <i>mecA</i> para triagem de isolados MRSA.....	39
Tabela 5 – Sequência dos <i>primers</i> utilizados para PCR multiplex para determinação dos tipos de <i>SCCmec</i>	41
Tabela 6 – Sequência dos <i>primers</i> utilizados para PCR usada na amplificação da região polimórfica X do gene <i>spa</i>	43
Tabela 7 – Análise de características de 190 pacientes hepatopatas submetidos à pesquisa de portadores de <i>S. aureus</i> resistente à oxacilina, atendidos na unidade de Fígado do HC-FMUSP.....	47
Tabela 8 – Total de <i>swabs</i> nasais e inguinais coletados de 190 pacientes hepatopatas acompanhados no HC-FMUSP, no período de agosto de 2010 à dezembro de 2011	48
Tabela 9 – Resultados das culturas bacteriológicas obtidas dos 190 pacientes hepatopatas acompanhados no HC-FMUSP, no período de agosto de 2010 à dezembro de 2011.....	49
Tabela 10 – Atividade antimicrobiana em 43 isolados MRSA de pacientes hepatopatas (isolados de colonização).....	50
Tabela 11 – Comparação entre os resultados das culturas dos <i>swabs</i> nasais e amplificações dos genes 16S rRNA, <i>coA</i> e <i>MecA</i> dos 190 pacientes hepatopatas acompanhados no HC-FMUSP, no período de agosto de 2010 à dezembro de 2011.....	53
Tabela 12 – Distribuição dos tipos de <i>SCCmec</i> em 245 amostras clínicas de <i>swab</i> nasal e inguinal coletadas de 126 pacientes hepatopatas acompanhados no HC-FMUSP no período de agosto de 2010 à dezembro de 2011.....	55
Tabela 13 – Distribuição e comparação entre os tipos de <i>spa</i> e o perfil das sequências de repetições de 32 isolados MRSA.....	62
Tabela 14 – Distribuição dos 32 isolados analisados quanto ao <i>SCCmec</i> , tipagem do gene <i>spa</i> e classificação do PFGE.....	64

LISTA DE SIGLAS

BDSA	Becton Dickinson GeneOhm StaphSR Assay
BEC	Brazilian Endemic Clonal
BECC	Brazilian Endemic Clonal Complex
BHI	Brain Heart Infusion
CA-MRSA	Community Acquired - Methicilin Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical Laboratory Standards Institute</i>
ccr	cassette chromosome recombinase
DNA	Deoxyribonucleic Acid
HA-MRSA	Hospital Acquired - Methicilin Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
ICS	Infecção de Corrente Sanguínea
IRAS	Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
LIM	Laboratórios de Investigação Médica
MELD	Model for End-stage Liver Disease
MRSA	Methicillin Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
MSSA	Methicillin Sensitive <i>Staphylococcus aureus</i>
MLST	Multi Locus Sequence Typing
M-PCR	Multiplex-Polymerase Chain Reaction
PBP	Penicillin Binding Protein
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis
PFT	Pulsed Field Type
PVL	Panton Valentine leukocidin
RNAr	Ribonucleic Acid ribossomal
RSA	Roche <i>Staphylococcus aureus</i> Kit
SCCmec	Staphylococcal Cassette Chromosome <i>mec</i>
SCN	<i>Staphylococcus</i> Coagulase Negativo
SSI	Surgical Site Infection

SSR	Short Sequence Repeat
SXT	Sulfametoxazol-Trimetoprim
TBE	Tris-Borato EDTA
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean

RESUMO

Oliveira LM. *Detecção e caracterização molecular de Staphylococcus aureus metilicina resistente em amostras de pacientes hepatopatas* [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2014.

Introdução: *Staphylococcus aureus* é um patógeno que frequentemente coloniza pacientes cirróticos e transplantados de fígado. A colonização por *S. aureus* aumenta o risco de infecções invasivas por MRSA (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*) o que aumenta a duração da hospitalização, os custos, a morbidade e a mortalidade. Com isso, é de grande importância o desenvolvimento de estratégias para identificação rápida, prevenção e controle de MRSA nesta população de pacientes. **Objetivos:** detectar MRSA em pacientes hepatopatas e descrever as características fenotípicas e moleculares de isolados MRSA neste grupo de pacientes. **Metodologia:** swabs nasais e inguinais foram coletados de 126 pacientes pré-transplante e 64 pacientes transplantados de fígado. Os swabs foram destinados para cultura microbiológica e também para extração direta de DNA. Foi determinada a Concentração Inibitória Mínima de 10 antimicrobianos de todos os isolados MRSA os quais também foram submetidos à caracterização de SCCmec, PFGE e *spa typing*. Amostras de DNA também foram submetidas à PCR 16S, M-PCR *coA/mecA* e caracterização de SCCmec. **Resultados:** de acordo com a cultura microbiológica 12% dos swabs cultivados apresentaram crescimento de MRSA, resultando em 44 isolados MRSA. Todos os isolados foram resistentes à oxacilina, penicilina e sensíveis à vancomicina; todos amplificaram os genes *coA* e *mecA*; SCCmec tipo II e *spa* t002 predominaram nos dois grupos de estudo; além disso houve um cluster entre os isolados, o qual foi relacionado ao clone New York/Japan. O Clone Endêmico Brasileiro (BEC) foi relacionado somente à 4 isolados pós-transplante. 98% das amostras de DNA amplificaram o gene 16S; a M-PCR identificou a presença de MRSA em 71% amostras de DNA e 61% das amostras tiveram a caracterização de SCCmec. O SCCmec tipo II predominou nos dois grupos de estudo. **Conclusão:** uma alta proporção de pacientes hepatopatas está colonizada com MRSA. Pacientes transplantados de fígado foram mais colonizados que pacientes cirróticos pela cultura microbiológica. A M-PCR *coA/mecA* diretamente de swabs foi mais sensível que a cultura microbiológica para identificar MRSA. Além disso, o PFGE demonstrou ter maior poder discriminatório que *spa typing* e não houve uma boa concordância entre os padrões de PFGE e *spa types*. Este estudo também demonstrou que está havendo uma mudança de clones MRSA em nosso hospital, devido à substituição do clone BEC pelo clone NY/Japan na última década.

Descritores: 1. Infecção hospitalar 2. Colonização 3. *Staphylococcus aureus* metilicina resistente 4. Hepatopatas 5. Transplante de fígado 6. Caracterização molecular

ABSTRACT

Oliveira LM. *Detection and molecular characterization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in samples of patients with liver disease* [dissertation]. Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2014.

Introduction: *Staphylococcus aureus* is a pathogen that frequently colonizes cirrhotic and also liver transplanted patients. The *S. aureus* colonization increases the risk of invasive infections by MRSA (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*) that increases the duration of hospitalization, costs, morbidity and mortality. Thus, it is of great importance to develop strategies for early identification, prevention and control of MRSA in this population of patients. **Objectives:** to detect MRSA in patients with liver diseases, in addition to observe the phenotypic and molecular characteristics of MRSA isolates in this group of patients. **Methods:** nasal and groin swabs were collected from 126 patients pre-transplant and 64 liver transplanted patients. The swabs were designed to microbiological culture and also to direct extraction of DNA. Determined the Minimum Inhibitory Concentration of 10 antimicrobials of all MRSA isolates which were also submitted to M-PCR of *coA/mecA*, characterization of *SCCmec*, PFGE and *spa* typing. DNA samples were also submitted to PCR of 16S, M-PCR of *coA/mecA* and characterization of *SCCmec*. **Results:** according to microbiological culture, 12% of swabs showed growth of MRSA, resulting in 44 MRSA isolates. All isolates were resistant to oxacillin, penicillin and vancomycin susceptible; all amplified the *coA* and *mecA* genes; *SCCmec* type II and *spa* t002 predominated in both groups; in addition there was a cluster among isolates, which was related to clone New York / Japan. Furthermore Brazilian Endemic Clone (BEC) was also related to 4 post transplantation isolates. 98% of DNA samples amplified 16S gene; M-PCR identified the presence of MRSA in 71% of DNA samples and 61% of the samples had the characterization of *SCCmec*. *SCCmec* type II was predominant in the two study groups. **Conclusion:** a high proportion of patients with liver disease are colonized with MRSA. Liver transplant patients are more colonized than cirrhotic patients by culture method. M-PCR *CoA / mecA* directly from swabs was more sensitive than microbiological culture to identify MRSA. Moreover, the PFGE shown to have a higher discriminatory power than *spa* typing and there was no good concordance between PFGE patterns and *spa* types. This study also demonstrated that there is a change of MRSA clones in our hospital, due to the replacement of the clone BEC by NY/Japan clone in the last decade.

Descriptors: 1.Nosocomial infection 2.Colonization 3.Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* 4.Liver disease 5.Liver transplant 6.Molecular characterization

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Os seres humanos são considerados reservatórios naturais de micro-organismos entre eles; *Staphylococcus sp*, *Neisseria sp*, *Streptococcus sp*, *Candida sp*, enterococos. Estes micro-organismos geralmente são adquiridos ao nascer, mas padrões alimentares, condições sanitárias, higiene pessoal, hospitalização e utilização prolongada e indiscriminada de antimicrobianos são fatores determinantes dessa colonização (Murray et al., 1999; Ricardo, 2004; Hidron et al., 2005).

Nesse cenário, encontramos o *Staphylococcus sp*; micro-organismo que tem como principais sítios de colonização a pele, as membranas mucosas, as vias aéreas superiores, o trato gastrointestinal e o períneo (Ricardo, 2004).

O gênero *Staphylococcus* é composto por 33 espécies das quais somente 17 podem ser isoladas em humanos e são divididas em dois grandes grupos: Estafilococos Coagulase Negativo (SCN) e Estafilococos coagulase positivo, cujo principal representante é o *Staphylococcus aureus* (Kloss, Bannerman, 1995).

S. aureus é uma bactéria em forma esférica (cocos), gram-positiva não esporulada, que em aglomerados microscópicos apresentam-se em formato semelhante a cachos de uvas. É anaeróbia facultativa, imóvel e em meio sólido suas colônias podem apresentar pigmentação amarela embora algumas colônias também podem ser brancas ou acinzentadas. Além disso, algumas cepas de *S. aureus* após incubação, produzem uma zona difusa de β -hemólise ao redor da colônia (Kloss, Bannerman, 1995).

Indivíduos saudáveis são normalmente portadores de *S. aureus*, pois este micro-organismo faz parte da microbiota que coloniza em geral as vias nasais, podendo também ser encontrado em vários outros locais, incluindo pele, cavidade oral e trato gastrointestinal. Mais de 30% dos humanos são persistentemente colonizados por *S. aureus* e mais de 70% sofrem colonização intermitente, mantendo-se assintomáticos. Entretanto, *S. aureus* não é só um dos patógenos que coloniza o homem mas também um importante patógeno oportunista que pode causar infecções (Stapleton, Taylor, 2002; O'brien, 2009).

As infecções causadas por *S. aureus* incluem infecções de pele e tecidos moles, pneumonia, mastite, doenças toxinogênicas (síndrome estafilocócica da pele

escaldada ou doença de Ritter, síndrome estafilocócica do choque tóxico), osteomielite, pneumonia, endocardite e outras doenças graves (Cosgrove et al., 2003; Velasco et al., 2005; Boucher et al., 2010); além disso é importante causa de bacteremia adquirida na comunidade e de infecções relacionadas a assistência a saúde com altas taxas de morbidade e mortalidade (Keynan, Rubinstein, 2013). *S. aureus* também pode causar intoxicação alimentar, por produzir enterotoxinas (Klebens et al., 2007).

Uma grande preocupação da comunidade médica é a diversidade de fatores de virulência presentes no *S. aureus* que contribui para sua aderência, colonização e capacidade de invadir tecidos. Outros fatores relacionados ao arsenal patogênico do *S. aureus* são substâncias que aumentam a resposta inflamatória, enganam o sistema de defesa do hospedeiro além de toxinas que resultam em doenças específicas (Efuntoye, Adetosoye, 2003; Salgado et al., 2004).

Entretanto, não somente fatores de virulência mas também diversos mecanismos de resistência (intrínsecos ou adquiridos) a vários agentes antimicrobianos podem ser encontrados em *S. aureus*.

1.1 Resistência antimicrobiana

Desde a descoberta da penicilina e sua ampla utilização a partir de 1940, a resistência aos beta-lactâmicos começou a se desenvolver (Turlej et al., 2011). A primeira descrição de um isolado *S. aureus* resistente à penicilina ocorreu em 1942, oriundo de um paciente hospitalizado (Rammelkamp, Maxon, 1942), porém no final da década de 60, cerca de 80% de isolados de *S. aureus* apresentavam resistência à penicilina (Jessen et al., 1969). Do mesmo modo, em 1959, a meticilina foi liberada para tratar infecções causadas por *S. aureus* resistentes à penicilina e dois anos após, em 1961 houve a descrição no Reino Unido e anos depois em 1968 também foi descrito nos Estados Unidos isolados de *S. aureus* que adquiriram resistência à meticilina devido a aquisição do gene *mecA* (Jevons, 1961; Barrett et al., 1968).

Isolados Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) foram, ao longo do tempo, relatados em outros países europeus, Japão, Austrália, e atualmente

encontram-se disseminados pelo mundo (Centers for Disease Control and Prevention, 1999; Hussain et al., 2000; Tulej et al., 2011).

Três mecanismos são conhecidos para a resistência do *Staphylococcus aureus* para as penicilinas: produção de β -lactamases, modificação de proteínas PBP (*Penicillin Binding Protein*), e presença de uma proteína de ligação à penicilina adquirida (PBP2a) sendo este último mecanismo o responsável pela resistência à meticilina e o mais frequente em isolados clínicos (Palavecino, 2007). Atualmente, mais de 90% dos isolados de *S. aureus* nosocomiais e comunitários são produtores de penicilinas e também resistentes à outras classes de antibióticos como macrolídeos, estreptomicinas e tetraciclina (Lowy, 2003; Emaneini et al., 2013).

O MRSA se difere de um *S. aureus* sensível à meticilina (MSSA) pela presença do gene *mecA*, o qual codifica uma PBP anormal, a PBP2a que possui baixa afinidade com esta classe de antibióticos e permite o crescimento e divisão do micro-organismo mesmo na presença de meticilina e demais beta-lactâmicos (penicilinas, penicilinas resistentes à penicilinas, carbapenems, aztreonam, cefalosporinas) (Chambers, 1998; Mulligan et al., 1993; Vidal et al., 2009).

O gene *mecA* está localizado juntamente com os seus genes regulatórios *mecI* e *mecR* dentro de um *mec* operon conhecido como complexo *mec* (Berger-Bachi, Rohrer, 2002). O complexo *mec* é parte de uma extensa região, um elemento móvel conhecido como “Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*)” (Ito et al., 2001; Oliveira et al., 2002). Além do complexo *mec*, o SCC*mec* é composto por outro componente genético essencial: o complexo *ccr* (“cassette chromosome recombinase”) cuja função é a integração e excisão do SCC*mec* no genoma de *S. aureus*. O restante do DNA deste elemento móvel é denominado região “J” (*junkyard* em inglês), sem função conhecida (Ito et al., 1999; Vidal et al., 2009). Desta forma, o tipo de SCC*mec* é definido pela classe do complexo *mec* e pelo tipo do complexo *ccr* (Hiramatsu et al., 2013), como pode ser observado na Figura 1.

Figura 1 – Desenho esquemático de SCCmec, tipo I ao XI

A localização do complexo *mec* e classe está representada pela cor rosa e a localização da *ccr* e tipo está representada pela cor azul. Sequências de inserção e transposons estão indicados em amarelo. Adaptado de Hiramatsu et al., 2013.

A inserção de diferentes elementos genéticos dentro do *SCCmec* acarreta no surgimento de diferentes tipos de *SCCmec* os quais são atualmente classificados em tipos e subtipos (Enright et al., 2002; Berglund et al., 2008; Soge et al., 2009; Zhang et al., 2009; Hiramatsu et al., 2013).

Um levantamento recente na literatura feito por Turlej et al. (2011) identificou 11 tipos de *SCCmec* já descritos entretanto outros novos tipos são esperados no futuro (Tabela 1).

Tabela 1 – Tipos de *SCCmec* descritos em MRSA até 2013

Tipo de <i>SCCmec</i>	Origem e ano de isolamento	Descrição
I	Reino Unido 1961	(Ito et al., 2001)
II	Japão 1982	(Ito et al., 1999)
III	Nova Zelandia 1985	(Ito et al., 2001)
Iva	USA 1999	(Ma et al., 2002)
Ivb	USA 1996	(Ma et al., 2002)
Ivc	Japão NI*	(Ito et al., 2003)
Ivd	Japão 1982	(Ma et al., 2006)
Ivg	Coreia 2003	(Kwon et al., 2005)
IVh	Finlandia 2002	(Milheirico et al., 2007)
Ivi	Suécia 1999	Berglund et al., 2009)
Ivj	Suécia 1990	(Berglund et al., 2009)
V	Austrália 1999	(Ito et al., 2004)
VI	Portugal 1996	(Oliveira et al., 2006a)
VII	Suécia 2002	(Berglund et al., 2008)
VIII	Canadá 2003	(Zhang et al., 2009)
IX	Tailandia 2006	(Li et al., 2011)
X	Canadá 2006	(Li et al., 2011)
XI	NI*	(http://www.sccmec.org)

*NI : Não informado

Adaptado de Turlej et al (2011).

Algumas características clínicas e epidemiológicas relacionadas aos tipos de *SCCmec* mostram que os *SCCmec* tipos I, II e III estão associados a cepas de MRSA de origem hospitalar, conhecidas como HA-MRSA (Hospital Acquired –

Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*) e têm como característica a resistência a múltiplos antimicrobianos além dos beta-lactâmicos, como os macrolídeos, aminoglicosídeos, tetraciclina, rifampicina, cotrimoxazol, e quinolonas (Hiramatsu et al., 1999). Essa multiresistência se deve à adição de genes de resistência aos cassetes, tais como: pUB110 que codifica a resistência a vários aminoglicosídeos, por exemplo, canamicina, tobramicina, e bleomicina; pl258 o qual confere resistência à penicilina e metais pesados, tais como o mercúrio; pT181 que atribui resistência à tetraciclina; o transposon Tn554 que abriga o gene *ermA* o qual confere resistência induzida e constitutiva à macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas; e Ψ Tn554 que codifica a resistência ao cádmio (Deurenberg, Stobberingh, 2008) (Figura 1).

Muitos isolados de MRSA que apresentam múltipla resistência são susceptíveis apenas aos glicopeptídeos como a vancomicina. Por outro lado, o SCC*mec* tipo IV, frequente nos isolados da comunidade, não possui nenhum outro determinante de resistência a antimicrobianos, além do gene *mecA*; o que explica uma das principais características dos isolados comunitários de MRSA, a qual é a sensibilidade a diversos antimicrobianos não beta-lactâmicos (Oliveira, de Lencastre, 2002; Enright et al., 2002; Okuma et al., 2002). Cepas de MRSA associadas à infecção comunitária, conhecidas como CA-MRSA (Community Acquired - Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*), têm apresentado maior virulência, com manifestações graves de doenças quando comparadas com as cepas associadas às infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) (Baba et al., 2002). Esta característica parece estar associada com a expressão de genes de virulência como a toxina *Panton Valentine Leukocidin* (PVL) (Dufour et al., 2002; Kobayashi, DeLeo, 2009). Entretanto, alguns estudos relatam a ocorrência de cepas com alta virulência que não expressam a PVL. Por outro lado, estudos também demonstram baixa prevalência de PVL em isolados de CA-MRSA (von Eiff et al., 2004; Van Belkum, 2009).

De qualquer forma, há uma mudança na epidemiologia de MRSA e nota-se que, devido a uma série de medidas de controle e erradicação, houve uma redução de incidência deste patógeno no ambiente hospitalar nos últimos anos. Por outro lado houve um aumento da incidência de MRSA na comunidade, com aumento de mortalidade e dos custos relacionados à infecção (Holzknecht et al., 2010).

Zhang et al. (2005) desenvolveram um método de identificação de *SCCmec* rápido, simples e prático por meio da técnica de M-PCR (Multiplex-Polymerase Chain Reaction) que facilita a caracterização dos mais frequentes tipos e subtipos de *SCCmec*. Outros autores também desenvolveram técnicas de M-PCR para caracterização de *SCCmec* (Ito et al., 2001; Oliveira et al., 2002; Hisata et al., 2005; Kondo et al., 2007). Embora esses métodos sejam utilizados para a identificação de *SCCmec* no mundo todo, os mesmos também apresentam dificuldade de determinar o tipo de *SCCmec* em alguns isolados (Turlej et al., 2011).

1.2 *S. aureus* no Brasil

De acordo com um estudo multicêntrico realizado no Brasil, *S. aureus* é responsável por cerca de 20% das infecções hospitalares de corrente sanguínea (ICS), principal patógeno causador de infecções da pele e de tecidos moles, e segundo patógeno mais frequentemente isolado de pacientes com infecção do trato respiratório inferior (Gales et al., 2009).

Nos últimos anos alguns estudos Brasileiros com caracterização de *SCCmec* vêm sendo descritos na literatura, dos quais alguns podem ser observados na Tabela 2.

Com exceção dos estudos performados por Lamaro-Cardoso et al. (2009) e Vieira et al. (2014) nos quais os isolados MRSA eram de origem comunitária, todos os outros estudos relatados na tabela 2 avaliaram isolados MRSA de origem hospitalar. É possível notar que o *SCCmec* tipo III foi predominante na maioria dos estudos até mesmo em isolados de origem comunitária. Por outro lado, o *SCCmec* tipo IV também foi encontrado em grande parte dos estudos, inclusive em isolados de origem hospitalar (tabela 2).

Tabela 2 – Estudos com tipagem de SCCmec em isolados de MRSA realizados no Brasil

Ano do estudo	Localidade	Número de isolados MRSA	Tipo de SCCmec	Referências
1998-2008	Uberaba-MG	104	92% III 8% I	(Teixeira et al., 2012)
2002-2003	São Paulo-SP	223	84% III 14% IV	(Trindade et al., 2005)
2002-2006	Botucatu-SP	46	89% III 11% IV	(Martins et al., 2014)
2004-2006	Natal-RN	45	73% III 11% IV	(Sousa-Junior et al., 2009)
2004-2007	Rio de Janeiro-RJ	99	63% III 23% IV 14% II	(Cabloco et al., 2013)
2004-2007	São Paulo-SP	39	49% III 41% IV 8% II	(Mimica et al., 2012)
2005	São Paulo-SP	71	64% IV 35% III	(Pacheco et al., 2011)
2005	Goiânia-GO	14	64% III 29% IV 7% V	(Lamaro-Cardoso et al., 2009)
2006-2009	Bauru-SP	96	95% III	(Rodrigues et al., 2013)
2006-2007	Porto Alegre-RS	34	59% III 35% I 6% IV	(Santos et al., 2010)
2007-2008	Goiânia-GO	8	50% III 50% IV	(Vieira et al., 2014)
2010	São Paulo-SP	50	60% II 16% IV 10% III 6% I	(Caiaffa-Filho et al., 2013)

1.3 *S. aureus* no paciente hepatopata

Alguns estudos demonstram que, frequentemente, o paciente cirrótico é portador nasal de *S. aureus* (Chapoutot et al., 1999; Kuehnert et al., 2006). Outro achado interessante é a incidência de colonização por MRSA em pacientes hepatopatas e transplantados hepáticos. Muitos estudos também já evidenciaram que a colonização por *S. aureus* geralmente precede infecções invasivas por esse agente.

Uma recente revisão de colonização em transplantes de órgãos sólidos mostrou que, entre estudos publicados, a colonização de MRSA variou de 0,1%-27,1% em pacientes pré transplante e 1,3%-22,7% em pacientes pós transplante. Entre os estudos analisados, 74% dos estudos tratavam-se de transplantes hepáticos. A colonização estimada de MRSA foi de 8,5% em pacientes pré transplante de fígado e 9,4% em pacientes pós transplante de fígado. Além disso, o estudo também demonstrou que colonização pré transplante e pós transplante aumenta significativamente o risco para infecções por MRSA (Ziakas et al., 2014).

Esses achados estão claramente relacionados à disfunção no mecanismo de defesa do hospedeiro como diminuição da quimiotaxia, e da atividade oxidativa da fagocitose, assim como uso de agentes imunossupressores; fatores comuns em pacientes com doença hepática avançada (Bailey et al., 1976; Fagiuoli et al., 2013).

Além disso, esses estudos são similares à outras casuísticas que evidenciam que colonização por MRSA é um fator de risco para infecção, assim como para transmissão para outros pacientes e profissionais da saúde (Nasia et al., 2008; Stevens et al., 2010).

Um estudo realizado em pacientes saudáveis constatou que 32,4% e 0,8% da população geral é normalmente colonizada por *S. aureus* e MRSA, respectivamente (Kuehnert et al., 2006). Em contrapartida, outro estudo demonstrou que 46% de 84 pacientes cirróticos eram portadores nasais de *S. aureus*, sendo 29% desses resistentes a oxacilina. Pacientes cirróticos portadores nasais de *S. aureus* desenvolveram mais frequentemente infecções por *S. aureus* do que os não portadores (Chang et al., 1998).

Paterson et al. (2003) avaliaram a cultura de *swab* nasal realizada em 70 pacientes transplantados hepáticos e demonstraram que 44% dos pacientes eram portadores nasais de *S. aureus* resistente a oxacilina.

Desai et al. (2003) constataram que em 374 pacientes à espera de transplante hepático, 157 (41,9%) estavam colonizados por MRSA. Esses pacientes foram submetidos ao transplante e 35 pacientes permaneceram colonizados. Nesse estudo observou-se ainda que a proporção de infecções pós-transplante por MRSA foi significativamente maior no grupo dos pacientes colonizados por MRSA comparado àqueles não colonizados, 35% e 9%, respectivamente.

Losada et al. (2002), evidenciaram em seu estudo com 149 pacientes transplantados hepáticos, infecção em 73%, sendo infecção bacteriana a mais freqüente (49%) seguida de infecção viral (35%) e infecção fúngica (10%). As bactérias Gram-positivas foram as mais comuns, responsáveis por 77% das infecções, e 68% dessas infecções foram causadas por MRSA. Outro estudo com 133 pacientes transplantados hepáticos mostrou que 37% desenvolveram infecção de sítio cirúrgico, sendo que 51% evoluíram com bacteremia secundária. *S. aureus* foi isoladamente o agente mais freqüente seguido por Enterobactérias e *P. aeruginosa* (Linuma et al., 2004).

Um estudo mais recente com 704 pacientes transplantados hepáticos mostrou que 29,1% dos pacientes tiveram infecção de corrente sanguínea, 19,8% das ICS provocadas por *S. aureus*, entre eles, 50% eram meticilina resistentes (Bert et al., 2010). Florescu et al. (2011) encontraram em estudo de 51 pacientes transplantados hepáticos 47% de infecções por MRSA.

Para prevenir infecção por MRSA e a transmissão desse agente são necessárias medidas de identificação precoce e isolamento de pacientes colonizados por MRSA. Outros potenciais benefícios da identificação de MRSA incluem: descolonização e profilaxia pré-operatória para prevenir SSI (*Surgical Site Infection*) (Smith, Dahlen, 2013); e evitar o isolamento desnecessário de pacientes de risco quando eles não estão colonizados (Harbarth et al., 2006).

1.4 Identificação de MRSA

Muitas opções existem atualmente para a triagem de MRSA, cada uma delas com suas características e diferentes desempenhos como, por exemplo, a cultura convencional em meios clássicos de cultura a qual é barata mas demora cerca de 3 dias para liberar o resultado ; ágars cromogênicos os quais demoram entre 24-48h; técnicas de aglutinação em látex para detecção de proteína A e fator de coagulação; e testes rápidos de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) que duram poucas horas, são mais sensíveis, porém tem um alto custo (Robotham et al., 2011). Além disso, ensaios rápidos com PCR *Real-Time* como o *Rapid Xpert* MRSA (Cepheid, USA) têm sido mundialmente utilizados, entretanto também possuem limitações (Rossney et al., 2008; Stürenburg, 2009).

Entre os métodos convencionais de laboratório para a detecção de sensibilidade de *S. aureus* podemos citar testes de disco difusão, teste de concentração inibitória mínima por microdiluição em caldo; E-teste e teste de triagem em ágar de oxacilina; os quais são recomendados pelo CLSI (*Clinical Laboratory Standards Institute*; documento M100-S22, 2011). Apesar dos métodos de identificação já serem padronizados e usados no mundo todo, muitos estudos destacam as dificuldades e as limitações na identificação laboratorial de MRSA com o uso de métodos manuais ou automatizados. (Mulligan et al., 1993; Chambers, 1998). Muitas questões controversas, entretanto, ainda cercam o desenvolvimento de recomendações para a triagem e diagnóstico clínico de colonização e infecção por MRSA (Harbarth et al., 2006).

Embora a cultura microbiológica seja considerada como método padrão-ouro para determinação de colonização por MRSA, sua sensibilidade é questionada por alguns pesquisadores. Alguns estudos mostram que métodos moleculares baseados em PCR são mais sensíveis que a cultura convencional, pois permitem amplificar e, portanto detectar genes específicos de *S. aureus*, como o *gene coA* (Francois et al., 2003; Laurent et al., 2010).

Alguns métodos para identificação de MRSA baseados em PCR já foram desenvolvidos. Estes métodos não costumam incluir cultura bacteriana, permitindo a identificação diretamente de material clínico com resultados no intervalo de 1-5 horas. As primeiras tentativas para detectar MRSA diretamente de amostras clínicas foram aperfeiçoadas a partir de protocolos para detectar o gene *mecA* de culturas puras. Como amostras clínicas muitas vezes podem conter *Estafilococos coagulase*

negativo além de *S. aureus* e ambos podem conter o gene *mecA*; somente a detecção do gene *mecA* não é suficiente. Desta forma, testes moleculares que incluem genes que diferenciam SCN de MRSA têm sido propostos, como metodologia mais sensível e rápida para a identificação de MRSA (Stürenburg, 2009).

Kearns et al. (1999) desenvolveram uma M-PCR para identificar *S. aureus* por meio da amplificação do gene *coA* (gene da coagulase, intrínseco de *S. aureus*) e identificar a resistência à metilicina por meio da amplificação do gene *mecA* (característico da resistência à metilicina) em um teste único, com intervalo de uma hora e meia. Os autores obtiveram distinção correta entre os isolados de *S. aureus* sensíveis e resistentes, e também diferenciação entre isolados de *S. aureus* e *Estafilococos* coagulase negativo. Desta forma, concluíram que este teste rápido pode ser confiável para a identificação de MRSA, e pode ser usado para uma situação onde a identificação conclusiva de um isolado de *S. aureus* fosse urgente (Kearns et al., 1999).

Em um trabalho realizado por Andriesse et al. (2009) foram comparadas duas técnicas baseadas na PCR, RSA (*Roche Staphylococcus Kit on Lightcycler 2.0*) e BDSA (*Becton Dickinson GeneOhm StaphSR assay on Smartcycler*) com a cultura microbiológica convencional. Segundo estes autores, essas técnicas podem ser de grande utilidade na detecção de portadores nasais, pois permitem resultados com boa sensibilidade (82% e 86,5%, respectivamente) num curto período de tempo, cerca de 2 horas.

A detecção rápida de MRSA por meio de PCR pode oferecer muitas vantagens como: reduzir a transmissão hospitalar de MRSA para pacientes de alto risco e custo de precaução de contato (Stürenburg, 2009; Honda et al., 2010).

1.5 Prevenção de infecção por MRSA

Medidas de prevenção são fortes ferramentas para evitar infecção além de contribuírem para a diminuição da transmissão de agentes infecciosos no ambiente hospitalar.

Através de uma revisão de literatura, Schweizer et al. (2013) demonstraram a eficácia da descolonização nasal para redução de Infecção de Sítio Cirúrgico por Gram-Positivos após cirurgias cardíacas e ortopédicas. Em pacientes previamente colonizados por MRSA, Jog et al. (2008) concluíram em seu estudo que, quando estendido o período de descolonização para cinco dias com mupirocina e triclosan e substituído os antibióticos pré-operatórios para gentamicina e flucloxacilina houve uma significativa redução de infecções pós cirúrgicas causadas por MRSA. Como estratégias de prevenção, Lee et al. (2013) promoveram a higienização das mãos e além disso, screening universal para MRSA com precaução de contato e descolonização de portadores de MRSA em alguns hospitais. O estudo demonstrou que nos hospitais onde as duas estratégias foram combinadas houve redução em 12% das culturas clínicas de MRSA e que screening, precaução de contato e descolonização de portadores de MRSA foram eficazes em centros cirúrgicos onde as culturas clínicas de MRSA reduziram 15% e também houve uma significativa redução nas taxas de infecção por esse agente. Detectar precocemente a presença de portadores de MRSA pode ter impacto no controle e prevenção de infecções hospitalares por este agente também em unidades de transplante. Um estudo de coorte retrospectivo de 323 pacientes transplantados hepáticos evidenciou que 63 (19.5%) desenvolveram infecção por *S. aureus*. Os fatores de risco associados com infecção por *S. aureus* na análise multivariada foram colonização nasal por *S. aureus* resistente a oxacilina (OR 20, 9; 95% IC 6,2-70,1; $p < 0,001$) e *S. aureus* sensível a oxacilina (OR 3,4; 95% IC 1,7-6,8; $p = 0,004$), cirrose alcoólica (OR 2,4; IC 95% 1,2-4,8; $p = 0,01$) e diminuição do tempo de protrombina (OR 1,2; IC 95% 1,03-1,3; $p = 0,01$). A tipagem molecular mostrou que em 86.7% de 15 pacientes, o isolado do sítio infectado foi idêntico ou fortemente relacionado ao isolado nasal (Bert et al., 2005).

1.6 Caracterização Molecular de MRSA

Durante as últimas décadas, diversos métodos de tipagem foram desenvolvidos para o monitoramento e rastreamento da disseminação de clones de

MRSA pelo mundo. Esses métodos são ferramentas úteis para o estudo da origem das cepas, relação clonal e epidemiologia de surtos (Shopsin et al., 1999).

Entre eles, um método que é muito utilizado é a amplificação e sequenciamento do gene *spa*, conhecido como *spa typing*. Esse gene produtor da proteína A (proteína de adesão encontrada em *S. aureus*, capaz de bloquear a função fagocítica das células imunes) contém uma região polimórfica, chamada região X (Aires-de-Sousa et al., 2006; Kahl et al., 2007). Esse polimorfismo é decorrente de mutações, deleções e duplicações as quais o gene é vulnerável (Shopsin et al., 1999). Os métodos de tipagem do gene *spa* são baseados na identificação da variação das sequências da região polimórfica X do gene *spa* em *S. aureus*. Como o *spa typing* envolve apenas um único gene, a técnica é mais barata, menos trabalhosa e mais rápida que outras técnicas de tipagem molecular como o *Pulsed field gel electrophoresis* (PFGE) e *Multi-Locus Sequence Typing* (MLST). Outra vantagem é possuir um banco de dados *on-line* com um pacote de softwares que compartilham e analisam as sequências já encontradas no mundo todo. Atualmente aproximadamente 310331 cepas de *S. aureus* de 53 países do mundo foram tipadas usando o *spa typing* em 14172 tipos diferentes (<http://www.spaserver.ridom.de/>).

Outra vantagem do *spa typing* é a caracterização molecular de amostras de MRSA identificadas diretamente de material clínico por meio da PCR. Já o PFGE necessita do crescimento em meio de cultura, portanto, não pode ser usado nesta situação. Entretanto, muitos estudos concordam que o poder discriminatório do PFGE é maior quando comparado ao *spa typing* (Harmsen et al., 2003; Furuya et al., 2010). Schouls et al. (2009) afirmam que o *spa typing* apresenta desvantagens frente ao PFGE, pois baseia-se no estudo de um único loco do genoma e por isso tem um menor poder discriminatório.

Deurenberg e Stobberingh (2008) afirmam que PFGE atualmente é um dos métodos de tipagem com melhor poder discriminatório para *S. aureus*, por isso é considerado o padrão ouro para investigação de surtos. Na PFGE para *S. aureus* o DNA (*Deoxyribonucleic Acid*) cromossômico é digerido com a enzima de restrição *SmaI* e submetido à uma eletroforese de campo pulsado em gel de agarose. Os fragmentos de DNA apresentam-se separados e os padrões de bandas resultantes

são analisados por pacote de softwares especiais, de acordo com os critérios estabelecidos por Tenover et al. (1995).

Entre as principais limitações da técnica de PFGE está a necessidade de crescimento em meio de cultura, ou seja, MRSA identificados diretamente de amostras clínicas por meio da PCR não podem ser avaliados por esta técnica, o intervalo de tempo para a obtenção final dos resultados, o elevado custo dos reagentes, o equipamento específico para a realização da técnica e dificuldades para interpretação dos resultados (Cookson et al., 2007; Weller, 2000). Apesar disso, estas limitações não impedem o PFGE de ser considerada uma técnica extremamente útil para caracterização de surtos.

Poucos estudos brasileiros usaram o *spa typing* como método de tipagem. Em um deles, um estudo realizado em Goiânia, os autores, avaliaram 8 isolados de MRSA, advindos de 2735 crianças. Esses isolados foram submetidos à tipagem molecular por *spa typing*, caracterização de *SCCmec* e também à análise do polimorfismo do DNA por PFGE. O estudo encontrou 3 isolados relacionados ao clone brasileiro HA-MRSA, todos eram *SCCmec* tipo III e *spa typing* t037; 2 isolados relacionados ao clone Australiano, apresentaram *SCCmec* tipo IV e *spa typing* t128; e o último clone encontrado, o clone pediátrico foi relacionado a três isolados dos quais todos eram *SCCmec* tipo IV, dois *spa typing* t045 e 1 *spa typing* t002; mostrando que houve uma boa relação entre os resultados e as metodologias empregadas. Além disso, neste estudo o *spa typing* quando comparado ao PFGE pareceu ter maior poder discriminatório entre os isolados (Vieira et al., 2014).

Outro estudo também realizado em Goiânia avaliou 1192 crianças de 62 creches públicas; e encontrou 14 (1,2%) crianças colonizadas por MRSA. Os isolados de MRSA foram também submetidos à *spa typing*, PFGE e caracterização de *SCCmec*. Foram identificados 6 tipos diferentes por *spa typing* e caracterizados 6 perfis moleculares diferentes por PFGE. A única relação encontrada entre as metodologias foram 8 isolados com perfil A e *SCCmec* tipo III dos quais 7 eram *spa typing* t037 e um t275. Nesse estudo, considerando que clones estreitamente relacionados e clones possivelmente relacionados foram definidos como um único perfil, o PFGE demonstrou uma maior capacidade de diferenciação entre as amostras, evidenciando dez clones (A, A1, A2, A3, B, B1, C, D, E e F) (Lamaro-Cardoso et al., 2009).

Pires et al. (2014) avaliaram carreadores nasais de MRSA na população de Botucatu, São Paulo e encontraram MRSA em 0,9% da população testada. Todos os isolados eram SCCmec tipo IV, *spa typing* t002 e t021. Nesse estudo o PFGE identificou 3 perfis, mostrando-se também mais discriminatório que o *spa typing*.

1.7 Justificativa

O número de transplantes hepáticos no Brasil vem aumentando a cada ano. Sabe-se que MRSA é um patógeno frequente nesse grupo de pacientes e além disso, é um importante agente de SSI, aumenta a duração de hospitalização, morbidade e mortalidade e custos às instituições hospitalares. Com isso, é de grande importância o desenvolvimento de estratégias para controle e prevenção de MRSA. Testes específicos, sensíveis e rápidos de triagem de MRSA têm sido descritos como uma boa estratégia para controle e prevenção de infecções por esse agente e podem ser utilizadas em unidades de Transplante Hepático.

Métodos moleculares também são ferramentas essenciais para controle de MRSA além de serem indispensáveis para estudar a epidemiologia desse micro-organismo. Entretanto, poucos estudos moleculares de MRSA em pacientes hepatopatas e transplantados hepáticos são encontrados na literatura.

Visto isso, a padronização de um teste rápido e seguro para a detecção de MRSA em unidades de Transplante Hepático do HC-FMUSP (Hospital das Clínicas – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo) e uma investigação molecular de isolados MRSA nesse grupo de pacientes se faz necessária.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Caracterização fenotípica e genotípica de MRSA de amostras de pacientes de lista de espera e transplantados hepáticos.

2.2 Objetivos específicos

Identificar o perfil de sensibilidade de isolados MRSA.

Caracterizar os tipos de *SCCmec* de amostras de MRSA.

Caracterizar o perfil molecular de isolados de MRSA.

Materiais e Métodos

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O complexo hospitalar HC-FMUSP é localizado na cidade de São Paulo e conta com 2200 leitos, distribuídos entre seis institutos especializados, dois hospitais auxiliares, uma divisão de reabilitação e um hospital associado.

O HC-FMUSP é uma Autarquia Estadual, vinculada administrativamente à secretaria de Estado da Saúde do Estado de São Paulo e associada à Universidade de São Paulo para fins de Ensino, pesquisa e prestação de serviços de saúde à comunidade. Além disso, dentre várias unidades que compõe o hospital, encontram-se 62 Laboratórios de Investigação Médica (LIMs) vinculados aos Departamentos da FMUSP, os quais possuem diversas finalidades como: promover a pesquisa científica e também a formação de pesquisadores; padronizar técnicas e metodologias que possam ser implantadas no atendimento das unidades do HC; servir de campo de ensino e atualização para estudantes e profissionais ligados às ciências da saúde; entre outros.

Dentre as várias unidades que compõe o Hospital das Clínicas, encontram-se os Laboratórios de Investigação Médica (LIMs), uma estrutura composta por 62 Unidades Laboratoriais. Estas Unidades são vinculadas aos Departamentos da FMUSP, possuem as seguintes finalidades:

- Desenvolver pesquisa científica assim como promover a formação de pesquisadores;
- Padronizar novas técnicas e métodos de diagnóstico possibilitando sua implantação para atendimento de pacientes em outras unidades do HC;
- Servir de campo de ensino, treinamento e desenvolvimento de estudantes de escolas de nível superior e profissionais da saúde;
- Realizar cursos no campo da medicina e da saúde.

Pioneiro na realização de transplante de fígado na América do Sul, o HC-FMUSP se destaca no cenário nacional devido a realização crescente de transplante de fígado a cada ano. O hospital conta com uma Unidade de Transplante de Fígado composta por um ambulatório o qual possui uma equipe multidisciplinar especializada no atendimento de pacientes hepatopatas. Além disso, a Unidade

também possui uma enfermaria com 26 leitos e uma Unidade de Terapia Intensiva com 9 leitos.

Este estudo faz parte de um projeto principal intitulado "INFECÇÕES HOSPITALARES CAUSADAS POR *S. aureus* EM PACIENTES TRANSPLANTADOS HEPÁTICOS" cujo objetivo principal é avaliar a clonalidade e a virulência de isolados de MRSA de cultura de vigilância e de infecção de pacientes hepatopatas e transplantados hepáticos, o qual teve aprovação da CAPpesq sob nº 0307/09, bem como auxílio financeiro da FAPESP, sob nº 2009/17896-1. O resumo geral do projeto pode ser lido no ANEXO A.

Foi garantido a confidencialidade, sigilo e privacidade dos dados do estudo. Também foi aplicado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para todos pacientes que participaram do estudo (ANEXO B).

O presente estudo trata-se de um estudo prospectivo o qual foi dividido em três etapas:

3.1 Coleta de material e identificação fenotípica e genotípica de portadores de MRSA.

3.2 Caracterização e tipagem molecular das amostras MRSA.

3.3 Análise dos dados obtidos.

3.1 Coleta de material e identificação fenotípica e genotípica de portadores de MRSA

3.1.1 Coleta de material clínico

Foi realizada a coleta de material de 190 pacientes de dois grupos distintos: 126 pacientes da lista de espera de transplante hepático e 64 pacientes transplantados, durante o período de agosto de 2010 à dezembro de 2011. Todas as

amostras coletadas no estudo eram amostras de conveniência e foram selecionadas ao acaso.

Dois *swabs* nasais (nasal esquerdo e nasal direito) foram coletados de 126 pacientes da lista de espera. Entretanto, somente 95 pacientes da lista de espera tiveram a coleta de dois *swabs* inguinais realizada, uma vez que a coleta dos *swabs* inguinais foi incluída após o início do estudo com intuito de aumentar a sensibilidade das culturas microbiológicas.

A coleta dos *swabs* de pacientes da lista de espera era realizada no Ambulatório de Transplante de Fígado do HC-FMUSP duas vezes por semana em pacientes que estavam eventualmente presentes para inclusão em lista de transplante, consultas ambulatoriais (psicológica, médica ou nutricional) ou para realização de exames de rotina e que, quando abordados, aceitaram participar do estudo. Deste grupo foram coletados *swabs* também de pacientes que encontravam-se internados na enfermaria ou Unidade de Terapia Intensiva de fígado do hospital. Não houve uma ordem de coleta porém todos os pacientes coletados estavam entre os 200 primeiros pacientes da lista de transplante de hepático do HC-FMUSP, a qual era atualizada e classificada mensalmente conforme as condições e agravos clínicos de cada paciente de acordo com o MELD (*Model for End-stage Liver Disease*) o qual utiliza uma forma matemática para avaliar a sobrevida dos pacientes a mais curto prazo.

Foram coletados também dois *swabs* nasais e dois *swabs* inguinais para pesquisa de portadores nasais e inguinais de *S. aureus* meticilina resistente de 64 pacientes submetidos a transplante hepático no HC-FMUSP durante o período de agosto de 2010 à dezembro de 2011. A coleta foi realizada no primeiro período pós-operatório, ou seja, nas primeiras 48 horas após a realização do transplante. Entre os 64 pacientes transplantados, não foi possível a coleta de um *swab* nasal e de um *swab* inguinal de diferentes pacientes devido às condições clínicas de cada paciente.

Portanto, o material coletado em cada *swab* foi considerado e nomeado “amostra clínica” nesse estudo. Desta forma, como os *swabs* foram coletados aos pares, cada paciente teve a coleta de 4 amostras clínicas, destas, uma amostra clínica nasal e uma inguinal foram destinadas para a identificação fenotípica (cultura microbiológica) enquanto as outras duas foram destinadas para identificação

genotípica (PCR). Para padronizar as técnicas laboratoriais que foram aplicadas, as amostras clínicas foram distribuídas da seguinte forma: amostras coletadas do lado direito foram submetidas à cultura microbiológica e amostras coletadas do lado esquerdo foram submetidas à pesquisa direta de DNA bacteriano por métodos genotípicos relatados posteriormente.

Todos os *swabs* foram armazenados em meio de transporte Stuart (BAC-SWAB, DME®) até a chegada ao laboratório. Todos os experimentos com as amostras coletadas foram reproduzidos no laboratório de Bacteriologia LIM 54.

3.1.2 Identificação fenotípica

Foram coletadas amostras clínicas de 190 pacientes. Um amostra clínica nasal e uma inguinal de cada paciente foi semeada em meio seletivo de caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) enriquecido com NaCl a 2,5%, 3,5mg/L de cefoxetina e 20mg/L de aztreonam, com o intuito de aumentar a sensibilidade para MRSA; segundo os estudos bem sucedidos de Bocher et al. (2010).

Posteriormente foram incubadas a 35°C $\pm$ 2°C por até 48 horas. Passado o tempo necessário para crescimento, foram semeados em ágar sal-manitol e novamente incubados a 35°C $\pm$ 2°C por até 48 horas. *Staphylococcus aureus* fermentam manitol formando colônias de características sugestivas deste micro-organismo (Singh et al., 2003). Controle de qualidade foi realizado utilizando a cepa de *S. aureus* ATCC® 25923.

Colônias suspeitas de *S. aureus* foram repicadas para ágar-sangue de carneiro à 5% (Difco) e incubadas a 35°C $\pm$ 2°C por 24 horas ,após isso, colônias sugestivas foram submetidas à coloração de Gram, prova da catalase e DNase, para sua identificação fenotípica presuntiva (Mir et al., 1998). Controle de qualidade foi realizado utilizando a cepa de *S. aureus* ATCC® 25923.

Posteriormente as cepas identificadas como *S. aureus* foram semeadas novamente em ágar -sangue de carneiro e incubadas a 35°C $\pm$ 2°C por 24 horas. Após esse tempo os isolados de *S. aureus* identificados foram submetidos ao teste de triagem para detecção de resistência a oxacilina, conforme recomendado

pelo CLSI (CLSI, 2011). Controle de qualidade foi realizado utilizando a cepa de *S. aureus* ATCC® 25923 (sensível) e MRSA NCTC® 10552 (resistente).

3.1.3 Identificação genotípica de amostras clínicas

O DNA genômico foi extraído diretamente das amostras clínicas, logo após as coletas, pelo *kit Illustra™ Tissue & Cells Genomicprep Mini Spin* (Ge Healthcare Life Science, USA), de acordo com as instruções do fabricante.

Após a extração de DNA, como primeiro passo, realizou-se um PCR de rRNA (ribosomal Ribonucleic Acid) bacteriano. A região estudada foi a 16S, amplamente usada por ser o marcador genético para bactérias (Janda, Abbott, 2007). Desta forma a amplificação desta região é capaz de confirmar a presença de bactéria na amostra. O *primer* utilizado está descrito na tabela 3 (Mendes et al., 2007).

Tabela 3 – Sequência do *primer* utilizado na PCR para rRNA 16S

Região alvo	<i>Primer</i>	sequência de oligonucleotídeos (5'-3')	Localização	Tamanho do <i>amplicon</i>
16S rRNA	16S-8F 16S-1493R	AGAGTTTGATCCTGGCTC AG ACGGCTACCTTGTACGACTT	8–27 1512–1492	1499bp

Todas as amostras que apresentaram amplificação do gene 16S foram submetidas à detecção do gene *mecA* e *coA* por uma M-PCR de acordo com o *kit* NCL-SA-PS (Novo Castra, Reino Unido). Esse Kit apresentou 100% de especificidade e 100% de especificidade em estudo realizado por Kearns et al. (1999). Como este *kit* não se encontra mais comercialmente disponível, as condições e parâmetros padronizados pelo fabricante foram seguidos utilizando-se reagentes de outros fabricantes.

Assim foi utilizado um conjunto de *primers* SA-1, SA-2, SA-3 e SA-4 (tabela 4), onde SA-1 e SA-2 amplificam uma região de 214bp do gene *mecA*, enquanto os iniciadores SA-3 e SA-4 amplificam uma região conservada de 117bp do gene da

coagulase, permitindo portanto a diferenciação simultânea entre *S. aureus* (coagulase positiva) e estafilococos coagulase negativa.

Tabela 4 – Iniciadores empregados na reação de M-PCR para detecção de genes *coA* e *mecA* para triagem de isolados MRSA

<i>Primer</i>	Sequência de oligonucleotídeos (5'-3')	Tamanho do <i>amplicon</i>	Gene
SA-1	CGG TAA CAT TGA TCG CAA CGT TCA	214bp	<i>mecA</i>
SA-2	CTT TGG AAC GAT GCC TAA TCT CAT		
SA-3	GTA GAT TGG GCA ATT ACA TTT TGG AGG	117bp	<i>coA</i>
SA-4	CGC ATC AGC TTT GTT ATC CCA TGT A		

Para a amplificação destes genes foi utilizado o seguinte protocolo: um volume de 25µL de uma mistura de reagentes contendo 1µL de DNA, 1,0U de *Taq Polimerase Platinum* (Life Technologies), Tampão 1X (75mM Tris-HCl pH 9,0; 20mM (NH₄)₂SO₄), 200µM de cada dNTP, 2,5mM de MgCl₂ e uma concentração final dos iniciadores de 100nM.

S. aureus ATCC® 25923 e MRSA NCTC® 10552 foram usadas como controle de qualidade em todas as reações de PCR.

Produtos amplificados por PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão Tris-Borato EDTA (TBE) 0,5x por uma hora a 110V. Como padrão de peso molecular foi utilizado um marcador de peso molecular de 100bp (Invitrogen®, Carlsbad, Califórnia). Ao gel foi incorporado 10 µL de *SYBR Safe®* “DNA gel stain” (Invitrogen®, Carlsbad, Califórnia) e posteriormente visualizado sob transiluminação ultravioleta.

As reações de PCR foram realizadas semanalmente, de acordo com o andamento do estudo.

3.1.4 Perfil de sensibilidade de isolados MRSA

Todos os isolados MRSA com perfis moleculares distintos tiveram sua Concentração Inibitória Mínima (CIM) determinada para os seguintes antimicrobianos: oxacilina, clindamicina, eritromicina, vancomicina, sulfametoxazol-

trimetoprima (SXT), ciprofloxacina, gentamicina, cloranfenicol e tetraciclina conforme Tabela 1A do CLSI (M100-S21, CLSI, 2011). Os testes de sensibilidade foram realizados pelo método de microdiluição em caldo para determinação da CIM.

O preparo das soluções de antimicrobianos, a diluição das drogas assim como a técnica da microdiluição em caldo e sua interpretação foram realizadas no LIM 54 conforme já padronizado anteriormente (Rocks et al., 2007; Wiegand et al., 2008).

3.1.5 Caracterização genotípica de isolados MRSA

Os isolados caracterizados como MRSA pelo método fenotípico tiveram posteriormente o DNA genômico extraído pelo método de fervura com tampão de extração (EDTA 0,01M, Tris HCL 0,01M pH7, água livre de nucleases) acrescido de 8U de lisostafina (sigma-Aldrich, USA) por amostra e foram submetidas a uma confirmação do diagnóstico de MRSA por detecção do gene *mecA* e *coA* e eletroforese em gel da mesma forma que as amostras clínicas (item 3.1.3).

3.2 Caracterização e tipagem molecular de MRSA

3.2.1 Caracterização de SCC*mec*

A caracterização do tipo de SCC*mec* foi realizada em todas as amostras identificadas como MRSA, ou seja, em todas as amostras clínicas nasais e inguinais identificadas como MRSA diretamente por PCR assim como em todos os isolados de cultura previamente triados por *screening* de Oxacilina e confirmados como MRSA.

Para a caracterização molecular do SCC*mec*, utilizou-se o método de M-PCR, conforme descrito por Zhang et al. (2005). Os iniciadores utilizados nestas reações estão descritos na tabela 5.

Tabela 5 – Sequência dos primers utilizados para PCR multiplex para determinação dos tipos de SCCmec

<i>Primer</i>	Sequência de oligonucleotídeos (5'-3')	Tamanho do <i>amplicon</i>	Especificidade (tipo de SCCmec)
Type I-F	GCTTTAAAGAGTGTCTGTTACAGG	613	SCCmec I
Type I-R	GTTCTCTCATAGTATGACGTCC		
Type II-F	CGTTGAAGATGATGAAGCG	398	SCCmec II
Type II-R	CGAAATCAATGGTTAATGGACC		
Type III-F	CCATATTGTGTACGATGCG	280	SCCmec III
Type III-R	CCTTAGTTGTGTAACAGATCG		
Type IVa-F	GCCTTATTCGAAGAAACCG	776	SCCmec IVa
Type IVa-R	CTACTCTTCTGAAAAGCGTCG		
Type IVb-F	TCTGGAATTACTTCAGCTGC	493	SCCmec IVb
Type IVb-R	AAACAATATTGCTCTCCCTC		
Type IVc-F	ACAATATTTGTATTATCGGAGAGC	200	SCCmec IVc
Type IVc-R	TTGGTATGAGGTATTGCTGG		
Type IVd-F5	CTCAAAATACGGACCCCAATACA	881	SCCmec IVd
Type IVd-R6	TGCTCCAGTAATTGCTAAAG		
Type V-F	GAACATTGTTACTTAAATGAGCG	325	SCCmec V
Type V-R	TGAAAGTTGTACCCTTGACACC		
MecA147-F	GTGAAGATATACCAAGTGATT	147	<i>mecA</i>
MecA147-R	ATGCGCTATAGATTGAAAGGAT		

Os produtos amplificados pela PCR foram submetidos à eletroforese em gel e posteriormente visualizados sob transiluminação ultravioleta.

3.2.2 Análise do polimorfismo do DNA por eletroforese de campo Pulsado (PFGE)

Os isolados MRSA identificados por cultura e triagem de Oxacilina foram submetidos à digestão do DNA cromossômico pela enzima de restrição *Sma*I (CCCTGGG) (Amersham Pharmacia Biotech, USA), que reconhece e cliva sequências de nucleotídeos que aparecem poucas vezes ao longo do DNA de

Staphylococcus aureus (12 a 20 sítios de restrição) (Prevost et al., 1992; Struelens et al., 1992).

A eletroforese em campo pulsado foi realizada em gel de agarose a 1% (Sigma, USA) em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE: 90mM Tris, 90mM ácido bórico, 2mM EDTA - Amersham Pharmacia Biotech, USA) (Sambrook et al., 1989), no equipamento CHEF DRII System (BIO-RAD, USA) com intervalos de tempo de pulso de 1 a 30 segundos por 24 horas, ângulo de 120°, temperatura de 14°C e voltagem de 6,0 volts/cm (Pfaller, 1993). Um peso molecular de 50-1000kb (*Lambda Marker*, Biolabs®) foi utilizado em todas as corridas.

Os perfis eletroforéticos gerados foram agrupados utilizando-se o software de bioinformática Bionumerics versão 7.1 (Applied Maths). Fragmentos de DNA foram manualmente curados e normalizados usando o peso *Lambda Marker* presente em cada gel. Uma tolerância de 1,5% e otimização de 0,5% foram utilizadas para a comparação de diferentes géis conforme sugerido por Mulvey et al. (2001). O agrupamento de clusters foi realizado e gerado um dendrograma pelo método de *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* (UPGMA) e coeficiente Dice de similaridade. Quando houve mais de um isolado de um mesmo paciente e esses isolados tiveram o mesmo perfil eletroforético por PFGE, somente um isolado foi destinado à análise pelo software. Aos isolados não submetidos ao dendrograma, foram considerados os mesmos resultados de similaridade daqueles isolados selecionados (do mesmo paciente) para a análise.

Fragmentos de DNA das cepas BK2464 e HSJ216 (representativas dos clones epidêmicos New York/Japan e Brazilian clone, respectivamente) foram incluídas na análise à partir de perfis previamente gerados por Oliveira et al. (2001).

Para definir os PFT (*Pulsed Field Type*) e subtipos encontrados, três níveis de cutoff foram seguidos: isolados com similaridade <80% foram considerados diferentes PFT. Os subtipos foram definidos a partir daqueles PFT com coeficiente Dice entre 80-95%. Isolados com similaridade >95% foram considerados idênticos.

3.2.3 Tipagem molecular por *spa typing*

Isolados MRSA identificados por cultura e *screening* de Oxacilina foram submetidas à determinação do tipo de *spa typing*. Foi destinado à tipagem molecular

por *spa typing* apenas um isolado MRSA de cada paciente, ou seja; quando um paciente apresentou colonização nos dois sítios (nasal e inguinal) ou tinha mais de um isolado MRSA, uma vez que estes isolados apresentavam o mesmo SCCmec e mesmo perfil molecular por PFGE; foi excluído da análise por *spa typing* o isolado do sítio inguinal, e destinado a análise o isolado do sítio nasal. Esse critério foi usado pois a maioria dos pacientes apresentavam isolados de colonização em sítio nasal ou nos dois sítios.

A região polimórfica X do gene *spa* foi amplificada por PCR conforme descrito por Shopsin et al. (1999). Os iniciadores destas reações estão descritos na tabela 6.

Tabela 6 – Sequência dos primers utilizados para PCR usada na amplificação da região polimórfica X do gene *spa*

<i>Primer</i>	Sequência de oligonucleotídeos (5'-3')	Tamanho do <i>amplicon</i>	Descrito por:
<i>spa</i> 1095 F	AGACGATCCTTCGGTGAGC	226-418bp	Shopsin et al (1999)
<i>spa</i> 1517 R	GCTTTTGCAATGTCATTACTG		

Após a amplificação do gene *spa*, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel e posteriormente visualizados sob transiluminação ultravioleta. Após esta etapa, foram encaminhadas à purificação de DNA e sequenciamento. Todas as sequências foram analisadas pelo software disponível online <www.spatyper.fortinbras.us> e posteriormente confirmadas no banco de dados online <www.spaserver.ridom.de>. Desta forma foi possível identificar as repeats e determinar o *spa typing*. As sequências de DNA de isolados não tipáveis por essa metodologia foram enviadas ao Laboratório Nacional de Microbiologia do Canadá (*National Microbiology Laboratory*), onde foram analisadas (software Ridom GmbH Würzburg, Germany).

3.3 Análise dos dados obtidos

A primeira etapa para analisar os dados foi comparar o número de MRSA diagnosticado pelo método fenotípico (cultura) e o número de MRSA diagnosticado

diretamente pela PCR, desta forma foi possível analisar a sensibilidade de cada método.

Posteriormente, foi observada a incidência de colonização por MRSA de acordo com cada sítio anatômico estudado. Esses dados foram úteis para apontar a maior frequência encontrada no estudo e avaliar a importância de cada sítio para o diagnóstico de MRSA.

Com a caracterização dos tipos de *SCCmec* de todas as amostras MRSA, foi avaliado o tipo predominante no estudo em geral, o tipo predominante em cada grupo de pacientes e a capacidade de caracterização do método tanto para isolados quanto para amostras clínicas submetidas diretamente à PCR.

Além disso, com o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos dos isolados foi possível relacioná-los aos tipos de *SCCmec* caracterizados no estudo.

Em relação ao *spa typing* foi observado o tipo de relação aos tipos de *spa* predominante no estudo e o tipo predominante em cada grupo de paciente. Esta metodologia de tipagem molecular também foi relacionada com os tipos de *SCCmec* e perfis obtidos no PFGE. Também foi observado, de acordo com a literatura, a confiabilidade do método para uma investigação epidemiológica.

Os perfis obtidos por PFGE foram identificados, analisados e agrupados. Posteriormente, foram relacionados aos tipos de *SCCmec* e também *spa typing*.

Além disso, dados de colonização, os tipos de *SCCmec*, *spa typing* e perfis obtidos por PFGE foram estudados e comparados de acordo com cada grupo de estudo (lista de espera e transplantados).

Todas as etapas do estudo podem ser observadas na figura 2.

Figura 2 – Fluxograma do estudo.

As etapas em cor verde representam os testes fenotípicos realizados no estudo enquanto as etapas azuis representam os testes genotípicos.

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 População estudada

As características gerais dos grupos estudados tais como idade, sexo e doença de base podem ser observadas na Tabela 7.

Tabela 7 – Análise de características de 190 pacientes hepatopatas submetidos à pesquisa de portadores de *S. aureus* resistente à oxacilina, atendidos na unidade de Fígado do HC-FMUSP

Características	lista de espera (n=126)	Transplantados (n=64)
Sexo masculino	85 (67%)	37 (58%)
Idade (anos)		
Média	50,16	46,3
Mediana	53	52
Intervalo	19-71	17-71
Desvio padrão	13,62	16,43
Doença de Base*		
Cirrose alcoólica	23 (18%)	8 (12,5%)
Cirrose biliar primária	4 (3%)	1 (1,5%)
Cirrose biliar secundária	3 (2%)	2 (3%)
Cirrose criptogênica	13 (10%)	9 (14%)
Cirrose esclerosante	5 (4%)	1 (1,5%)
Cirrose por vírus da hepatite B	8 (6%)	3 (5%)
Cirrose por vírus da hepatite C	38 (30%)	10 (16%)
Hepatite auto-imune	9 (7%)	2 (3%)
Hepatite fulminante	-	4 (6%)
Hepatocarcinoma	-	3 (5%)
Não esclarecidas	4 (3%)	14 (22%)
<i>Nash</i> (Nonalcoholic steatohepatitis)	3 (2%)	1 (1,5%)
Outras	14 (11%)	8 (12,5%)
Síndrome de Budd – Chiari	2 (2%)	-

* A soma pode ser maior que 100%, pois alguns pacientes apresentavam mais de uma doença de base.

4.2 Coleta de material

Um total de 694 *swabs* foram coletados. A distribuição da coleta de *swabs* entre os grupos do estudo e o número total de *swabs* coletados estão representados na tabela 8.

Tabela 8 – Total de *swabs* nasais e inguinais coletados de 190 pacientes hepatopatas acompanhados no HC-FMUSP, no período de agosto de 2010 à dezembro de 2011

<i>Swabs</i>			
	<i>Swabs</i> nasais*	<i>Swabs</i> inguinais*	Total
Pacientes			
Lista de espera (n=126)	252	190	442
Transplantados (n=64)	126**	126**	252
Total	378	316	694

*Coletados em duplicata: direito e esquerdo

** Coletados 63 *swabs* em duplicata (126 *swabs*): um paciente não foi possível coletar secreção nasal e outro paciente não foi possível coletar material inguinal.

4.3 Caracterização fenotípica de amostras clínicas

4.3.1 Cultura microbiológica

Entre 694 *swabs* semeados em caldo seletivo, apenas um *swab* inguinal e um *swab* nasal de pacientes distintos, não apresentaram crescimento bacteriano (ausência de turvação).

Em relação ao crescimento em ágar manitol, prova da DNase e catalase positivas, evidenciamos que 75 (22%) culturas, do total de 347 culturas realizadas, apresentaram crescimento de colônias fenotipicamente identificadas como *Staphylococcus aureus*, sendo que somente 43 (12%) foram positivas para MRSA.

Em relação ao número de pacientes avaliados neste estudo, evidenciamos que a proporção de positividade de MRSA foi de 17,4% (33/190) pela cultura microbiológica, sendo de 17 pacientes de lista e 16 pacientes transplantados, ou seja, 13% (17/126) dos pacientes de lista de espera e 25% (16/64) dos transplantados estavam colonizados com MRSA no momento da coleta. Dentre este total de 33 pacientes, 11 pacientes (28%) foram colonizados tanto no sítio nasal

quanto inguinal. Apenas 2 pacientes de lista e 3 pacientes transplantados apresentaram cultura positiva somente em sítio inguinal. Todos os resultados obtidos nas culturas microbiológicas dos pacientes de lista e dos transplantados constam na tabela 9.

Tabela 9 – Resultados das culturas bacteriológicas obtidas dos 190 pacientes hepatopatas acompanhados no HC-FMUSP, no período de agosto 2010 à dezembro de 2011

Resultados da cultura*	Pacientes de lista de espera		Pacientes transplantados	
	Swabs nasais	Swabs inguinais**	Swabs nasais	Swabs inguinais
Positiva para MRSA	15 (12%)	8 (8%)	14 (22%)	6 (9,5%)
Positiva para MSSA	23 (18%)	8 (8%)	0 (0%)	1 (1,5%)
Positiva para <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativos	59 (47%)	51 (54%)	11 (17,5%)	15 (24%)
Positiva para outros micro-organismos	29 (23,0%)	27 (29%)	37 (59%)	42 (65%)
Cultura sem crescimento bacteriano	0 (0%)	1 (1%)	1 (1,5%)	0 (0%)
Total	126 (100%)	95 (100%)	63 (100%)	63 (100%)

* subcutura em Agar manitol.

** sítio de coleta incluído posteriormente ao início do estudo.

MRSA = *Meticillin-resistant Staphylococcus aureus*;

MSSA = *Meticillin-susceptible Staphylococcus aureus*.

4.3.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima de isolados MRSA

Um total de 43 isolados MRSA foi selecionado para determinação da CIM para diferentes antimicrobianos.

Os 43 isolados MRSA analisados pelo método de microdiluição mostraram-se resistentes a oxacilina, com valores de CIM₅₀ e CIM₉₀ de >64,0µg/mL. Em relação à vancomicina, todos os isolados testados apresentaram sensibilidade com CIM₅₀ e CIM₉₀ igual a 1,0µg/mL. Os resultados das CIMs obtidas para os outros antimicrobianos testados estão descritos na Tabela 10.

Tabela 10 – Atividade antimicrobiana em 43 isolados MRSA de pacientes hepatopatas (isolados de colonização)

Antimicrobiano	CIM ₅₀ *	CIM ₉₀ *	Intervalo*	% Susceptibilidade
Ciprofloxacina	64,0	>64,0	0,25 - >64,0	16,7
Cloranfenicol	4,0	16,0	1,0 - 32,0	81,3
Clindamicina	>32,0	>32,0	≤0,06 - >32,0	22,9
Eritromicina	>32,0	>32,0	0,25 - >32,0	8,3
Gentamicina	0,5	>32,0	≤0,06 - >32,0	58,3
Oxacilina	>64,0	>64,0	32,0 - >64,0	0
Penicilina	>32,0	>32,0	16,0 - >32,0	0
Sulfametoxazol-trimetoprima	<0,25	16,0	<0,25 - 128,0	87,5
Tetraciclina	0,25	4,0	≤0,06 - >32,0	89,6
Vancomicina	1,0	1,0	0,5-1,0	100

*Valores de CIM são expressos em µg/ml.

Todos os isolados clínicos tiveram seu perfil de susceptibilidade determinado pelo método de microdiluição (determinação da CIM).

4.4 Caracterização genotípica diretamente de amostras clínicas

4.4.1 Detecção de genes 16S rRNA diretamente de amostras clínicas

De um total de 347 amostras de DNA, obtidas a partir de 189 *swabs* nasais e 158 *swabs* inguinais, apenas 6 (2%) não apresentaram positividade para esta reação. Reações de PCR de 16S rRNA para estas 6 amostras foram repetidas com outros *primers* (*primer* de 150bp) e realmente não houve positividade na amplificação do gene 16S rRNA. A distribuição das amplificações da região 16S rRNA entre as amostras está representada na tabela 11.

A amplificação do gene 16S de alguns isolados está representada na Figura 3.

Figura 3 – PCR do gene 16S rRNA de amostras clínicas coletadas de pacientes hepatopatas acompanhados no HC-FMUSP.

Coluna 1 – Peso molecular (100bp); Colunas 2 a 6 – amostras de *swabs* nasais positivas para gene 16S; Coluna 3 – Controle negativo da reação.

4.4.2 Detecção do gene *coA* e gene *mecA* diretamente de amostras clínicas

De um total de 347 amostras, 6 amostras foram negativas para PCR 16S, desta forma, 341 amostras foram destinadas à realização de M-PCR *coA/mecA*. A amplificação dos genes pode ser observada na Figura 4.

Figura 4 – PCR para detecção dos genes *coA* (117bp) e *mecA* (214bp) de amostras clínicas coletadas de pacientes hepatopatas acompanhados no HC-FMUSP.

Colunas 1 e 15: peso molecular 100bp (InVitrogen, USA); Coluna 2: controle positivo (*S.aureus* NCTC 10442); Colunas 3 a 13: DNA de *swabs* nasais de pacientes de lista; Coluna 14: controle negativo.

De modo geral, 245 amostras amplificaram ambos os genes, demonstrando uma positividade de 71% (245/347) de MRSA por esse método diagnóstico. Também foi possível observar amplificação somente do gene da coagulase (*coA*) em 64 amostras, considerou-se então que essas amostras portavam MSSA. Com isso, totalizando a identificação de 245 MRSA e 64 MSSA entre as amostras, tomando a PCR multiplex como método diagnóstico; concluímos que houve uma positividade de 89% (309/347) para *S. aureus* entre os swabs coletados.

Podemos afirmar também que, 81% (102/126) dos pacientes de lista de espera e 78% (50/64) dos pacientes transplantados hepáticos estavam colonizados por MRSA no momento da coleta. Além disso, 44% e 58% dos pacientes de lista de espera e pacientes transplantados hepáticos, respectivamente, estavam colonizados em ambos os sítios de acordo com a M-PCR.

Quando comparado à cultura microbiológica, a M-PCR demonstrou-se muito mais sensível. Foi possível observar que, enquanto a PCR identificou 245 (71%) amostras positivas para MRSA, a cultura microbiológica identificou apenas 43 (17%) isolados MRSA. Além disso, é válido ressaltar que, em 272 amostras com culturas microbiológicas consideradas negativas para MRSA e MSSA, quando submetidas à amplificação dos genes *coA* e *mecA*, apresentaram a presença de ambos os genes, revelando a presença de MRSA em 66% (179/272) destas amostras ou também amplificaram somente o gene *coA*, revelando a presença de MSSA em 21% (56/272) destas amostras com culturas negativas. Os resultados das culturas e das PCRs foram comparados e descritos na tabela 11.

Tabela 11 – Comparação entre os resultados das culturas dos swabs nasais e amplificações dos genes 16S rRNA, *coA* e *mecA* dos 190 pacientes Hepatopatas acompanhados no HC-FMUSP, no período de agosto de 2010 à dezembro de 2011

PCR	Pacientes de lista de espera					
	Cultura de swab nasal (126 swabs)			Cultura de swab inguinal (95 swabs)		
	Positiva para MRSA (n=15)	Positiva para MSSA (n= 23)	MSSA e MRSA negativos* (n=88)	Positiva para MRSA (n=8)	Positiva para MSSA (n=8)	MSSA e MRSA negativos* (n=79)
Positiva gene 16S RNAr (217)	15 (100%)	23 (100%)	85 (97%)	8 (100%)	8 (100%)	78 (99%)
Negativa gene 16S RNAr (4)	0 (0%)	0 (0%)	3 (3%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (1,3%)
Positiva genes <i>coA</i> e <i>mecA</i> (158)	15 (100%)	17 (74%)	55 (62,5%)	7 (8,5%)	6 (75%)	58 (73%)
Negativa genes <i>coA</i> e <i>mecA</i> (22)	0 (0%)	1 (4,3%)	11 (12, 5%)	(0%)	0 (0%)	10 (13%)
Positiva somente gene <i>mecA</i> (1)	0 (0%)	0(0%)	1 (1%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Positiva somente gene <i>coA</i> (40)	0 (0%)	5 (21,7%)	21 (24%)	1 (12,5%)	2 (25%)	11 (14%)
PCR	Pacientes Transplantados					
	Cultura de swab nasal (63)**			Cultura de swab inguinal (63)**		
	Positiva para MRSA (n=14)	Positiva para MSSA (n=0)	MSSA e MRSA negativos* (n=49)	Positiva para MRSA (n=6)	Positiva para MSSA (n=1)	MSSA e MRSA negativos* (n=56)
Positiva gene 16S RNAr (124)	14 (100%)	0 (0%)	48 (98%)	6(100%)	1(100%)	55 (98%)
Negativa gene 16S RNAr (2)	0 (0%)	0 (0%)	1 (2%)	0(0%)	0(0%)	1 (2%)
Positiva genes <i>coA</i> e <i>mecA</i> (87)	14 (100%)	0 (0%)	31 (63%)	6 (100%)	1(100%)	35 (63%)
Negativa genes <i>coA</i> e <i>mecA</i> (9)	0 (0%)	0 (0%)	5 (10%)	0 (0%)	0 (0%)	4 (7%)
Positiva somente gene <i>mecA</i> (6)	0 (0%)	0 (0%)	2 (4%)	0 (0%)	0 (0%)	4 (7%)
Positiva somente gene <i>coA</i> (24)	0 (0%)	0 (0%)	11 (22,5%)	0 (0%)	0 (0%)	13 (23%)

*Culturas com crescimento bacteriano em Agar manitol: *Staphylococcus* coagulase-negativos e outras bactérias.

**Não foi possível a coleta de um swab nasal e um swab inguinal devido à condições clínicas do paciente.

4.4.3 Caracterização do SCC*mec* diretamente de amostras clínicas

Dentre 245 amostras *coA* e *mecA* positivas, 150 (61,2%) foram caracterizadas com sucesso quanto ao tipo de SCC*mec*. Inicialmente as reações de PCR foram realizadas de acordo com o protocolo de Zhang et al. (2005) e posteriormente aquelas amostras que apresentaram mais de uma banda na amplificação ou que não foram amplificadas por este método, foram submetidas à caracterização de SCC*mec* por outra metodologia (Oliveira et al., 2002). Apenas uma amostra com dificuldade de determinação do tipo de SCC*mec* pela metodologia de Zhang et al. (2005) foi determinada como tipo I por PCR proposta por Oliveira et al. (2002).

Portanto, um total de 39% (95/245) das amostras foi submetido à amplificação por ambas as reações de PCR, sendo que 63 amostras (25,7%) apresentaram amplificação para mais de um tipo de SCC*mec* (amplificação inespecífica) enquanto 32 amostras (13%) não foram amplificadas por nenhuma destas reações. De modo geral, os principais tipos de SCC*mec* evidenciados nesta análise foram 28% do tipo II, 14% do tipo I, 8% do tipo III e 9% do tipo IVa. A distribuição dos diversos tipos de SCC*mec* pode ser observada na tabela 12.

Tabela 12 – Distribuição dos tipos de SCCmec em 245 amostras clínicas nasais e inguinais coletadas de 190 pacientes hepatopatas acompanhados no HC-FMUSP no período de agosto de 2010 à dezembro de 2011

Tipos de SCCmec	Amostras clínicas de pacientes de lista de espera coA/ mecA positivas (158)	Amostras clínicas de pacientes transplantados coA/ mecA positivas (87)
Tipo I	19 (12%)	15 (17,2%)
Tipo II	39 (24,7 %)	30 (34,5%)
Tipo III	15 (9,5%)	5 (5,7%)
Tipo IVa	16 (10,1%)	7 (8%)
Tipo IVb	2 (1,3%)	-
Tipo IVc	1 (0,7%)	-
Tipo IVd	-	-
Tipo V	-	2 (2,3%)
Indefinido*	41 (25,9%)	22 (25,3%)
Não caracterizado**	25 (15,8%)	7 (8%)
TOTAL	158 (100%)	87 (100%)

* PCR apresentou amplificação de vários produtos (mais de uma banda) por diferentes metodologias (Zhang et al., 2005 e Oliveira et al., 2002)

** PCR não apresentou nenhuma amplificação por diferentes metodologias (Zhang et al., 2005 e Oliveira et al., 2002)

4.5 Técnicas genotípicas dos isolados identificados como MRSA por cultura microbiológica

4.5.1 Detecção dos genes coA/mecA e caracterização de SCCmec em identificados como MRSA por cultura microbiológica

Foram isoladas 44 cepas identificadas como MRSA de 43 culturas microbiológicas. Uma cultura microbiológica de um paciente transplantado apresentou 2 colônias aparentemente distintas. Deste total, 23 isolados MRSA foram obtidos dos pacientes da lista de espera e 21 foram obtidos de pacientes transplantados. Além disso, 31 (70%) cepas MRSA foram isoladas de sítio nasal e 13 (30%) de sítio inguinal.

Todos os isolados MRSA apresentaram amplificação tanto do gene coA quanto do gene mecA e foi determinado o tipo de SCCmec (Zhang et al., 2005).

Entre os isolados MRSA de pacientes hepatopatas (pacientes de lista de espera e transplantados), 23 (52,3%) isolados apresentaram SCCmec tipo II, demonstrando ser o tipo mais predominante nesse estudo. A distribuição dos demais tipos de SCCmec pode ser observada na figura 5.

Figura 5 – Distribuição dos tipos de SCCmec dos 44 isolados de MRSA de colonização obtidos de pacientes hepatopatas e transplantados hepáticos do HC-FMUSP, no período de 2010 à dezembro de 2011 .

É importante destacar que, entre os 23 isolados provenientes de pacientes de lista de espera, 12 (52%) isolados distintos foram caracterizados SCCmec tipo II, tipo de SCCmec considerado de origem hospitalar, caracterizando assim uma possibilidade de que este tipo de SCCmec esteja aumentando nos pacientes ambulatoriais.

Um dado interessante neste estudo foi a observação de mais de um tipo de SCCmec na mesma amostra clínica de um mesmo paciente. Pudemos observar colônias distintas, as quais foram identificadas fenotipicamente como MRSA, apresentando genes *coA* e *mecA*, mas pertencentes a dois tipos de SCCmec distintos. Estas reações de PCR, para caracterização do tipo de SCCmec, foram confirmadas com uso de diferentes metodologias (Zhang et al., 2005 e Oliveira et al., 2002).

Na figura 6 podem ser observados os tipos de SCCmec apresentados por alguns dos isolados de MRSA.

Figura 6 – PCR multiplex para determinação do tipo de SCCmec em amostras de *S. aureus* isolados em pacientes hepatopatas.

PM: marcador de peso molecular de 100-bp (Invitrogen®); Colunas 1, 2, 3, 4, 7, 11, 12, 15 e 17: Isolados SCCmec tipo II; Colunas 5, 6, 9, 10 e 16: Isolados SCCmec tipo IVa; Colunas 8, 13, 14, 19 e 20: isolados SCCmec tipo I; Coluna 18: Isolado SCCmec tipo V; Coluna 21: cepa NCTC 10442 (tipo I); Coluna 22: cepa N315 (tipo II); Coluna 23: cepa 85/2082 (tipo III); Coluna 24: cepa JSCS 1968 (tipo IVa); Coluna 25: cepa 1698 (tipo IVb), Coluna 26: cepa MR108 (tipo IVc); Coluna 27: cepa 4469 (tipo IVd); Coluna 28: cepa SCCmec tipo V; Colunas 29 a 31: controles negativos.

4.5.2 Análise do polimorfismo do DNA por eletroforese em campo pulsado (PFGE) identificados como MRSA por cultura microbiológica

Entre os 44 isolados MRSA não foi possível analisar um único isolado MRSA em virtude da perda de viabilidade da cepa. Outro achado interessante foi a presença de dois PFT diferentes em dois isolados de sítio nasal de um paciente transplantado; onde um isolado carregava SCCmec tipo III e o outro isolado SCCmec tipo I. Com essa exceção, todos os isolados de um mesmo paciente, mesmo quando oriundos de sítios de colonização distintos, apresentaram o mesmo PFT.

Na figura 7 é possível observar o PFT predominante no estudo.

Figura 7 – Representação do perfil molecular predominante dos isolados de MRSA.

PM: Marcador de peso molecular (*Lambda Ladder PFG Marker*[®], New England Biolabs); Colunas 1 à 18: isolados MRSA com perfil predominante, Coluna 19: Variante pertencente ao Clone Endêmico Brasileiro (BEC 79); Coluna 20: Variante pertencente ao Clone Endêmico Brasileiro (BEC 128).

O PFT predominante assim como demais PFT de isolados MRSA encontrados no estudo podem ser observados na Figura 8.

Figura 8 – Perfis moleculares encontrados em isolados de MRSA.

PM (peso molecular de 50 a 1000kb (New England, BioLabs).

Entre 43 perfis eletroforéticos de isolados MRSA, foram escolhidos 33, originados de 32 pacientes (um paciente apresentou dois isolados com perfis distintos) para a análise pelo software Bionumerics 7.1 onde foi possível construir um dendrograma e observar a similaridade dos isolados e a presença de clusters no estudo (Figura 9). Os PFT foram representados por letras maiúsculas enquanto os subtipos foram representados por números.

Entre os 33 isolados submetidos ao dendrograma, os isolados foram distribuídos em 20 subtipos e 10 PFT, nomeados de A à J.

O dendrograma revelou que 13 (39%) dos isolados MRSA testados pertenciam a um *cluster* principal, o PFT A, o qual demonstrou estar relacionado à cepa representativa do clone epidêmico New York/Japan (NY/Japan) BK2464. Quatro isolados (PFT F) apresentaram estar relacionados à cepa representativa do clone Endêmico Brasileiro (BEC) HSJ216, esses isolados também apresentaram mesmo *spa type* e *SCCmec* (t037-*SCCmec* III). Outros *clusters* menores também puderam ser notados (Figura 9).

Foi possível observar também que os PFTs B, H e J foram encontrados somente em isolados de pacientes de lista de espera enquanto os PFTs C, D, F e I somente em isolados de pacientes pós transplantados. Todos os outros PFTs, inclusive o A (PFT predominante no estudo), foram encontrados em ambos os grupos.

Figura 9 – Dendrograma de 33 isolados MRSA.

(A nomenclatura dos isolados pode ser compreendida da seguinte maneira: os isolados do grupo pós transplante são representados pela letra inicial P enquanto os isolados de pacientes da lista de espera não tem nenhuma letra inicial. O sítio nasal é representado pela letra N e o sítio inguinal é representado pela letra I, ambos no final do nome do isolado. Ex: isolado 111N é um isolado nasal de um paciente de lista de espera e o isolado P20I é um isolado inguinal de paciente pós transplantado).

* A cepa BK2464 é representativa do cone epidêmico NY/Japan e a cepa HSJ216 é representativa do clone BEC.

**Não foi possível a amplificação do gene *spa* deste isolado.

4.5.3 *spa* typing de isolados identificados como MRSA por cultura microbiológica

Um total de 34 isolados de MRSA foi destinado à tipagem do gene *spa*. Em dois isolados não foi possível a tipagem: um isolado de paciente de lista de espera por falta de viabilidade da cepa e outro isolado de paciente transplantado por não amplificação do gene *spa*. No total, 32 isolados foram submetidos à tipagem por *spa* typing.

Entre os isolados MRSA, foi possível identificar 10 tipos diferentes de *spa*, de acordo com as sequências de repetições encontradas, dos quais 9 deles (t002, t010, t037, t088, t110, t149, t311, t539 e t3824) estão descritos no banco de dados *on-line* (www.spaserver.ridom.de) destinado para essa análise. Alguns isolados com dificuldade para identificar o tipo de *spa* foram enviados ao Laboratório Nacional de Microbiologia do Canadá (National Microbiology Laboratory) e após os resultados, todos os isolados foram analisados.

Observou-se o predomínio do tipo t002 em 41% (13/32) dos isolados. Além disso, entre os 10 tipos identificados, 1 novo *spa* type parece ter sido encontrado nesse estudo uma vez que ainda não foi depositado nenhuma sequência de repetições como a encontrada nos bancos de dados destinados para esta análise (r26, r23, r17, r16, r20, r17, r12, r17, r16). Esse tipo ainda não classificado foi nomeado neste estudo como “tz”. Apenas um isolado apresentou esse *spa* type. Esse isolado não tipável teve todas as etapas (amplificação do gene *spa*, purificação, sequenciamento e análise do *spa*) repetidas para uma maior confiabilidade nos resultados gerados. A distribuição dos tipos de *spa* pode ser observada na tabela 13.

Em relação às *repeats*, entre os isolados foram identificadas 13 diferentes *repeats* (r02, r12, r13, r15, r16, r17, r20, r23, r24, r25, r26, r30 e r34). Nesse estudo não foi encontrada nenhuma nova *repeat*. As *repeats* foram nomeadas de acordo com a nomenclatura proposta por Harmsen et al. (2003).

Uma investigação mais detalhada da sequência de repetição - SSR (*Short Sequence Repeat*) de cada isolado nos permitiu observar as variações (deleções, mutações e inserções) encontradas no gene *spa* de cada isolado (Tabela 13).

Tabela 13 – Distribuição e comparação entre os tipos de *spa* e o perfil das sequências de repetições de 32 isolados MRSA

spa type (número de isolados)	Perfil das Sequências Repetições (SSR) dos isolados MRSA*													
t002 (13)	r26	r23	r17	r34	r17	r20	r17					r12	r17	r16
t311(2)	r26	r23	r17	r34	--	r20	r17					r12	r17	r16
tz(1)	r26	r23	r17	r16	--	r20	r17					r12	r17	r16
t088(2)	r26	r23	r17	r34	r17	r20	r17	r12				r12	r17	r16
t539(1)	r26	r23	r17	r34	r17	--	--					r12	r17	r16
t110(2)	r26	r30	r17									r12	r17	r16
t3824(1)	r26	r23	r17	r34	r17	r20	r17	r13	r17	r20	r17	r12	r17	r16
t149(5)	r26	r30	r17	r13	r17	r20	r17	r12			r17	r12	r17	r16
t037(4)	R15	r12	r16	r02	r25	r17	r24							

*A nomenclatura utilizada neste estudo foi a nomenclatura Ridom (Harmsen et al, 2003).

O tipo de *spa* mais frequente entre os isolados foi o t002, presente em 13 isolados. Entretanto, com a análise da SSR é possível observar isolados muito semelhantes ao t002, como por exemplo, o *spa type* t010 e t311 os quais possuem uma deleção da repeat, r23 e r17, respectivamente (as deleções estão representadas como um traço vermelho na tabela 13). Outro isolado muito semelhante ao t002 é o isolado t088, no qual a única diferença encontrada é uma inserção da repeat r12 (a repeat está representada em azul na tabela 13).

No isolado com *spa* ainda indeterminado, o qual chamamos de “tz”, foi possível perceber que apresentou uma deleção de repeat e a troca da r34 pela r16 quando comparado ao t002, porém apresentou-se mais semelhante ainda à outro tipo de *spa* também encontrado no estudo, o *spa type* t311, onde a única diferença foi a mudança da r34 pela r16 (destacadas em um quadrado na tabela 14) e ao analisar minuciosamente essas repeats é possível ressaltar uma maior identidade entre os tipos tz e t311 pois existe apenas a troca de 3 bases nitrogenadas (em negrito) entre as *repeats* r34 e r16 (r34 - AAAGAAGACA**AA**CAAAAAACCTGGT e r16 - AAAGAAGAC**GG**CAACAAA CCTGGT).

Quando comparado o PFGE com o método de tipagem molecular do gene *spa*, notou-se que o PFGE foi o método molecular mais discriminatório pois foram identificados 19 PFT (um PFT foi excluído pois o isolado não entrou no estudo do *spa typing* devido à não amplificação do gene *spa*) enquanto o *spa typing* distinguiu somente 10 tipos de *spa*.

Notou-se que entre os tipos de *spa* predominante t002, 69% (11/13) apresentaram SCCmec tipo II, além disso, o tipo de *spa* t037 (as repeats estão representadas em verde na tabela 13), identificado em 4 isolados, possui uma SSR bem diferente do tipo t002, o tipo mais frequente. Curiosamente, todos os isolados t037 foram caracterizados como SCCmec tipo III e apresentaram perfil clonal distinto do clone A por PFGE. Apesar desses achados e da semelhança entre os tipos de *spa* em alguns isolados, de uma forma geral não foi possível fazer uma relação absoluta entre os tipos de *spa* com os perfis moleculares apresentados no PFGE nem relacioná-los com a caracterização do SCCmec. A distribuição dos tipos de *spa*, SCCmec e PFT pode ser observada na tabela 14.

Tabela 14 – Distribuição dos 32 isolados MRSA analisados quanto ao SCCmec, tipagem do gene *spa* e classificação do PFGE

PFT	Clones Epidêmicos relacionados	<i>spa</i> type (número de isolados)	SCCmec
A1	NY/Japan	t002 (7)	II
A1	NY/Japan	t3824 (1)	II
A1	NY/Japan	t149 (1)	II
A2	NY/Japan	t539 (1)	II
A3	NY/Japan	t088 (1)	I
A4	NY/Japan	t002 (1)	II
A5	NY/Japan	t010 (1)	II
B1	NR	t311 (2)	II
B2	NR	t002 (1)	II
C	NR	t002 (1)	II
D1	NR	Tz (1)	Iva
D2	NR	t002 (1)	III
D3	NR	t002 (1)	Iva
E1	NR	t149 (1)	I
E1	NR	t149 (1)	I
E2	NR	t149 (1)	I
E3	NR	t088 (1)	II
F1	BEC	t037 (2)	III
F1	BEC	t037 (1)	III
F2	BEC	t037 (1)	III
G	NR	t110 (2)	I
H	NR	t002 (1)	II
I	NR	t149 (1)	Iva

NR= Não relacionados. Isolados não relacionados à clones epidêmicos.

Discussão

5 DISCUSSÃO

Staphylococcus aureus é um dos principais patógenos associados a infecções hospitalares das quais uma elevada proporção é causada por MRSA. Atualmente, colonização por MRSA é considerada uma pandemia, com clones de CA-MRSA e HA-MRSA distribuídos por todo o mundo (DeLeo, Chambers, 2009). Infecções por MRSA podem resultar em aumento de dias de internação e custos, com alta morbidade e mortalidade (Aldeyab et al., 2009). A triagem e a identificação rápida de pacientes portadores de MRSA é uma estratégia utilizada por vários países para prevenção e controle desse agente (Stefani et al., 2012).

Em nossa casuística, amostras clínicas de pacientes hepatopatas foram submetidos à triagem de MRSA por M-PCR *coA/mecA*. O DNA de todas as amostras foi submetido primeiramente à amplificação do gene ribossomal 16S. Considerando que a PCR é uma técnica molecular muito sensível e que as amostras foram originadas de sítios colonizados por micro-organismos, esperava-se a amplificação de todas as amostras para o gene 16S. Entretanto, seis amostras (2%) não apresentaram nenhuma amplificação para este gene, mesmo quando a M-PCR foi repetida com outros *primers* (*primer* de 150bp). Por tratar-se de uma região conservada do material genético de toda bactéria, é possível que a não amplificação deste gene nessas amostras tenha sido ocasionada por um problema na extração do DNA. Outra possibilidade seria a baixa carga bacteriana na amostra. Apesar da sensibilidade da PCR 16S não ter sido a esperada em nossa casuística, ainda assim encontra-se de acordo com outros estudos (Arabestani et al., 2014).

O presente estudo comparou o uso da M-PCR diretamente de amostras clínicas com a cultura microbiológica convencional para a identificação de MRSA em pacientes de lista de espera de transplante de fígado e pacientes transplantados. De modo geral, o estudo mostrou que embora a cultura microbiológica seja o padrão-ouro para detecção de isolados MRSA, a PCR de amostras clínicas apresentou alta positividade para este patógeno (71% das amostras clínicas foram positivas para MRSA diretamente pela PCR, enquanto que apenas 17% das culturas foram positivas para MRSA). Essas amostras “PCR positivas – culturas negativas” podem criar confusão no diagnóstico laboratorial e preocupação para os sistemas de vigilância que utilizam apenas a cultura microbiológica como método diagnóstico já

que nesse cenário pode haver pacientes portadores de MRSA os quais não foram identificados, porém podem ser fontes de transmissão do micro-organismo.

Os genes amplificados no estudo pela M-PCR para identificação de MRSA foram *mecA* (gene de resistência à meticilina) e *coA* (gene da coagulase presente em *S. aureus*). É sabido que outros micro-organismos coagulase negativa como *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* e *S. lugdunensis* também carregam o gene *mecA* (Farina et al., 2013). Por esse motivo alguns autores relatam a possibilidade de falsos-positivos quando utilizados métodos de detecção rápida por PCR, visto que não somente o *S. aureus* mais também outros micro-organismos que carregam os mesmos genes podem colonizar o mesmo sítio e levar a reações cruzadas na PCR (Stürenburg, 2009; Tacconelli, 2009; Wolk et al., 2009).

Em contrapartida, estudos também demonstraram que a cultura convencional tem sensibilidade bem menor frente aos métodos rápidos de PCR para identificação de pacientes portadores de MRSA, e que 38%-77% de portadores de MRSA não são detectados por métodos de cultura convencional, além da morosidade da identificação final do micro-organismo (Harbarth et al., 2006; Stürenburg, 2009).

Além disso, alguns estudos também relatam altas taxas de colonização por MRSA em diferentes populações: 58% em residentes de hospitais de longa permanência (Stone et al., 2012) e 76% em profissionais de saúde (Lyer et al., 2014).

A detecção rápida de MRSA por PCR pode oferecer muitas vantagens como: reduzir a transmissão hospitalar de MRSA para pacientes de alto risco ou em áreas de alto risco e também uma terapia antibiótica mais precoce e mais eficaz (Stürenburg, 2009; Honda et al., 2010).

Testes rápidos podem se tornar o método de escolha para detecção de indivíduos portadores de MRSA, entretanto, é importante salientar que o custo e a exigência de pessoal capacitado para sua realização podem ser fatores limitantes para sua utilização em determinados locais (Brenwald et al., 2010).

Uma vez que cada método de triagem apresenta vantagens e desvantagens, se torna necessário avaliar o custo benefício da metodologia baseado no grupo de pacientes e da infraestrutura local. Stürenburg (2009) evidenciou em seu estudo que testes rápidos de PCR foram capazes de reduzir a transmissão hospitalar de MRSA em pacientes de alto risco ou em áreas de alto risco, ao passo que a triagem

de todos os pacientes admitidos no hospital provavelmente não seria viável. Em um estudo de coorte onde pacientes identificados como portadores de MRSA foram submetidos imediatamente ao isolamento de contato concluiu-se que, após a implantação de testes rápidos de triagem de MRSA, houve a diminuição do tempo de notificação e de transmissão cruzada no centro de Terapia Intensiva avaliado (Harbarth et al., 2006). Entretanto, de acordo com trabalhos publicados por Buhlmann et al. (2008) e Herdman et al. (2009), a utilização de ensaios rápidos baseados em PCR pode ter menos utilidade em locais com baixa endemicidade de MRSA. A padronização dessa técnica no nosso hospital é importante pois possibilitará o seu uso em futuros estudos de intervenção. Informações sobre o custo-efetividade dos testes rápidos de MRSA ainda são escassas portanto essa questão continua a ser bastante discutida. No presente estudo, o tempo necessário para a identificação de MRSA pela M-PCR foi de aproximadamente 4 horas.

A caracterização do *SCCmec* assume grande importância na epidemiologia das infecções por MRSA, principalmente na determinação da sua origem e resistência aos antimicrobianos. Tem sido amplamente empregada e diferentes técnicas de PCR foram desenvolvidas por vários pesquisadores (Oliveira et al., 2002; Zhang et al., 2005; Milheirico et al., 2007; Zhang et al., 2009). Entretanto, estes mesmos autores relatam que pode haver certa dificuldade na amplificação destes elementos e que alguns isolados, portanto, são definidos como não tipáveis. Na nossa casuística, todos os isolados de cultura foram tipados, entretanto, em 38% das amostras clínicas identificadas apenas por M-PCR não foi possível caracterizar o tipo de *SCCmec*.

Embora existam muitas razões para a dificuldade na caracterização do *SCCmec*, Wolk et al. (2009) citam algumas explicações para este fenômeno: a possível presença de variantes de *SCCmec*; bactérias que poderiam não ser cultiváveis no momento da amostragem por baixa carga bacteriana (a qual pode ser provocada pelo uso de antibiótico ou assepsia antes da coleta, por exemplo); cepas de *S. aureus* as quais poderiam exigir a incubação anaeróbia ou outras condições especiais de crescimento.

O surgimento de novas cepas de MRSA com diversas origens genéticas também implica em uma constante atualização dos testes moleculares, o que dificulta a caracterização dos diferentes tipos e subtipos de *SCCmec* devido a novas

sequências de elementos genéticos estafilococócicos. No presente estudo as amostras de DNA extraídas diretamente de *swabs* nasais e inguinais foram submetidas à análise dos tipos de *SCCmec* e houve grande dificuldade na caracterização dos diferentes tipos. Por outro lado, os tipos de *SCCmec* dos isolados de MRSA identificados por cultura foram caracterizados com sucesso. Amostras clínicas podem apresentar uma dificuldade a mais para a caracterização do *SCCmec* devido a presença do DNA de outras bactérias não MRSA presente no mesmo sítio de colonização, o que poderia resultar na amplificação inespecífica de outros genes.

Apesar da dificuldade para a caracterização do *SCCmec* no presente estudo, entre 245 *swabs* positivos para genes *coA* e *mecA* por PCR, 69 apresentaram *SCCmec* tipo II (28,1%) concordando com a alta porcentagem de *SCCmec* tipo II encontrada em isolados de cultura microbiológica.

A distribuição dos tipos de *SCCmec* no Brasil vem sofrendo algumas modificações ao longo do tempo. Um estudo de vigilância de infecção hospitalar de corrente sanguínea entre junho de 2007 e março 2010 incluiu 16 hospitais Brasileiros e demonstrou que o *S. aureus* é o principal microorganismo neste tipo de infecção e que 43,7% eram meticilina-resistentes. Além disso, o estudo demonstrou que 46,7% dos isolados de MRSA carregavam *SCCmec* tipo III, 24,1% *SCCmec* tipo II, 16,1% *SCCmec* tipo IV (Marra, et al., 2011).

Em Goiânia, um estudo que avaliou a presença de portadores de MRSA entre crianças menores de cinco anos com infecção do trato respiratório e meningite, relatou que 1,0% (7/686) das crianças eram portadoras deste micro-organismo. Os sete isolados de MRSA foram classificados como sendo de origem comunitária. No entanto, todos foram caracterizados como *SCCmec* tipo III que é descrito classicamente de origem hospitalar (Lamaro-Cardoso et al., 2009).

Em estudo conduzido no HC-FMUSP, no período de maio de 2005 a novembro de 2005, 67 isolados de MRSA de pacientes admitidos na Unidade de Dermatologia do hospital foram estudados, dos quais 17 (25%) isolados eram *SCCmec* do tipo III e 25 (37%) *SCCmec* tipo IV.

Outro estudo realizado também no HC-FMUSP, em 2005, evidenciou que de um total de 151 isolados de MRSA hospitalares (HA-MRSA) obtidos de hemoculturas, 75% pertenciam ao *SCCmec* do tipo IV e apenas um isolado era

SCC*mec* do tipo III. A tipagem molecular por PFGE revelou a presença de 4 clones no estudo (Trindade et al., 2005).

Mais recentemente Caiaffa-Fillho et al. (2013) em um estudo realizado no HC-FMUSP em 2010 com isolados MRSA de infecção clínica de diferentes sítios demonstraram que entre os isolados de MRSA houve a presença de 12 subtipos de perfis por PFGE, entretanto dois clones foram predominantes. Além disso, MRSA SCC*mec* tipo II esteve presente em 50% dos isolados; dados concordantes com os achados do nosso estudo em isolados de cultura microbiológica dos quais 52,3% (23/44) dos isolados, também apresentavam SCC*mec* tipo II.

De acordo com todos estes dados, aventamos a hipótese que podem existir diferentes tipos de SCC*mec* circulantes em nosso hospital (em diferentes unidades) ou que realmente houve uma mudança na distribuição dos tipos de SCC*mec* evidenciado em 2005 para o ano de 2011 conforme também foi observado no estudo de Caiaffa-Filho et al. (2013).

Em relação à resistência aos antimicrobianos, a detecção de resistência a oxacilina pelo método de triagem mostrou excelente concordância com as concentrações inibitórias mínimas determinadas para este mesmo antimicrobiano. Em ambos os métodos, todos os isolados de MRSA testados foram considerados resistentes a este antimicrobiano, havendo 100% de correlação entre os testes. A detecção do gene *mecA* por PCR, também demonstrou 100% de correlação com os métodos acima, sendo detectado em todos os isolados de MRSA testados, independentemente dos perfis de sensibilidade encontrados.

Entre os isolados de MRSA estudados foram encontrados diferentes perfis de resistência aos antimicrobianos. Antimicrobianos como clindamicina, eritromicina, ciprofloxacina e penicilina apresentaram pouca atividade antimicrobiana para os isolados de MRSA analisados. Entretanto, todos os isolados apresentaram sensibilidade à vancomicina.

Um total de 43 isolados foi submetido ao teste de sensibilidade, sendo que cinco apresentaram resistência ao sulfametoxazol-trimetoprim (SXT) e apenas um isolado apresentou valores elevados de CIM (128,0µg/mL). Este isolado com elevada resistência ao SXT foi caracterizado como sendo SCC*mec* tipo V, resultado interessante pois o tipo V de SCC*mec* é considerado comunitário (CA-MRSA), bem como outro isolado tipo IV, e portanto deveriam apresentar apenas resistência para

os β -lactâmicos, codificada pela presença do único gene de resistência, o gene *mecA* (Ito et al., 2004). Esses isolados apresentaram 3 clones distintos do clone predominante no estudo (clone A) porém 3 isolados pareciam ser relacionados à um mesmo clone.

Estudos posteriores destes isolados tornam-se necessários para um melhor entendimento do aparecimento desta resistência, a qual pode estar relacionada à sequência de inserção IS431. A presença desta sequência de inserção, ligada ao gene *mecA* (IS431-*mec*) parece facilitar a aquisição de outros elementos genéticos que portam genes de resistência a antimicrobianos (Hiramatsu et al., 2001; Ito et al., 2001).

Grande parte dos MRSA isolados em ambiente hospitalar possui múltipla resistência aos antimicrobianos (Sader, 1994; Oliveira, 1998; Fluit et al., 2001). A maioria dos isolados da nossa casuística apresentou SCC*mec* tipo II e o cassete cromossômico do tipo III foi evidenciado apenas em 5 isolados de pacientes transplantados. Os isolados de MRSA hospitalares (HA-MRSA) pertencentes aos tipos I, II e III de SCC*mec* e altos níveis de resistência aos antimicrobianos pois possuem múltiplos elementos genéticos, móveis ou não, que conferem este perfil (Zetola et al., 2005).

A resistência a tetraciclina pode ser codificada pelo gene *tetK*, geralmente portado por plasmídios de baixo peso molecular, um deles o *pT181* que está inserido no SCC*mec* tipo III (Ito et al., 2003). O gene *tetK* codifica uma proteína que promove o efluxo da tetraciclina. A ausência do plasmídio pT181 no SCC*mec* tipo III (Oliveira et al., 2002), portanto, explicaria a sensibilidade a tetraciclina apresentada por 3 isolados com SCC*mec* tipo III encontrados em pacientes transplantados.

Outro transposon, *Tn554*, que carrega o gene *erm*, que confere resistência aos macrolídeos, lincosamidas, estreptograminas e espectinomicina, também está inserido no SCC*mec* tipo II, III e VIII (Ito et al., 2003; IWG-SCC, 2009), o que poderia explicar a resistência a eritromicina e clindamicina nos isolados de MRSA que possuem esse tipo de SCC*mec* nas amostras estudadas.

A presença de algumas sequências de inserção e transposons no SCC*mec*, pode causar ativação ou inativação de genes próximos por transposição de tais elementos em vários *loci* no cromossomo de cepas de *S. aureus*. As sequências IS256 e IS257 (equivalentes a IS431) formam promotores híbridos para o gene

aacAaphD no *Tn4001* e gene *dfrA* no *Tn4003*. Tais genes conferem resistência aos aminoglicosídeos e trimetoprima, respectivamente. A inativação pode ocorrer por inserção direta de tais elementos nos genes ou exercendo efeito polar sobre a transcrição de genes próximos (Ito et al., 2003). A presença desses genes poderia explicar o elevado percentual de resistência à gentamicina nos isolados analisados, bem como a resistência ao SXT observado em 5 isolados de colonização pós-transplante.

No presente estudo, foram identificadas 24 cepas sensíveis a quatro ou mais classes de antimicrobianos, porém resistentes aos beta-lactâmicos. Esse perfil de sensibilidade geralmente é relatado em cepas de MRSA comunitárias e que possuem *SCCmec* tipo IV ou V (Baba et al., 2002; Ito et al., 2004). Entretanto, a determinação do tipo de *SCCmec* para esses isolados demonstrou que 5 eram pertencentes ao *SCCmec* tipo I, 13 do *SCCmec* tipo II, 3 do *SCCmec* tipo III e 3 do *SCCmec* tipo IV. Deste total de isolados, 33% (8/24) possuíam o PFT principal A (considerando que isolados de um mesmo paciente possuíam o mesmo PFT). Outras casuísticas demonstram ser comum isolados de um mesmo clone ter diferentes *SCCmec* (McDougal et al., 2003; Golding et al., 2008). As cepas de origem hospitalar geralmente possuem *SCCmec* tipo I, II ou III (Hiramatsu et al., 2001). No entanto, existem alguns relatos de isolados de MRSA não multirresistentes, denominados MRSA não multirresistentes aos antimicrobianos (NORSA), com características similares aos isolados acima citados, presentes em hospitais em diversos países. Pournaras et al. (2001) relataram aumento na proporção de cepas de MRSA sensíveis a diversas classes de antimicrobianos em um hospital geral na Grécia. Okuma et al. (2002) relataram cepas com perfil de sensibilidade similar na Austrália. Aires-de-Sousa e de Lencastre (2003) estudaram uma coleção de MRSA de origem hospitalar de 12 países e encontraram cepas não multirresistentes, geneticamente diversas e que apresentavam *SCCmec* tipo IV em isolados provenientes de diferentes países (como Japão, Argentina, Colômbia, Polônia, República Tcheca e Portugal).

Em relação à clonalidade, determinada por PFGE, pôde-se observar que houve o predomínio de um PFT (perfil A) em 39% dos 33 isolados analisados. A presença do PFT A foi de 47% (8/17) em isolados de pacientes hepatopatas (pré-transplante) e 31% (5/16) em pacientes transplantados. Dos isolados de MRSA

pertencentes ao PFT A, apenas um isolado apresentou SCCmec do tipo I (1/13) enquanto todos os outros isolados foram caracterizados como SCCmec tipo II (12/13). Entretanto, quando analisamos todos os isolados do estudo com SCCmec tipo II, observamos que nem todos apresentaram o mesmo PFT. De um total de 18 isolados de MRSA com SCCmec do tipo II, 12 isolados (67%) foram relacionados ao PFT A.

Conforme trabalho de revisão publicado por Rodríguez-Noriega et al. (2010), a distribuição de diferentes clones de MRSA tem sido reportada por diversos autores na América Latina. Segundo esta revisão, os primeiros clones de MRSA começaram a circular no Brasil em 1990 e desde então houve uma grande disseminação destes por todo o mundo.

Em estudo realizado por Sader et al. (1994), foi descrita a disseminação inter-hospitalar de um único clone de MRSA em oito dos nove hospitais da cidade de São Paulo entre 1990 e 1992. Um ano depois, isolados de MRSA coletados a partir de cinco grandes hospitais de ensino em diferentes partes do Brasil pertenciam a um mesmo padrão de PFGE, novamente indicando que um único clone estava disseminado pelo Brasil, denominado de clone brasileiro (Teixeira et al., 1996). O primeiro clone endêmico brasileiro de MRSA, designado de BEC (*Brazilian Endemic Clonal*), foi descrito em 1993 e mostrou-se altamente prevalente nos anos de 1990 a 2004 (Amaral et al., 2005; de Miranda et al., 2007). O clone BEC foi caracterizado por ser resistente a vários antimicrobianos, conter SCCmec tipo III e possuir um perfil característico na PFGE.

Desde então, o clone brasileiro e suas variantes, denominados de *Brazilian Endemic Clonal Complex* (BECC) foram altamente prevalentes em diversos hospitais brasileiros (de Miranda et al., 2007; Perez, Azevedo, 2008; Marra, et al., 2011; Mimica et al., 2012).

Em nosso estudo, detectamos a presença de SCCmec tipo III em 6 isolados de cultura microbiológica, todos advindos de pacientes transplantados. Os isolados SCCmec tipo III apresentaram perfis diferentes do clone predominante PFT A, entretanto 5 desses isolados eram pertencentes ao PFT F os quais foram relacionados à cepa representativa do clone BEC.

Por outro lado, o PFT A, predominante em nosso estudo, demonstrou estar relacionado ao clone NY/Japan, com a exceção de um isolado SCCmec tipo I,

todos esses isolados apresentaram SCC*mec* tipo II. Um estudo recente realizado em nosso hospital por Caiaffa-Filho et al (2013) teve achados semelhantes e demonstrou que 60% dos isolados de MRSA de hemocultura eram SCC*mec* II e relacionados ao clone NY/Japan.

Embora não seja frequente a descrição de surtos hospitalares causados por MRSA nas Unidades de Transplante Hepático no Brasil, o presente estudo mostrou que este patógeno está presente em nosso hospital e que coloniza tanto pacientes ambulatoriais como pacientes hospitalizados. Estudo realizado por Romanelli e colaboradores (2010) descreveu um surto ocasionado por MRSA em infecções de sítio cirúrgico em paciente transplantado e salientou a importância de diversos aspectos relacionados com medidas de controle na disseminação deste patógeno sob o ponto de vista microbiológico, epidemiológico e molecular.

Assim, o conhecimento da epidemiologia de MRSA nestes pacientes, bem como a detecção precoce de portadores de MRSA, permite que medidas de controle e prevenção da disseminação deste patógeno possam ser instituídas.

Uma estratégia que vem sendo mais utilizada recentemente para controlar a disseminação de MRSA é o método de tipagem do gene *spa* o qual também tem demonstrado ser útil não só para investigação de surtos hospitalares mas também para estudos de evolução molecular de MRSA (Koreen et al., 2004).

No presente estudo, 32 isolados foram submetidos à tipagem do gene *spa*. Foram identificados 10 diferentes tipos de *spa* de acordo com as sequências de repetições encontradas, porém, 9 deles já foram anteriormente descritos (t002, t010, t037, t088, t110, t149, t311, t539 e t3824) enquanto um tipo ainda encontra-se desconhecido, o qual denominamos de tz.

Existem poucos estudos que relatam o uso de *spa typing* no Brasil. Entretanto, em Goiânia um estudo de vigilância de colonização nasal de *S. aureus* em uma população pediátrica também identificou por *spa typing* a presença de *spa type* t002 e t037 entre os 4 *spa types* de sua amostragem (Vieira et al., 2014). Na mesma região, outro estudo anterior também com crianças identificou o *spa type* t037 entre 7 *spa types* determinados (Lamaro-Cardoso et al., 2009). Um relato de caso no Brasil de uma infecção por CA-MRSA após trauma reportou que o isolado foi caracterizado como *spa type* t311 (Camargo et al., 2013). Mais recentemente, Pires et al (2014) em um estudo para avaliar a prevalência de *S. aureus* na

população de Botucatu encontraram 8 isolados MRSA dos quais 7 eram *spa type* t002 e 1 *spa type* t021. Os *spa types* t010, t088, t110, t149, t311, t539 e t3824, também relatados em nosso estudo, ainda não foram descritos no Brasil em estudos com humanos, conforme a literatura.

É sabido que a tipagem do gene *spa* consiste no sequenciamento da região polimórfica X do gene da proteína A (gene *spa*) conhecida por ser uma região com sequências repetidas e também muito susceptível à inserções, deleções e mutações. Desta forma, com a investigação minuciosa das SSR e a uma comparação entre elas foi possível observar semelhanças e diferenças encontradas entre os isolados (tabela 13).

Embora existam neste estudo *spa types* aparentemente muito semelhantes, não foi possível relacioná-los aos perfis gerados pelo PFGE pois um único tipo de *spa* apresentou mais de um perfil por PFGE e inversamente, os perfis gerados por PFGE também apresentaram mais de um tipo de *spa*. Golding et al. (2008) conduziram um longo estudo no Canadá com 1488 isolados de MRSA e chegaram à mesma conclusão que os tipos de *spa* não se limitaram a um padrão específico de bandas PFGE, e que os padrões de PFGE indistinguíveis poderiam conter de um à cinco tipos diferentes de *spa*. Entretanto, Golding et al. (2008) fizeram uma análise mais detalhada da sequência de repetições do gene *spa* de seus isolados e desta forma, propuseram uma abordagem menos discriminatória envolvendo o agrupamento de *spa types* relacionados.

A relação entre SCCmec e *spa typing* diverge em grande parte dos estudos, pois um único *spa typing* pode representar vários tipos de SCCmec (Kooren et al., 2004; Cookson et al., 2007; Hallin et al., 2007; Golding et al., 2008). Contudo no presente estudo, observou-se que todos os isolados com *spa type* t037 apresentaram SCCmec tipo III, porém só foi possível notar essa característica com o tipo t037. A mesma relação entre *spa type* t037 e SCCmec tipo III pode ser observada em outros dois estudos brasileiros (Lamaro-Cardoso et al., 2009; Vieira et al., 2014). Esses achados chamam a atenção para a utilidade do *spa typing* para a investigação epidemiológica.

O poder discriminatório elevado de PFGE é uma excelente ferramenta para o estudo de surtos de curta duração, e é um método útil para estudos de vigilância epidemiológica de longo prazo. No entanto, PFGE é trabalhoso, demorado e

tecnicamente exigente. A adesão aos protocolos de padronização entre os laboratórios e a interpretação subjetiva dos resultados de PFGE também conduziu à uma incapacidade de desenvolver bases de dados internacionais para MRSA (Deurenberg et al., 2007).

Em comparação com PFGE, *spa typing* é capaz de dar resultados mais rápidos, menos trabalhoso, possui protocolos definidos, permite o processamento de um grande número de isolados e usa critérios de interpretação bem definidos. Os dados podem ser facilmente exportáveis e ainda existe um banco de dados de linguagem universal que compara os tipos. Não obstante, estudos demonstraram que o custo do processamento para cada isolado parece ser quase o mesmo quando comparado com o PFGE (Golding et al., 2008). Portanto, com a atual necessidade de resultados mais rápidos para ações efetivas e intervenções dentro do ambiente hospitalar, o método de *spa typing* apesar de menor poder discriminatório, pode ser aplicado nos estudos de isolados endêmicos e epidêmicos.

6 CONCLUSÕES

- Pacientes hepatopatas são frequentemente colonizados por MRSA, e pacientes transplantados de fígado foram mais colonizados que pacientes cirróticos pela cultura microbiológica.
- A M-PCR *coA/mecA* diretamente de amostras clínicas apresentou alta positividade quando comparada a cultura microbiológica para identificar MRSA.
- A maioria dos isolados de MRSA foi sensível à quatro ou mais classes de antimicrobianos porém resistentes aos beta-lactâmicos.
- SCC*mec* tipo II foi o tipo de SCC*mec* mais frequente e o PFT predominante em nosso estudo foi relacionado ao clone NY/Japan.
- *spa* type t002 foi o mais frequente e foi encontrado um *spa* ainda não descrito no estudo.
- O PFGE demonstrou ser mais discriminatório que *spa* typing e não houve uma boa concordância entre os padrões de PFGE e *spa* types.
- Este estudo também demonstrou que houve mudança de clones MRSA em nosso hospital, devido à substituição do clone BEC pelo clone NY/Japan na última década.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho foi apresentado na forma de pôster no 22º ECCIMID (*European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*), realizado no Reino Unido na cidade de Londres, durante o período de 31 de março a 03 de abril de 2012.

Este trabalho também foi apresentado na forma de pôster no 8º Congresso Paulista de Infectologia realizado em Campos de Jordão, no período de 16 a 19 de maio de 2012.

Este trabalho foi apresentado na forma de pôster no IDWeek-Advancing Science, Improving Care 2012, realizado nos Estados Unidos da América, na cidade de San Diego, durante o período de 17 a 21 de outubro de 2012.

Este trabalho foi apresentado na forma de publicação no 23º ECCIMID (*European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*), realizado na Alemanha, na cidade de Berlin, durante o período de 27 à 30 de abril de 2013.

Este trabalho foi apresentado na forma de pôster no ICAAC (Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy) 2014, realizado nos Estados Unidos da América, na cidade de Washington, durante o período de 5 a 9 de setembro de 2014.

ANEXOS

ANEXO A – Resumo Processo FAPESP Nº2009/17896-1

Infecções Hospitalares causadas por *Staphylococcus aureus* em pacientes transplantados hepáticos

S. aureus é um importante agente de infecções de corrente sanguínea, sítio cirúrgico e pneumonia em pacientes transplantados hepáticos. Dados do serviço de transplante hepático do HC-FMUSP mostram que *S. aureus* foi o agente mais freqüente de infecção bacteriana nos 104 pacientes avaliados de 2002 a 2005 sendo responsável por 17% das infecções. A caracterização molecular de isolados de *S. aureus* resistente a oxacilina na unidade de transplante hepático do HC-FMUSP é importante para definir estratégias que possam ser úteis no seu controle e prevenção. Portanto, a realização de um projeto avaliando as taxas de infecção hospitalar causada por *S. aureus* resistente a oxacilina e sua fonte de infecção nos pacientes transplantados hepáticos do HC-FMUSP se faz necessária. O estudo será dividido em 03 etapas. Diagnóstico do problema, nesta etapa, será determinada a prevalência de portadores nasais de *S. aureus* resistentes a oxacilina entre os pacientes da lista de espera de transplante hepático e a incidência das infecções após transplante (componente cirúrgico). Todos os isolados de MRSA (obtidos nos períodos de pré e pós-transplante) serão caracterizados fenotipicamente e genotipicamente (genes de resistência e de virulência) por diferentes metodologias incluindo microarray. A intervenção será realizada de acordo com o resultado da tipagem molecular dos isolados, se caracterizado a transmissão cruzada serão enfatizadas as medidas de precaução padrão e contato e caracterizada com fonte a colonização do próprio pacientes será indicada descolonização. Na terceira etapa as taxas de infecção hospitalar por *S. aureus* antes e após a intervenção.

ANEXO B – Termo de consentimento livre e esclarecido

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O Sr.(a) está convidado a participar de um estudo cujo objetivo é avaliar a presença da bactéria *Staphylococcus aureus* em sua mucosa nasal (nariz) e de região inguinal (pele), ou seja, gostaríamos da sua autorização para realizarmos um estudo que permitirá verificar se o Sr.(a) é portador(a) desta bactéria antes de realizar o transplante de fígado. Além disso, caso esta bactéria esteja presente em seu nariz ou na região inguinal (pele), solicitamos sua autorização para receber tratamento com um antibiótico, mupirocina, que tem por finalidade diminuir e até eliminar a chance do(a) Sr.(a) desenvolver infecção por esta bactéria após a realização do transplante. Caso o(a) Sr.(a) já tenha recebido o transplante, solicitamos sua participação no estudo para realização de um controle microbiológico pós-transplante.

Titulo do projeto: Infecções Hospitalares causadas por *S. aureus* em pacientes transplantados hepáticos.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Prof Dra Silvia Figueiredo Costa.

CARGO/FUNÇÃO: Médica do Grupo de Imunodeprimidos/Professora

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 73440.

UNIDADE DO HCFMUSP: Departamento de Moléstias Infecciosas

AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO (X) RISCO MÉDIO ()

RISCO BAIXO () RISCO MAIOR ()

DURAÇÃO DA PESQUISA : 36 meses

OBJETIVO DO ESTUDO: Este estudo visa descrever as taxas de infecção hospitalar e a prevalência de colonização por *S. aureus* em pacientes transplantados hepáticos do HCFMUSP no período de 02 anos. Além disso, o presente estudo permitirá avaliar a resistência e a virulência de *S.aureus* isolados destes pacientes.

1. NOME:.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

2.RESPONSÁVEL LEGAL.....

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO.:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD(.....).....

1 – Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que visa determinar a presença da bactéria *S. aureus* em mucosa nasal (nariz) e região inguinal (pele) antes e após a realização do transplante hepático, bem como, estudar as características genéticas destas bactérias isoladas;

2 – O paciente só será submetido a tratamento com antibiótico mupirocina, se estiver colonizado com esta bactéria antes da realização do transplante;

3 – Os procedimentos a serem realizados compreendem: coleta de dados do participante (como nome, RG, data de nascimento, sexo e dados clínicos) e coleta de amostras clínicas de secreção nasal e inguinal, a qual será realizada em diferentes momentos (períodos pré e pós-transplante) por profissional capacitado, sem ocasionar nenhum risco à saúde do participante (como por exemplo, dor);

4 – Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é Dra. Sílvia Figueiredo Costa, que pode ser encontrado no endereço Rua Dr. Enéas de Carvalho Aguiar 500, IMT II, 1º andar, sala 109. Telefone(s) 11-3061-7030. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – telefone: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br;

- 5 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;
- 6 – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;
- 7 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;
- 8 – Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa;
- 9 - Os dados obtidos serão exclusivamente utilizados nesta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "**Infecções Hospitalares causadas por *S. aureus* em pacientes transplantados hepáticos**". Eu discuti com a Dra Silvia Figueiredo Costa sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Assinatura da testemunha

Data ____/____/2010 Data ____/____/2010

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aires de Sousa M, de Lencastre H. Evolution of sporadic isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in hospitals and their similarities to isolates of community-acquired MRSA. J Clin Microbiol. 2003 Aug;41(8):3806-15.
2. Aldeyab MA, Kearney MP, Hughes CM, Scott MG, Tunney MM, Gilpin DF, Devine MJ, Watson JD, Gardiner A, Funston C, Savage K, McElnay JC. Can the use of a rapid polymerase chain screening method decrease the incidence of nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*? J Hosp Infect. 2009 Jan;71(1):22-8.
3. Amaral MM, Coelho LR, Flores RP, Souza RR, Silva-Carvalho MC, Teixeira LA, Ferreira-Carvalho BT, Figueiredo AM. The predominant variant of the Brazilian epidemic clonal complex of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* has an enhanced ability to produce biofilm and to adhere to and invade airway epithelial cells. J Infect Dis. 2005 Sep;192(5):801-10.
4. Andriesse GI, van Rijen M, Bogaers D, Bergmans AM, Kluytmans JA. Comparison of two PCR-based methods and conventional culture for the detection of nasal carriage of *Staphylococcus aureus* in pre-operative patients. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2009 Oct;28(10):1223-6.
5. Arabestani MR, Fazzeli H, Nasr Esfahani B. Identification of the most common pathogenic bacteria in patients with suspected sepsis by multiplex PCR. J Infect Dev Ctries. 2014 Apr 15;8(4):461-8.
6. Baba T, Takeuchi F, Kuroda M, Yuzawa H, Aoki K, Oguchi A, Nagai Y, Iwama N, Asano K, Naimi T, Kuroda H, Cui L, Yamamoto K, Hiramatsu K. Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. Lancet. 2002 May;25;359(9320):1819-27.
7. Bailey RJ, Woolf IL, Cullens H, Williams R. Metabolic inhibition of polymorphonuclear leucocytes in fulminant hepatic failure. Lancet. 1976 May;29;1(7970):1162-3.
8. Barrett FF, McGehee RF, Finland M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at Boston city hospital. N Engl J Med. 1968 Aug;29;279(9):441-8.

9. Berger-Bächli B, Rohrer S. Factors influencing methicillin resistance in staphylococci. *Arch Microbiol.* 2002 Sep;178(3):165-71.
10. Berglund C, Ito T, Ikeda M, Ma XX, Söderquist B, Hiramatsu K. Novel type of staphylococcal cassette chromosome *mec* in a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain isolated in Sweden. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 Oct; 52(10):3512-6.
11. Berglund C, Ito T, Ma XX, Ikeda M, Watanabe S, Söderquist B, Hiramatsu K. Genetic diversity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying type IV SCC*mec* in Örebro County and the western region of Sweden. *J Antimicrob Chemother.* 2009 Jan;63(1):32-41.
12. Bert F, Bellier C, Lassel L, Lefranc V, Durand F, Belghiti J, Mentré F, Fantin B. Risk factors for *Staphylococcus aureus* infection in liver transplant recipients. *Liver Transpl.* 2005 Sep;11(9):1093-9.
13. Bert F, Larroque B, Paugam-Burtz C, Janny S, Durand F, Dondero F, Valla DC, Belghiti J, Moreau R, Nicolas-Chanoine MH. Microbial epidemiology and outcome of bloodstream infections in liver transplant recipients: an analysis of 259 episodes. *Liver Transpl.* 2010 Mar;16(3):393-401.
14. Bocher S, Middendorf B, Westh H, Mellmann A, Becker K, Skov R, Friedrich AW. Semi-selective broth improves screening for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother.* 2010 Apr;65(4):717-20.
15. Boucher H, Miller LG, Razonable RR. Serious infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis.* 2010 Sep 51(Suppl 2): S183-S197.
16. Brenwald NP, Baker N, Oppenheim B. Feasibility study of a real-time PCR test for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a point of care setting. *J Hosp Infect.* 2010 Mar;74(3):245-9.
17. Buhlmann M, Bogli-Stuber K, Droz S, Muhlemann K. Rapid screening for carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by PCR and associated costs. *J Clin Microbiol.* 2008 Jul;46(7):2151-4.
18. Caboclo RM, Cavalcante FS, Iorio NL, Schuenck RP, Olendzki AN, Felix MJ, Chamon RC, dos Santos KR. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in

- Rio de Janeiro hospitals: dissemination of the USA400/ST1 and USA800/ST5 SCC*mec* type IV and USA100/ST5 SCC*mec* type II lineages in a public institution and polyclonal presence in a private one. *Am J Infect Control*. 2013 Mar;41(3):e21-6.
- 19.Caiaffa-Filho HH, Trindade PA, Gabriela da Cunha P, Alencar CS, Prado GV, Rossi F, Levin AS. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying SCC*mec* type II was more frequent than the Brazilian endemic clone as a cause of nosocomial bacteremia. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013 Aug;76(4):518-20.
 - 20.Camargo CH, da Cunha Mde L, Bonesso MF, da Cunha FP, Barbosa AN, Fortaleza CM. Systemic CA-MRSA infection following trauma during soccer match in inner Brazil: clinical and molecular characterization. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013 Jul;76(3):372-4.
 - 21.Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Four pediatric deaths from community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* — Minnesota and North Dakota, 1997-1999. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 1999 Aug 20;48(32):707-10.
 - 22.Chambers HF. Methicillin-resistant *Staphylococci*. *Clin Microbiol Rev*. 1998 Apr;1(2):173-86.
 - 23.Chang FY, Singh N, Gayowski T, Wagener MM, Marino IR. *Staphylococcus aureus* nasal colonization in patients with cirrhosis: prospective assessment of association with infection. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 1998 May;19(5):328-32.
 - 24.Chapoutot C, Pageaux GP, Perrigault Pf. *Staphylococcus aureus* nasal carriage in 104 cirrhotic and control patients: a prospective study. *J Hepatol*. 1999 Feb;30(2):249-53.
 - 25.Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth Information Supplement M100-S21. Wayne, Pennsylvania: CLSI, 2011.
 - 26.Cookson BD, Robinson DA, Monk AB, Murchan S, Deplano A, et al. Evaluation of molecular typing methods in characterizing a European collection of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains: The HARMONY collection. *J Clin Microbiol*. 2007 Jun;45(6):1830-7.

27. Cosgrove SE, Sakoulas G, Perencevich EN, et al. Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia : a meta-analysis. Clin Infect Dis. 2003 Jan;1;36(1):53-9.
28. DeLeo FR, Chambers HF. Reemergence of antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* in the genomics era. J Clin Invest. 2009 Sep;119(9):2464-74.
29. de Miranda OP, Silva-Carvalho MC, Ribeiro A, Portela F, Cordeiro RP, Caetano N et al. Emergence in Brazil of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates carrying SCC*med*IV that are related genetically to the USA800 clone. Clin Microbiol Infect. 2007 Dec;13(12):1165-72.
30. Desai D, Desai N, Nightingale P, Elliott T, Neuberger J. Carriage of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* is associated with an increased risk of infection after liver transplantation. Liver Transpl. 2003 Jul;9(7):754-9.
31. Deurenberg, RH, Stobberingh, EE. The evolution of *Staphylococcus aureus* Infection, Genetics and Evolution. 2008; 8(6):747-63.
32. Deurenberg RH, Vink C, Kalenic S, Friedrich AW, Bruggeman CA, Stobberingh EE. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Infect. 2007 Mar;13(3):222-35.
33. Dufour P, Gillet Y, Bes M. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in France: emergence of a single clone that produces Panton–Valentine leukocidin. Clin Infect Dis. 2002; 35: 819–24.
34. Efuntoye MO, Adetosove AI. Enterotoxigenicity and rug sensitivity of staphylococci from children aged five years and below with sporadic diarrhoea. East Afr Med J. 2003 Dec;80(12):656-9.
35. Emaneini M, Bigverdi R, Kalantar D, Soroush S, Jabalameli F, Noorazar Khoshgnab B, Asadollahi P, Taherikalani M. Distribution of genes encoding tetracycline resistance and aminoglycoside modifying enzymes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from a burn center. Ann Burns Fire Disasters. 2013 Jun 30;26(2):76-80.
36. Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H, Spratt BG. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Proc Natl Acad Sci USA. 2002 May 28;99(11):7687-92.

- 37.Fagioli S, Colli A, Bruno R, Craxì A, Gaeta GB, Grossi P, Mondelli MU, Puoti M, Sagnelli E, Stefani S, Toniutto P, Burra P; 2011 AISF Single Topic Group. Management of infections pre- and post-liver transplantation: Report of a AISF Consensus Conference. J Hepatol. 2013 60(5):1075-89.
- 38.Fariña N, Carpinelli L, Samudio M, Guillén R, Laspina F, Sanabria R, Abente S, Rodas L, González P, de Kaspar HM. Clinically significant coagulase-negative staphylococci: most frequent species and virulence factors. Rev Chilena Infectol. 2013 Oct; 30(5):480-8.
- 39.Fluit AC, Wielders CLC, Verhoef J, Schimtz FJ. Epidemiology and susceptibility of 3.051 *Staphylococcus aureus* isolates from 25 university hospitals participating in the European SENTRY study. J Clin Microbiol. 2001;39:3727-32.
- 40.Francois P, Pittet D, Bento M, Pepey B, Vaudaux P, Lew D, Schrenzel J. Rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from sterile or nonsterile clinical samples by a new molecular assay. J Clin Microbiol. 2003;Jan;41(1):254-60.
- 41.Furuya D, Tsuji N, Kuribayashi K, Tanaka M, Hosono Y, Uehara N, Watanabe N. Evaluation of *spa* typing for the classification of clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. Jpn J Infect Dis. 2010; 63 (5): 364-7.
- 42.Gales AC, Sader HS, Ribeiro J, Zoccoli C, Barth A, Pignatari AC. Antimicrobial susceptibility of gram-positive bacteria isolated in Brazilian hospitals participating in the SENTRY Program (2005–2008). Braz J Infect Dis. 2009;13:90-8.
- 43.Golding GR, Campbell JL, Spreitzer DJ, Veyhl J, Surynicz K, Simor A, Mulvey MR; Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program. A preliminary guideline for the assignment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to a Canadian pulsed-field gel electrophoresis epidemic type using *spa* typing. Can J Infect Dis Med Microbiol. 2008 July; 19(4): 273–81.
- 44.Hallin M, Deplano A, Denis O, De Mendonça R, De Ryck R, Struelens MJ. Validation of pulsed-field gel electrophoresis and *spa* typing for long term, nationwide epidemiological surveillance studies of *Staphylococcus aureus* infections. J Clin Microbiol. 2007 Jan;45(1):127-33.
- 45.Harbarth S, Masuet-Aumatell C, Schrenzel J, Francois P, Akakpo C, Renzi G, Pugin J, Ricou B, Pittet D. Evaluation of rapid screening and pre-emptive contact isolation for detecting and controlling methicillin-resistant *Staphylococcus*

- aureus* in critical care: an interventional cohort study. Crit Care. 2006 Feb;10(1):25.
46. Harmsen D, Claus H, Witte W, Rothgänger J, Claus H, Turnwald D, Vogel U. Typing of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in a University Hospital Setting by Using Novel Software for *spa* Repeat Determination and Database Management. J Clin Microbiol . 2003;41(12): 5442–8.
 47. Herdman MT, Wyncoll D, Halligan E, Cliff PR, French G, Edgeworth JD. Clinical application of real-time PCR to screening critically ill and emergency-care surgical patients for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a quantitative analytical study. J Clin Microbiol 2009;47:4102–8.
 48. Hidron AI, Kourbatova EV, Halvosa JS, Terrell BJ, McDougal LK, Tenover FC, Blumberg HM, King MD. Risk factors for colonization with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in patients admitted to an urban hospital: emergence of community-associated MRSA nasal carriage. Clin Infect Dis. 2005 Jul 15;41(2):159-66.
 49. Hiramatsu K, Ito T, Hanaki H. Mechanisms of methicillin and vancomycin in *Staphylococcus aureus*. Ballière's Clin Infect Dis. 1999; 5:221-42.
 50. Hiramatsu K, Ito T, Tsubakishita S, Sasaki T, Takeuchi F, Morimoto Y, Katayama Y, Matsuo M, Kuwahara-Arai K, Hishinuma T, Baba T. Genomic Basis for Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. Infect Chemother. 2013 Jun;45(2):117-36.
 51. Hisata K, Kuwahara-Arai K, Yamamoto M, Ito T, Nakatomi Y, Cui L, Baba T, Terasawa M, Sotozono C, Kinoshita S, Yamashiro Y, Hiramatsu K. Dissemination of methicillin-resistant staphylococci among healthy Japanese children. J Clin Microbiol. 2005 Jul;43(7):3364-72.
 52. Holzkecht BJ, Hardardottir H, Haraldsson G, Westh H, Valsdottir F, Boye K, Karlsson S, Kristinsson KG, Gudlaugsson O. Changing epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Iceland from 2000 to 2008: a challenge to current guidelines. J Clin Microbiol. 2010 Nov;48(11):4221-7.
 53. Honda H, Krauss MJ, Coopersmith CM, Kollef MH, Richmond AM, Fraser VJ, et al. *Staphylococcus aureus* nasal colonization and subsequent infection in intensive care unit patients: does methicillin resistance matter? Infect Control Hosp Epidemiol. 2010;31:584–91.

54. Hueletsky A, Giroux R, Rossbach V, et al. New real-time PCR assay for rapid detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* directly from specimens containing a mixture of staphylococci. *J Clin Microbiol* 2004;42:1835-4.
55. Hussain FM, Boyle-Vavra S, Bethel CD, Daum RS. Current trends in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at a tertiary care pediatric facility. *Pediatr Infect Dis J*. 2000 Dec;19(12):1163-6.
56. Ito T, Katayama Y, Asanda K. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001 45: 1323–6.
57. Ito T, Katayama Y, Hiramatsu K. Cloning and nucleotide sequence determination of the entire *mec* DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999 Jun;43(6):1449-58.
58. Ito T, Ma XX, Takeuchi F, Okuma K, Yuzawa H, Hiramatsu K. Novel type V staphylococcal cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccrC*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004 Jul;48(7):2637-51.
59. Ito T, Okuma K, Ma XX, Yuzawa H, Hiramatsu K. Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. *Drug Resist Updat*. 2003 Feb;6 (1):41-52.
60. IWG-SCC. Classification of staphylococcal cassette chromosome *mec* (*SCCmec*): guidelines for reporting novel *SCCmec* elements. *Antimicrob. Agents. Chemother*. 2009;53:4961–4967.
61. Iyer A, Kumosani T, Azhar E, Barbour E, Harakeh S. High incidence rate of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) among healthcare workers in Saudi Arabia. *J Infect Dev Ctries*. 2014 Mar 13;8(3):372-8.
62. Janda JM; Abbott SL. 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *J Clin Microbiol*. 2007, 45(9):2761.
63. Jessen O, Rosendal K, Bulow P, Faber V, Eriksen KR. Changing staphylococci and staphylococcal infections: A ten-year study of bacteria and cases of bacteremia. *N Engl J Med* 1969;281:627-35.

64. Jevons M.P. 'Calbenin'-resistant staphylococci. *Brit Med J* . 1961, 1: 124–5.
65. Jog S, Cunningham R, Cooper S, Wallis M, Marchbank A, Vasco-Knight P, Jenks PJ. Impact of preoperative screening for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by real-time polymerase chain reaction in patients undergoing cardiac surgery. *J Hosp Infect*. 2008 Jun;69(2):124-30.
66. Kahl BC, Peters G. Microbiology. Mayhem in the lung. *Science*. 2007, 23; 315 (5815):1082-3.
67. Kearns AM, Seiders PR, Wheeler J, Freeman R, Steward M. Rapid detection of methicillin-resistant Staphylococci by multiplex PCR, *Journal of Hospital Infection* 1999; 43: 33–37.
68. Keynan Y, Rubinstein E. *Staphylococcus aureus* bacteremia, risk factors, complications, and management. *Crit Care Clin*. 2013 Jul;29(3):547-62.
69. Klevens RM, Morrison MA, Nadle J, Petit S, Gershman K, Ray S, Harrison LH, Lynfield R, Dumyati G, Townes JM, Craig AS, Zell ER, Fosheim GE, McDougal LK, Carey RB, Fridkin SK; Active Bacterial Core surveillance (ABCs) MRSA Investigators. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. *JAMA*. 2007 Oct 17;298(15):1763-71.
70. Kloss WE, Bannerman TL. *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In: Mahon CR, Manuselis Jr G. *Textbook of diagnostic microbiology*. New York; Saunders, 1995. p. 264-77.
71. Kobayashi SD, DeLeo FR. An update on community-associated MRSA virulence. *Curr Opin Pharmacol*. 2009; 9(5): 545-51.
72. Kondo Y, Ito T, Ma XX, Watanabe S, Kreiswirth BN, Etienne J, Hiramatsu K. Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome *mec* type assignment: rapid identification system for *mec*, *ccr*, and major differences in junkyard regions. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007 Jan;51(1):264-74.
73. Koreen L, Ramaswamy SV, Graviss EA, Naidich S, Musser JM, Kreiswirth BN. *spa* typing method for discriminating among *Staphylococcus aureus* isolates: implications for use of a single marker to detect genetic micro- and macrovariation. *J Clin Microbiol*. 2004 Feb;42(2):792-9.

- 74.Kuehnert MJ, Kruszon-Moran D, Hill HA, McQuillan G, McAllister SK, Fosheim G, McDougal LK, Chaitram J, Jensen B, Fridkin SK, Killgore G, Tenover FC. Prevalence of *Staphylococcus aureus* nasal colonization in the United States, 2001-2002. J Infect Dis. 2006 15;193(2):172-9.
- 75.Kwon NH, Park KT, Moon JS, Jung WK, Kim SH, Kim JM, Hong SK, Koo HC, Joo YS, Park YH. Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) characterization and molecular analysis for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and novel SCC*mec* subtype IVg isolated from bovine milk in Korea. J Antimicrob Chemother. 2005 Oct;56(4):624-32.
- 76.Lamaro-Cardoso J, et al.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. 2009; 47(12): 3991–7.
- 77.Laurent C, Bogaerts P, Schoevaerdt D, Denis O, Deplano A, Swine C, Struelens MJ, Glupczynski Y. Evaluation of the Xpert MRSA assay for rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from nares swabs of geriatric hospitalized patients and failure to detect a specific SCC*mec* type IV variant. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2010;Aug;29(8):995-1002.
- 78.Lee AS, Cooper BS, Malhotra-Kumar S, Chalfine A, Daikos GL, Fankhauser C, Carevic B, Lemmen S, Martínez JA, Masuet-Aumatell C, Pan A, Phillips G, Rubinovitch B, Goossens H, Brun-Buisson C, Harbarth S; MOSAR WP4 Study Group.Comparison of strategies to reduce methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* rates in surgical patients: a controlled multicentre intervention trial. BMJ Open. 2013 Sep 19;3(9) :e003126.
- 79.Linuma Y, Senda K, Fujihara N, Saito T, Takakura S, Kudo T, Kiuchi T, Tanaka K,Ichiyama S. Surgical site infection in living-donor liver transplant recipients: a prospective study.Transplantation. 2004, 78(5):704-9.
- 80.Li S, Skov RL, Han X, Larsen AR, Larsen J, Sørup M, Wulf M, Voss A, Hiramatsu K, Ito T.Novel types of staphylococcal cassette chromosome *mec* elements identified in clonal complex 398 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. Antimicrob Agents Chemother. 2011 Jun;55(6):3046-50.
- 81.Losada I, Cuervas-Mons V, Millan I, Damaso D. Early infection in liver transplant recipients: incidence, severity, risk factors and antibiotic sensitivity of bacterial isolates. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2002; (9):422-30.

- 82.Lowry FS. *Staphylococcus aureus* infections. N Engl J Med.1998; 339:520-32.
- 83.Lowy, FD. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. J Clin Invest. 2003 May;111(9):1265-73.
- 84.Marra AR, Camargo LF, Pignatari AC, Sukiennik T, Behar PR, Medeiros EA, Ribeiro J, Girão E, Correa L, Guerra C, Brites C, Pereira CA, Carneiro I, Reis M, de Souza MA, Tranches R, Barata CU, Edmond MB; Brazilian SCOPE Study Group. Nosocomial bloodstream infections in Brazilian hospitals: analysis of 2,563 cases from a prospective nationwide surveillance study. J Clin Microbiol. 2011 May;49(5):1866-71.
- 85.Martins A, Moraes Riboli DF, Cataneli Pereira V, de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha M. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from a Brazilian university hospital. Braz J Infect Dis. 2014 May-Jun;18(3):331-5.
- 86.Ma XX, Ito T, Chongtrakool P, Hiramatsu K. Predominance of clones carrying Panton-Valentine leukocidin genes among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated in Japanese hospitals from 1979 to 1985. J Clin Microbiol. 2006 Dec;44 (12):4515-27.
- 87.Ma XX, Ito T, Tiensasitorn C, Jamklang M, Chongtrakool P, Boyle-Vavra S, Daum RS, Hiramatsu K. Novel type of staphylococcal cassette chromosome *mec* identified in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. Antimicrob Agents Chemother. 2002 Apr;46(4):1147-52.
- 88.McDougal LK, Steward CD, Killgore GE, Chaitram JM, McAllister SK, Tenover FC.Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database. J Clin Microbiol. 2003 Nov;41(11):5113-20.
- 89.Mendes RE, Kiyota KA, et al. Rapid Detection and Identification of Metallo- β -Lactamase-Encoding Genes by Multiplex Real-Time PCR Assay and Melt Curve Analysis. J Clin Microbiol. 2007, 544–547.
- 90.Milheiro C, Oliveira DC, de Lencastre H. Multiplex PCR strategy for subtyping the staphylococcal cassette chromosome *mec* type IV in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: 'SCC*mec* IV multiplex'. J Antimicrob Chemother. 2007 Jul;60(1):42-8.

- 91.Mimica MJ, Berezin EN, Damaceno N, Carvalho RB. Molecular epidemiology of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children: comparison between cystic fibrosis and non-cystic fibrosis isolates. J Lab Physicians. 2012 Jan;4(1):66-7.
- 92.Mir N, Sanches M, et al. Soft Salt-Mannitol Agar-Cloxacillin Test: a Highly Specific Bedside Screening Test for Detection of Colonization with Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol.1998; 36: 986-9.
- 93.Moussa I, Shibl AM. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* recovered from outpatient clinics in Riyadh, Saudi Arabia. Saudi Med J. 2009; 30(5):611-7.
- 94.Mulligan ME, Murray-Leisure KA, Ribner BS, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a consensus review of the microbiology, pathogenesis, and epidemiology with implications for prevention and management. Am J Med 1993;94:313-28.
- 95.Mulvey MR, C hui L, Ismail J, Louie L, Murphy C, Chang N, Alfa M; Canadian Committee for the Standardization of Molecular Methods. Development of a Canadian standardized protocol for subtyping methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using pulsed-field gel electrophoresis. J Clin Microbiol. 2001; 39(10):3481-3485.
- 96.Murray,PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. Manual of clinical microbiology. 7 ed. Washington, USA: American Society for Microbiology, 1999. p325-37.
- 97.Nasia Safdar, MD, MS, Elisa A. Bradley, MD. The Risk of Infection after Nasal Colonization with *Staphylococcus Aureus*. The American Journal of Medicine. 2008; 121, 310-5.
- 98.O'Brien FG, Coombs GW, Pearman JW, Gracey M, Moss F, Christiansen KJ, Grubb WB. Population dynamics of methicillin-susceptible and -resistant *Staphylococcus aureus* in remote communities. J Antimicrob Chemother. 2009 Oct;64(4):684-93.
- 99.Okuma K, Iwakawa K, Turnidge JD, Grubb WB, Bell JM, O'Brien FG, Coombs GW, Pearman JW, Tenover FC, Kapi M, Tiensasitorn C, Ito T, Hiramatsu K. Dissemination of New Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Clones in the Community. J Clin Microbiol. 2002; 40: 4289-94.

- 100.Oliveira DC, de Lencastre, H. Multiplex PCR Strategy for Rapid Identification of Structural Types and Variants of the *mec* Element in Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002; 46: 2155-61.
- 101.Oliveira DC, Milheiriço C, de Lencastre H. Redefining a structural variant of staphylococcal cassette chromosome *mec*, SCC*mec* type VI. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006 Oct;50(10):3457-9.
- 102.Oliveira DC, Tomasz A, de Lencastre H. The evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: identification of two ancestral genetic backgrounds and the associated *mec* elements. *Microb Drug Resist.* 2001; 7(4): 349-361.
- 103.Oliveira GA. Caracterização de cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de diferentes regiões do Brasil baseada em métodos fenotípicos e genotípicos [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo; 1998.
- 104.Pacheco RL, Lobo RD, Oliveira MS, Farina EF, Santos CR, Costa SF, Padoveze MC, Garcia CP, Trindade PA, Quitério LM, Rivitti EA, Mamizuka EM, Levin AS. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) carriage in a dermatology unit. *Clinics.* 2011; 66(12):2071-207.
- 105.Palavecino E. Clinical, epidemiological, and laboratory aspects of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections. In: Ji Y, editor. *Methods in molecular biology: methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) protocols*. Totawa, NJ: Humana Press; 2007. p. 1-19.
- 106.Paterson DL, Rihs JD, Squier C, Gayowski T, Sagnimeni A, Singh N. Lack of efficacy of mupirocin in the prevention of infections with *Staphylococcus aureus* in liver transplant recipients and candidates. *Transplantation.* 2003 (2):194-8.
- 107.Perez LR, D'Azevedo PA. Clonal types and antimicrobial resistance profiles of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from hospitals in south Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2008; 50:135–7.
- 108.Pfaller, MA. Chromosomal restriction fragment analysis by pulsed-field gel electrophoresis. In: Isemberg HD, ed. *Clinical microbiology procedures handbook*. Washington: American Society for Microbiology, 1993.

109. Pires FV, da Cunha Mde L, Abraão LM, Martins PY, Camargo CH, Fortaleza CM. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* in Botucatu, Brazil: a population-based survey. PLoS One. 2014 Mar 24;9(3):e92537.
110. Pournaras S, Slavakis A, Polyzou A, Sofianou D, Maniatis AN, Tsakris A. Nosocomial spread of an unusual methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone that is sensitive to all non-beta-lactam antibiotics, including tobramycin. J Clin Microbiol. 2001;Feb;39(2):779-81.
111. Prevost G, Jaulhac B, Piemont Y. DNA fingerprinting by pulsed-field gel electrophoresis is more effective than ribotyping in distinguishing among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. J Clin Microbiol. 1992; Apr;30(4):967-73.
112. Rammelkamp CH, Maxon T. Resistance of *Staphylococcus aureus* to the action of penicillin. Proc Royal Soc Exper Biol Med. 1942;51:386-389.
113. Ricardo SB. Emergência de S. Aureus Meticilina-Resistente (MRSA) na Comunidade. Revista Prática Hospitalar. 2004;34:131-4.
114. Robotham JV, Graves N, Cookson BD, Barnett AG, Wilson JA, Edgeworth JD, Batra R, Cuthbertson BH, Cooper BS. Screening, isolation, and decolonisation strategies in the control of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in intensive care units: cost effectiveness evaluation. BMJ. 2011; 5;343:d5694.
115. Rocks A, Gerlach GF, Schwarz S. The implementation of the broth microdilution method to determine bacterial susceptibility to antimicrobial agents. Berl Munch Tierarztl Wochenschr. 2007 Jan-Feb;120(1-2):42-9.
116. Rodrigues MV, Fortaleza CM, Riboli DF, Rocha RS, Rocha C, da Cunha M de L. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a burn unit from Brazil. Burns. 2013 Sep;39(6):1242-9.
117. Rodriguez-Noriega E, Seas C. The changing pattern of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America: implications for clinical practice in the region. Braz J Infect Dis. 2010 Dec;14 Suppl 2:S87-96.
118. Romanelli RMC, Clemente WT, Lima SSS, Rezende EM, Martinho GH, Paiva LFR, Neves FAC, Madeira JGC, Amâncio GCS, Lima AS, Faria LC, Coutinho RL.

- MRSA outbreak at a transplantation unit. *Braz J Infect Dis.* 2010 Feb; 14(1): 54-59.
119. Rossney AS, Herra CM, Brennan GI, Morgan PM, O'Connell B. Evaluation of the Xpert methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) assay using the GeneXpert real-time PCR platform for rapid detection of MRSA from screening specimens. *J Clin Microbiol.* 2008 Oct;46(10):3285-90.
 120. Sader HS, Pignatari AC, Hollis RJ, Jones RN. Evaluation of interhospital spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Sao Paulo, Brazil, using pulsed-field gel electrophoresis of chromosomal DNA. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1994; 15; p.320–323.
 121. Salgado MM, Pignatari AC, Bellinati-Pires R. Phagocytosis and killing of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by human neutrophils and monocytes. *Braz J Infect Dis.* 2004 Feb;8(1):80-9.
 122. Santos HB, Machado DP, Camey SA, Kuchenbecker RS, Barth AL, Wagner MB. Prevalence and acquisition of MRSA amongst patients admitted to a tertiary-care hospital in Brazil. *BMC Infect Dis.* 2010 Nov 14;10:328.
 123. Schouls LM, Spalburg EC, van Luit M, Huijsdens XW, Pluister GN, van Santen-Verheuvél MG, van der Heide HG, Grundmann H, Heck ME, de Neeling AJ. Multiple-locus variable number tandem repeat analysis of *Staphylococcus aureus*: comparison with pulsed-field gel electrophoresis and *spa* typing. *PLoS One.* 2009; 4(4):e5082.
 124. Schweizer M, Perencevich E, McDanel J, Carson J, Formanek M, Hafner J, Braun B, Herwaldt L. Effectiveness of a bundled intervention of decolonization and prophylaxis to decrease Gram positive surgical site infections after cardiac or orthopedic surgery: systematic review and meta-analysis. *BMJ.* 2013 Jun 13;346:f2743.
 125. Shopsin B, Gomez M, Montgomery SO, Smith DH, Waddington M, Dodge DE, Bost DA, Riehman M, Naidich S, Kreiswirth BN. Evaluation of protein A Gene Polymorphic Region DNA Sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* Strains. *J Clin Microbiol.* 1999;37:3556-63.
 126. Shore AC, Deasy EC, Slickers P, Brennan G, O'Connell B, Monecke S, Ehrlich R, Coleman DC. 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. 2011 Aug;55(8): 3765-73.
127. Singh K, Gavin PJ, Vescio T, Thomson Jr RB Jr, Deddish RB, Fisher A, Noskin GA, Peterson LR. Microbiologic surveillance using nasal cultures alone is sufficient for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in neonates. J Clin Microbiol. 2003 Jun;41(6):2755-7.
 128. Soge OO, Meschke JS, No DB, Roberts MC. Characterization of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant coagulase-negative *Staphylococcus spp.* isolated from US West Coast public marine beaches. J Antimicrob Chemother. 2009 Dec;64(6):1148-55.
 129. Sousa-Junior FC, Silva-Carvalho MC, Fernandes MJ, Vieira MF, Pellegrino L, Figueiredo AM, de Melo MC, Milan EP. Genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates obtained in the Northeast region of Brazil. Braz J Med Biol Res. 2009 Oct;42(10):877-81.
 130. Souza MV, Barth AL, Alvares-da-Silva MR, Machado ARL. Infecções em pacientes transplantados hepáticos adultos no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil, no período de 1996-2000. Arq. Gastroenterol. [online]. 2007, 44(2): 128-132.
 131. Stapleton PD, Taylor PW. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: mechanisms and modulation. Sci Prog. 2002;85(Pt 1):57-72.
 132. Stefani S, Chung DR, Lindsay JA, Friedrich AW, Kearns AM, Westh H, Mackenzie FM. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): global epidemiology and harmonization of typing methods. Int J Antimicrob Agents. 2012 Apr;39(4):273-82.
 133. Stevens AM, Hennessy T, Baggett HC, Bruden D, Parks D, Klejka J. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* carriage and risk factors for skin infections, Southwestern Alaska, USA. Emerg Infect Dis. 2010 May;16(5):797-803.
 134. Struelens MJ, Deplano A, Godard C, Maes N, Serruys E. 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. 1992; Oct;30(10):2599-605.

- 135.Stone ND, Lewis DR, Johnson TM 2nd, Hartney T, Chandler D, Byrd-Sellers J, McGowan JE Jr, Tenover FC, Jernigan JA, Gaynes RP; Southeast Veterans Affairs Long-Term Care Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Cooperative. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) nasal carriage in residents of Veterans Affairs long-termcare facilities: role of antimicrobial exposure and MRSA acquisition. Infect Control Hosp Epidemiol. 2012; Jun;33(6):551-7.
- 136.Stürenburg E. Rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from clinical samples: methods, effectiveness and cost considerations. German Medical Science. 2009 Jul; 6;7:Doc 6.
- 137.Tacconelli E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: source control and surveillance organization. Clin Microbiol Infect. 2009 Dec;15 Suppl 7:31-8.
- 138.Teixeira LA, Lourenco MC, Figueiredo AM. Emergence of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone related to the Brazilian epidemic clone III:B:A causing invasive disease among AIDS patients in a Brazilian hospital. Microb Drug Resist. 1996 Winter;2(4):393-9.
- 139.Teixeira MM, Araújo MC, Silva-Carvalho MC, Beltrame CO, Oliveira CC, Figueiredo AM, Oliveira AG. Emergence of clonal complex 5 (CC5) methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates susceptible to trimethoprim-sulfamethoxazole in a Brazilian hospital. Braz J Med Biol Res. 2012 Jul;45(7):637-43.
- 140.Tenover, FC, Arbeit, RD, Goering, RV, Mickelsen PA, Murray, BE, Persing, DH, Swaminathan, B. Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. J Clin Microbiol. 1995; 33: 2233-9.
- 141.Trindade, PA. Caracterização molecular da resistência em isolados de *Staphylococcus aureus* hospitalares e comunitários [tese]. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. São Paulo; 2005. 37p.
- 142.Turlej A, Hryniewicz W, Empel J. Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*) Classification and Typing Methods: an Overview. Pol J Microbiol. 2011; 60(2): 95-103.
- 143.van Belkum A, van Leeuwen W, Kaufmann ME, Cookson B, Forey F, Etienne J, Goering R, Tenover F, Steward C, O'Brien F, Grubb W, Tassios P, Legakis N, Morvan A, El Solh N, de Ryck R, Struelens M, Salmenlinna S, Vuopio-Varkila

- J, Kooistra M, Talens A, Witte W, Verbrugh H. Assessment of resolution and intercenter reproducibility of results of genotyping *Staphylococcus aureus* by pulsed field electrophoresis of SmaI macrorestriction fragments: a multicenter study. *J Clin Microbiol*. 1998 Jun; 36(6):1653-9.
- 144.Velasco D, Tomas MM, Cartelle M , et al. Evaluation of different methods for detecting methicillin (oxacillin) resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother*. 2005 Mar; 55(3): 379-82.
- 145.Vidal PM, Trindade PA, Garcia TO, Pacheco RL, Costa SF, Reinert C, Hiramatsu K, Mamizuka EM, Garcia CP, Levin AS. 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*. 2009 Feb;30(2):139-45.
- 146.Vieira MA, Minamisava R, Pessoa-Júnior V, Lamaro-Cardoso J, Ternes YM, Andre MC, Sgambatti S, Kipnis A, Andrade AL. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nasal carriage in neonates and children attending a pediatric outpatient clinics in Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2014 Jan-Feb;18(1):42-7.
- 147.von Eiff C, Friedrich AW, Peters G, Becker K. Prevalence of genes encoding for members of the staphylococcal leukotoxin family among clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2004 Jul;49(3):157-62.
- 148.Weller TM. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* typing methods: wich should be the international standard? *J Hosp Infect*. 2000 Mar; 44(3):160-72.
- 149.Wiegand I, Hilpert K, Hancock RE. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*. 2008;3(2):163-75.
- 150.Wolk DM, Marx JL, Dominguez L, Driscoll D, Schiffman RB. Comparison of MRSAselect Agar, CHROMagar Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Medium, and Xpert MRSA PCR for detection of MRSA in Nares: diagnostic accuracy for surveillance samples with various bacterial densities. *J Clin Microbiol*. 2009 Dec;47(12):3933-6.
- 151.Zetola N, Francis JS, Nuernberger EL, Bishai WR. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging threat. *Lancet Infect. Dis*. 2005; 5:275-86.

152. Zhang K, McClure J, Elsayed S, Louie T, Conly JM. 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. 2005, 43 (10), 5026–33.
153. Zhang K, McClure JA, Elsayed S, Conly JM. Novel staphylococcal cassette chromosome *mec* type, tentatively designated type VIII, harboring class A *mec* and type 4 *ccr* gene complexes in a Canadian epidemic strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 2009 Feb;53(2):531-40.
154. Ziakas PD, Pliakos EE, Zervou FN, Knoll BM, Rice LB, Mylonakis E. MRSA and VRE Colonization in Solid Organ Transplantation: A Meta-Analysis of Published Studies. Am J Transplant. 2014 Aug;14(8):1887-94.