INNEKE MARIE VAN DER HEIJDEN

**"Caracterização molecular de isolados de *Staphylococcus aureus*
resistentes à meticilina (MRSA) obtidos de colonização e infecção de
pacientes hepatopatas e transplantados hepáticos"**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias
Orientadora: Profa. Dra. Silvia Figueiredo Costa

São Paulo

2014

INNEKE MARIE VAN DER HEIJDEN

**"Caracterização molecular de isolados de *Staphylococcus aureus*
resistentes à meticilina (MRSA) obtidos de colonização e infecção de
pacientes hepatopatas e transplantados hepáticos"**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor 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

Van der Heijden, Inneke Marie

Caracterização molecular de isolados de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina (MRSA) obtidos de colonização e infecção de pacientes hepatopatas e transplantados hepáticos / Inneke Marie van der Heijden. -- São Paulo, 2014.

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

Orientadora: Sílvia Figueiredo Costa.

Descritores: 1.*Staphylococcus aureus* resistente à metilina 2.Transplante de fígado 3.Virulência 4.Farmacoresistência bacteriana 5.Tipagem molecular 6.Análise de microarranjos 7.Portador

USP/FM/DBD-281/14

Ao meu marido Alexandre e à minha filha Anna Laura,
pelo amor, carinho, companheirismo, apoio e paciência
em mais uma etapa das nossas vidas.

Ao meu pai Marinus e minha mãe Ana Elisabeth, pelos
ensinamentos, exemplos e oportunidades oferecidas
para a minha formação e por todo amor e carinho.

Agradecimentos

À Profa. Dra. Silvia Figueiredo Costa pelo apoio, incentivo, amizade e orientação na realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Anna Sara S. Levin, pelo apoio, incentivo, colaboração para realização deste estudo e amizade.

Ao Prof. Dr. Edson Abdala e à Dra. Maristela Pinheiro Freire, pelo apoio, incentivo, colaboração para realização deste estudo e amizade.

À amiga Larissa Marques de Oliveira pelo apoio e colaboração constante na realização de todas as etapas deste projeto, pelo carinho e amizade.

Aos amigos Prof. Dr. Mauro Cintra Giudice e Profa. Dra. Sania Alves dos Santos, pelo apoio, incentivo e amizade.

À amiga Andréia Aparecida Alcaia pelo apoio, incentivo e amizade.

Às amigas Profa. Dra. Registila L. Beltrame, Profa. Dra. Katya C. Rocha e Profa. Dra. Viviana G. Arruk da Faculdade de Medicina do ABC, pelo apoio, incentivo e amizade.

Aos amigos Thais B. Runza e Leandro Bissoli da Faculdade de Medicina do ABC, pelo apoio, incentivo e amizade.

Às amigas Roseli e Vânia, do Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da FMUSP, pela amizade, apoio e colaboração na realização deste trabalho.

A todos do Laboratório de Investigação Médica (LIM-54) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelo apoio e colaboração na realização deste projeto.

Ao Grupo de Infecção Hospitalar do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em especial à Dra. Maura S. de Oliveira, Dr. Lauro V. Perdigão Neto e Sueli Ferreira, pela amizade e apoio.

À Subcomissão de Infecção Hospitalar do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em especial à Isabel Cristina Vilela S. Oshiro e Cleide Roque dos Santos, pelo apoio, colaboração na execução do projeto e amizade.

À equipe do Ambulatório da Unidade de transplante de Fígado do Instituto Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em especial à enfermeira Adriana, pela colaboração na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Glauber Brito e ao Prof. Dr. Carlos Henrique Camargo, pela colaboração na análise dos resultados.

Ao Prof. Dr. John Anthony McCulloch, Professor Adjunto de Microbiologia da Universidade Federal do Pará, pelo apoio e colaboração na realização das análises de sequenciamento genômico.

À Profa. Dra. Flávia Rossi, pela colaboração na realização do projeto.

À equipe do Departamento de Microbiologia do Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo pela colaboração técnica na realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

Em especial, a toda minha família, pelo incentivo, apoio e carinho.

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

Lista de tabelas

Lista de siglas

Resumo

Abstract

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Epidemiologia	2
1.2 Resistência	9
1.3. Virulência	12
1.4 Prevenção.....	15
1.5 Justificativa	16
2 OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo principal	18
2.2 Objetivos secundários.....	18
3 CASUÍSTICA E MÉTODOS	19
3.1 Período e local do Estudo.....	20
3.2 Pacientes	20
3.3 Métodos fenotípicos.....	23
3.3.1 Cultura microbiológica.....	23
3.3.2 Pesquisa de <i>S. aureus</i> oxacilina resistente	24
3.3.3 Detecção do gene <i>erm</i>	24
3.3.4 Testes de sensibilidade aos antimicrobianos	24
3.4 Métodos genotípicos.....	25
3.4.1 Detecção por PCR do gene 16S RNAr	25
3.4.2 Detecção por PCR dos genes <i>coA</i> e <i>mecA</i>	26
3.4.3 Determinação do tipo de cassete cromossômico (SCC <i>mec</i>)	27
3.4.4 Detecção por PCR qualitativo de genes de virulência.....	28
3.4.5 PFGE	29
3.4.6 Detecção por técnica de microarranjo de genes de virulência e resistência	30

3.4.6.1 Extração e integridade do RNA bacteriano	30
3.4.6.2 Síntese, purificação e quantificação de cDNA.....	31
3.4.6.3 Fragmentação e hibridização do cDNA	31
3.4.6.4 Análise dos Resultados	32
3.4.7 Detecção de gene <i>tst</i> por PCR quantitativo (PCRq).....	33
3.4.8 Sequenciamento do genoma bacteriano	34
4 RESULTADOS	36
4.1 Pacientes	37
4.2 Colonização por MRSA.....	40
4.3 Infecção de sítio cirúrgico (ISC).....	49
4.4 Estudo dos isolados de MRSA	51
5 DISCUSSÃO	75
6 CONCLUSÕES	91
7 ANEXOS	94
8 REFERÊNCIAS	108

Lista de figuras

Figura 1 - Número total de <i>swabs</i> coletados de pacientes hepatopatas e transplantados hepáticos submetidos à cultura microbiológica e detecção direta por PCR de DNA bacteriano no Hospital das Clínicas - FMUSP, no período do estudo de 2010 a 2012.	41
Figura 2 – Foto de PCR de amostra clínica do gene 16S RNAr.....	44
Figura 3 – Foto de PCR para detecção dos genes <i>coA</i> (117bp) e <i>mecA</i> (214bp)	46
Figura 4 – Distribuição dos tipos de <i>SCCmec</i> dos 69 isolados de MRSA obtidos de pacientes hepatopatas e transplantados hepáticos, acompanhados no Hospital das Clínicas da FMUSP, no período do estudo, 2010 a 2012.....	53
Figura 5 – Foto da PCR <i>multiplex</i> para determinação do tipo de <i>SCCmec</i> em amostras de MRSA isolados na em pacientes de lista e transplantados hepáticos.....	54
Figura 6 – Foto da PCR para detecção dos genes de virulência (<i>Panton-Valentine</i> Leucocidina – PVL; Toxina da Síndrome do Choque Tóxico – TSST; Leucocidinas D e E).....	57
Figura 7 – Foto da PCR para detecção dos genes de virulência (genes <i>clf</i> , <i>fib</i> , <i>fnbA</i> , <i>eta</i> e <i>etb</i>).....	57
Figura 8 – Foto de PFGE da representação do perfil molecular predominante (perfil A) dos isolados de MRSA.....	58
Figura 9 - Dendrograma criado a partir dos diferentes perfis eletroforéticos gerados por PFGE de 69 isolados de MRSA (coeficiente de similaridade de Dice, otimização de 0,5%, tolerância de 1,5%; método de <i>clusterização</i> : UPGMA)	59
Figura 10 - Agrupamento hierárquico (<i>hierarchical clustering</i>) realizado utilizando uma seleção não-supervisionada de cem genes com elevada variabilidade gênica definida em ensaios de microarranjo	63

Lista de tabelas

Tabela 1 - Iniciadores empregados na reação de PCR multiplex para detecção de genes <i>coA</i> e <i>mecA</i> para triagem de isolados MRSA.....	27
Tabela 2 - Sequencia dos iniciadores utilizados para PCR <i>multiplex</i> para determinação dos tipos de SCC <i>mec</i>	27
Tabela 3 - Oligonucleotídeos utilizados nas reações de amplificação <i>multiplex</i> para detecção de genes de virulência de isolados de MRSA (Baba-Moussa et al., 2008).....	28
Tabela 4 - Características clínicas e demográficas de 190 pacientes hepatopatas e transplantados hepáticos submetidos à pesquisa de portadores de <i>S. aureus</i> resistente à oxacilina, atendidos na unidade de Fígado do HC-FMUSP.....	38
Tabela 5 - Dados coletados dos 64 pacientes submetidos a transplante hepático no Hospital das Clínicas da FMUSP, no período de 2010 a 2012	39
Tabela 6 - Dados dos 6 isolados clínicos de MRSA obtidos de 5 pacientes transplantados hepáticos com infecção clínica identificados no período no Hospital das Clínicas no período do estudo de 2010 a 2012	40
Tabela 7 - Resultados das culturas bacteriológicas obtidas dos 190 de pacientes hepatopatas e transplantados hepáticos avaliados no Hospital das Clínicas da FMUSP no período do estudo de 2010 a 2012	42
Tabela 8 - Número de coletas e positividade das culturas de amostras nasais e inguinais de pacientes submetidos a transplante de fígado no Hospital das Clínicas durante o período de 2010 a 2012	43
Tabela 9 - Comparação entre os resultados das culturas dos <i>swabs</i> nasais e amplificações dos genes 16S RNAr, <i>coA</i> e <i>mecA</i> dos 126 pacientes de lista de espera do transplante hepático avaliados no Hospital das Clínicas no período do estudo, 2010 a 2012	45

Tabela 10 - Comparação entre os resultados das culturas dos <i>swabs</i> nasais e ampliações dos genes 16S RNAr, <i>coA</i> e <i>mecA</i> dos 64 pacientes transplantados hepáticos avaliados no Hospital das Clínicas, no período do estudo, 2010 a 2012.....	47
Tabela 11 - Distribuição dos tipos de <i>SCCmec</i> caracterizados diretamente em <i>swabs</i> nasais e inguinais coletados de 190 pacientes (126 hepatopatas e 64 transplantados hepáticos) avaliados no Hospital da Clínicas-FMUSP, no período do estudo, 2010 a 2012.....	49
Tabela 12 – Principais agentes infecciosos isolados de infecção de SCOE de 12 pacientes transplantados hepáticos internados no Hospital das Clínicas FMUSP, no período do estudo, 2010 a 2012	51
Tabela 13 - Atividade antimicrobiana de 69 isolados MRSA de pacientes hepatopatas e transplantados hepáticos acompanhados no Hospital das Clínicas da FMUSP, no período do estudo, 2010 a 2012	52
Tabela 14 - Perfil de susceptibilidade e dos 5 isolados clínicos MRSA (de diferentes tipos de <i>SCCmec</i> e perfis moleculares) de pacientes transplantados hepáticos com infecção clínica acompanhados no Hospital das Clínicas da FMUSP, no período do estudo, 2010 a 2012	55
Tabela 15 - Distribuição de diferentes genes (estruturais, resistência e virulência), tipos de <i>SCCmec</i> para os 69 isolados de MRSA	56
Tabela 16 - Análise molecular (tipagem do <i>SCCmec</i> e PFGE) de 3 pacientes com isolados de colonização e infecção clínica acompanhados no Hospital das Clínicas da FMUSP, no período do estudo, 2010 a 2012	61
Tabela 17 - Lista dos genes de virulência e resistência detectados pela técnica de microarranjo em 21 isolados de MRSA obtidos de pacientes acompanhados no Hospital das Clínicas da FMUSP, no período de 2010 a 2012	64
Tabela 18 - Resultados fenotípicos e genotípicos de 21 isolados de MRSA avaliados pela técnica de microarranjo acompanhados no Hospital das Clínicas da FMUSP, no período do estudo, 2010 a 2012	67

Tabela 19 - Métricas referentes às montagens geradas pelos <i>softwares</i> Mira e CLC, independentemente, e pela mesclagem das duas montagens do genoma bacteriano sequenciado pelo <i>Ion Torrent PGM™</i>	70
Tabela 20 - Genes de virulência detectados por sequenciamento em isolado de MRSA utilizando servidor <i>VirulenceFinder</i> 1.2	71
Tabela 21 - Genes de virulência detectados por sequenciamento de última geração em isolado de MRSA utilizando <i>ResFinder</i> 2.0	73

Lista de siglas

BEC – *Brazilian Endemic Clone* (Clone endêmico brasileiro)

BECC - *Brazilian Endemic Clonal Complex*

CIM – Concentração inibitória mínima

DNA – Ácido desoxirribonucleico

IC - Intervalo de Confiança

MELD - *Model for End-stage Liver Disease*

MLST - *Multi Locus Sequencing Typing*

MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PCRq – Reação em cadeia da polimerase quantitativa

PFGE – Eletroforese em campo pulsado

PÓS-TX – pós-transplante

PRÉ-TX – pré-transplante

PVL – *Panton-Valentine* Leucocidina

RNAr – Ácido ribonucleico ribossomal

SCCmec – *staphylococcal cassette chromosome mec*

UTI - Unidade de Terapia Intensiva

Resumo

Van der Heijden, IM. *Caracterização molecular de isolados de Staphylococcus aureus resistentes à meticilina (MRSA) obtidos de colonização e infecção de pacientes hepatopatas e transplantados hepáticos*. [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

MRSA é um importante agente de colonização e infecção em pacientes hepatopatas e transplantados de fígado. Este estudo tem como objetivo avaliar a clonalidade e a virulência de isolados MRSA de pacientes hepatopatas atendidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. De agosto de 2010 a janeiro de 2012, foram coletados swabs nasais e inguinais de 190 pacientes (126 pré-transplante e 64 de pós-transplante). Isolados de MRSA foram identificados fenotipicamente e foi realizada detecção de genes de virulência, caracterização do tipo de *SCCmec*, análise de polimorfismo genômico por PFGE e técnica de microarranjo. Além disso, determinou-se a CIM para dez antimicrobianos pelo método de microdiluição em caldo. MRSA foi detectado em 20% dos pacientes pelo método de cultura e em 82% por PCRs. Apenas três pacientes colonizados desenvolveram infecção após o transplante. Entre os 69 isolados de MRSA, 42,0% (29/69) apresentaram *SCCmec* tipo II, 20,3% (14/69) *SCCmec* tipo I, 20,3% (14/69) *SCCmec* tipo III, 13,0% (9/69) *SCCmec* tipo IVa, 2,9% (2/69) *SCCmec* tipo IV e 1,5% (1/69) *SCCmec* tipo V. O gene *tst* foi detectado em 5,8% (4/69) dos isolados MRSA e todos eles foram definidos como *SCCmec* tipo I. Outros genes identificados por PCR foram: *lukD* (89,9%; 62/69), *lukE* (89,9%; 62/69), *clf* (91,3%; 63/69) e *fnbA* (89,9%; 62/69). A análise por PFGE dos 69 isolados mostrou a presença de um clone predominante chamado *cluster A* em 36,2% (25/69) e este *cluster* apresentou 84,6% de similaridade com o clone *NewYork/Japan* (BK2464). O dendrograma demonstrou também a presença de um *cluster* relacionado com BEC (Clone Endêmico Brasileiro) HSJ216. Atualmente o tipo de *SCCmec* mais prevalente em nosso hospital é o tipo II. Neste estudo, observou-se a presença de isolados virulentos tanto em pacientes hepatopatas como em pacientes transplantados. Nossos resultados mostraram que o clone predominante (*cluster A*) apresentou diferentes genes de virulência (genes *fnbA*, *clf* e *lukD-lukE*) e foi resistente a pelo menos seis diferentes drogas, além de ser caracterizado como HA-MRSA *SCCmec* tipo II. Em conclusão, a técnica de microarranjo permite a genotipagem e detecção de genes estafilocócicos clinicamente relevantes, e pode, na maioria dos casos, ser utilizada como uma importante ferramenta para a triagem da virulência e resistência a antimicrobianos em isolados de MRSA.

Descritores: 1. *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina 2. Transplante de fígado 3. Virulência 4. Farmacorresistência bacteriana 5. Tipagem molecular 6. Análise de microarranjos 7. Portador

Abstract

Van der Heijden, IM. *Molecular characterization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) isolates obtained from colonized and infected patients with liver diseases and liver transplanted*. [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

MRSA is an important agent of colonization and infection in patients with liver disease and liver transplant. This study aims to evaluate clonality and virulence of MRSA isolates from liver diseases patients treated at Hospital of Clinics Faculty of Medicine from University of Sao Paulo. From August 2010 to January 2012, we collected nasal and groin swabs from 190 patients (126 pre-liver and 64 post-liver). MRSA isolates were identified phenotypically and the detection of virulence genes, characterization of SCCmec type, microarray and genomic polymorphism analysis by PFGE were done. In addition, it was determined the MIC for ten antibiotics by broth microdilution method. MRSA was detected in 20% patients by culture method and 82% by PCR. Only three patients colonized developed infection post-transplantation. Among the 69 MRSA isolates, 42.0% (29/69) had type II SCCmec, 20.3% (14/69) SCCmec type I, 20.3% (14/69) SCCmec type III, 13.0% (9/69) SCCmec type IVa, 2.9% (2/69) SCCmec type IV and 1.5% (1/69) SCCmec type V. The *tst* gene was detected in 5.8% (4/69) of MRSA isolates and all of them were defined as SCCmec type I. Other genes were identified by PCR: *lukD* (89.9%; 62/69), *lukE* (89.9%; 62/69), *clf* (91.3%; 63/69) and *fnbA* (89.9%; 62/69). The PFGE analysis of 69 isolates showed the presence of a predominant cluster named cluster A in 36.2% (25/69) and this cluster had 84.6% similarity with New York/Japan clone (BK2464). Dendrogram also demonstrated presence of one cluster related with BEC (*Brazilian Endemic Clone*) HSJ216. Currently the most prevalent SCCmec type in our hospital is type II. In this study, we observed virulent isolates in pre and post-transplantation patients. Our results showed that the predominant clone (cluster A) had different virulence genes (genes *fnbA*, *clf* and *lukD-lukE*) and was resistant to at least six different drugs, in addition to being characterized as HA-MRSA SCCmec type II. In conclusion, microarray profiling allows genotyping and detection of clinically relevant staphylococcal genes, and can, in most cases, be used as an important tool to screening virulence and antibiotic resistance genes in MRSA isolates.

Descriptors: 1.Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* 2.Liver transplantation 3.Virulence 4 Drug resistance, bacterial 5.Molecular typing 6.Microarrays analysis 7.Carrier state

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia

O número de transplantes de órgãos sólidos vem aumentando na última década. Segundo dados americanos foram realizados 20.392 transplantes de órgãos sólidos de doador cadáver em 2003 e aproximadamente 94.000 pacientes aguardam para serem transplantados (*Health Resources and Services Administration - HRSA*, 2006). No Brasil, de um total de 6.839 transplantes de órgãos sólidos realizados no ano de 2011, 4.957 (72%) foram transplantes renais e 1.492 (22%) transplantes hepáticos, segundo dados da Associação Brasileira de Transplante de Órgãos (ABTO, 2011). Em 2012, foram realizados no Brasil 7.426 transplantes de órgãos sólidos sendo 1.595 (21,5%) transplantados hepáticos. Em 2013, dados da ABTO registraram que do total de 2.778 transplantes de órgãos sólidos realizados no Estado de São Paulo, 648 (23.3%) foram transplantes de fígado.

Para a seleção do candidato que irá receber o transplante de fígado é importante considerar vários aspectos como o risco do paciente que será submetido a um procedimento cirúrgico de grande porte e a condição crônica de imunossupressão após a realização do transplante (Fink e Brown Jr, 2005). O melhor momento para a indicação do transplante é difícil de ser definido, pois se deve evitar tanto o dano de uma intervenção precoce como a realização de um transplante tardio com o paciente em situação terminal. De acordo com Marroni et al (2010), é importante lembrar que a história natural da doença deve ser comparada com a expectativa de sobrevida do paciente após o procedimento cirúrgico.

O MELD (*Model for End-stage Liver Disease*) é um modelo matemático que utiliza os resultados de três exames laboratoriais facilmente acessíveis: RNI (Relação Normalizada Internacional) do tempo de protrombina, bilirrubina total e creatinina sérica (Kamath et al., 2007). Este modelo matemático foi escolhido para ordenar os pacientes em lista de espera, pois utiliza critérios

objetivos como bom preditor de sobrevida de pacientes hepatopatas (Kamath et al., 2001; Luca et al., 2007; Brandão et al., 2008).

Um estudo norte-americano avaliou a pontuação mínima do escore MELD para se considerar a inclusão em lista de espera e o transplante hepático em si. A conclusão foi a de que pacientes com MELD < 14 não apresentam benefícios com o transplante em comparação com a permanência em lista de espera. Desta forma, de acordo com trabalho publicado por Perkins et al. (2009), a sugestão é que os pacientes sejam listados a partir do MELD 15. No HC-FMUSP, o paciente adulto só recebe o transplante se tiver um MELD alto, acima de 30. Para crianças, o MELD é multiplicado por 3 pois estes pacientes são considerados prioridade na lista espera por um transplante.

Outra forma de definir a gravidade do paciente cirrótico é a classificação clínica pelo sistema de escore de *Child-Pugh* modificado, o qual se trata de um sistema de estadiamento com escore de 5 a 15. Este sistema de pontuação foi desenvolvido inicialmente para estratificar pacientes em grupos de risco antes de serem submetidos à cirurgia. Atualmente, no Brasil, este critério é utilizado para avaliar o prognóstico da cirrose e caracterizar os critérios mínimos para inclusão de pacientes em lista de espera para o transplante hepático (Brandão e Marroni, 2010).

Infecções bacterianas são importante causa de morbidade e mortalidade no primeiro mês após o transplante de órgãos sólidos. Vários fatores estão associados com o desenvolvimento das infecções bacterianas nos pacientes submetidos a transplante de órgãos, como complicações do ato cirúrgico, uso de procedimentos invasivos e infecções originadas do próprio enxerto.

Estudo de 149 pacientes transplantados hepáticos considerou infecção precoce aquelas identificadas até 90 dias do transplante. A incidência de infecção neste estudo foi de 73%, sendo infecção bacteriana a mais frequente (49%) seguida de infecção viral (35%) e infecção fúngica (10%). Infecções bacterianas foram mais frequentes no primeiro mês após transplante. Os fatores de riscos associados com infecção na análise multivariada foram: dias de uso de nutrição parenteral, duração da cirurgia maior que cinco horas, rejeição e “status” soronegativo para citomegalovírus. Bactérias Gram-positivas foram os agentes mais frequentes, sendo responsáveis por 77% das infecções,

e 68% dessas infecções foram causadas por *S. aureus* oxacilina resistente (Losada et al., 2002).

Em 2010, Bert et al. publicaram um estudo com 704 pacientes submetidos a transplante de fígado num período de 10 anos (1997 a 2007). As infecções de corrente sanguínea (ICS), no primeiro ano após a realização do transplante, ocorreram em 205 pacientes (29,1%). De um total de 259 episódios de ICS documentados, 39,4% ocorreram nos primeiros 10 dias de internação pós-cirúrgica. Dentre os patógenos isolados, *S. aureus* foi encontrado em 56 (19,8%) dos episódios de ICS, sendo 28 (9,9%) MRSA.

Em um estudo com seguimento de 130 pacientes transplantados hepáticos os autores definiram infecção precoce como aquela desenvolvida até 100 dias após o transplante. Trinta e cinco por cento dos pacientes desenvolveram 67 episódios de infecção bacteriana, 0,52 episódios por paciente. Trombose da veia porta foi o único fator de risco independente para infecção bacteriana precoce (OR 4,1; IC 95% 1,4-12,2) e recorrência de hepatite C fator para infecção bacteriana tardia (OR 6,21; IC 95% 1,9-20,2) (Singh et al., 1997a).

Outro estudo de 133 pacientes transplantados hepáticos mostrou que 37% desenvolveram infecção de sítio cirúrgico, com 51% com bacteremia secundária. *S. aureus* isoladamente foi o agente mais frequente seguido por enterobactérias e *P. aeruginosa*. Os fatores de risco independentes associados com infecção de sítio cirúrgico com bacteremia secundária foram incompatibilidade ABO (OR 14,0; IC 95% 2,52-77,2) e repetir a cirurgia (OR 9,29; IC 95% 2,0-43,0) (Linuma et al., 2004).

S. aureus é um importante agente de infecções de corrente sanguínea, sítio cirúrgico e pneumonia em pacientes transplantados hepáticos. Um estudo comparou a incidência de infecção por *S. aureus* resistente a oxacilina em pacientes transplantados renais e hepáticos. A incidência foi maior nos transplantados hepáticos: 3,7% (12/320), quando comparado com os transplantados renais 0,8% (12/1450) ($p < 0,001$). Os sítios de infecção mais frequentes foram sangue (42%), pulmão (38%), e abdome (29%) (Schneider et al., 2005). Complicações no pós-transplante ($p < 0,001$) foram mais frequentes

no grupo com infecção por *S. aureus* resistente à oxacilina, entretanto a mortalidade foi igual nos dois grupos.

Estudo retrospectivo realizado por Takatsuki et al. (2010) evidenciou que de um total de 70 pacientes avaliados, 9 (12,9%) apresentaram infecção por MRSA após transplante de fígado, com mortalidade de 44,4%. As principais infecções observadas nesta casuística foram peritonite (66%), bacteremia (66%), pneumonia (33%), infecção de sítio cirúrgico (33%) e colangite (11%).

Estudo realizado em três centros europeus avaliou 405 transplantados hepáticos e demonstrou taxa de infecção de corrente sanguínea (ICS) de 29,8 episódios por 100 transplantes. A fonte mais frequente da ICS foi abdome (33,6%), seguido por cateter venoso central (22,7%). Os micro-organismos Gram-positivos (70%) predominaram nas ICS precoces ($p=0,04$), sendo *S. aureus* o agente mais frequente. A taxa de mortalidade geral (em 30 dias) evidenciada neste estudo foi de 21%. Infecção de corrente sanguínea foi o único fator de risco independente associado com óbito (OR 3.13, IC 95% 1,3-7,5; $p=0,01$) (Torre-Cisneros et al., 2002).

Singh et al. (1997a) evidenciaram a emergência de infecções por MRSA em pacientes transplantados hepáticos, onde 23% (38/165) desenvolveram infecção por este micro-organismo, caracterizando um aumento da porcentagem de pacientes infectados durante o período do estudo ($p=0,001$), principalmente em pacientes internados em UTIs. As principais fontes de infecção foram cateter vascular (39%), ferida cirúrgica (18%), abdome (18%) e pulmão (13%).

Outro estudo, publicado por Romanelli et al. (2010), avaliou um surto hospitalar infecção de sítio cirúrgico (ISC) por MRSA em 11 pacientes atendidos em uma unidade de transplante de fígado de um hospital terciário, no estado de Minas Gerais (Brasil), no período de setembro de 2004 a maio de 2005. Os 11 isolados MRSA estudados por estes autores não foram avaliados quanto ao tipo de SCCmec mas apresentaram 8 perfis distintos quando caracterizados molecularmente por técnica de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). Neste estudo foi evidenciado que as culturas de vigilância (swabs nasais e retais) dos pacientes e de profissionais da saúde não apresentaram positividade para MRSA.

A transmissão de *S. aureus* resistente a oxacilina através do enxerto já foi descrita na literatura. A transmissão de infecção por MRSA identificada pela tipagem molecular ocorreu no Canadá nos receptores de órgão sólidos dentre eles um receptor do fígado de um doador cadáver (Johnston et al. 1999). Obed et al. (2006) descreveram um caso de transmissão através do enxerto em receptor de transplante hepático intervivo. O receptor evoluiu com quadro fatal de sepse e pneumonia no nono dia após o transplante de fígado, a mesma cepa de *S. aureus* foi identificada por tipagem molecular no doador.

Alguns estudos mostraram que frequentemente o paciente cirrótico é portador nasal de *S. aureus* (Chapoutot et al., 1999). A prevalência de colonização nasal por *S. aureus* em 66 pacientes transplantados hepáticos foi de 18% (Woeste et al., 2005). O "score de MELD" foi maior nos pacientes colonizados, entretanto a incidência da infecção por *S. aureus* foi igual quando comparados pacientes colonizados com não colonizados.

Um estudo demonstrou que 46% de 84 pacientes cirróticos eram portadores nasais de *S. aureus*, sendo 29% desses resistentes a oxacilina. "score de Child" elevado (OR: 1,54; IC 95% 1,1-2,3) foi fator de risco para colonização por *S. aureus* (Chang et al. 1998). Pacientes cirróticos portadores nasais de *S. aureus* desenvolveram mais frequentemente infecções por *S. aureus* do que os pacientes não portadores ($p=0,02$). Defeitos específicos associados com função do granulócito, como diminuição da quimiotaxia, e da atividade oxidativa da fagocitose estão presentes em pacientes com doença hepática avançada (Bailey et al., 1976).

Os mecanismos envolvidos na colonização nasal são considerados multifatoriais. Um estudo realizado por Nouwen et al. (2004), no qual os voluntários (não portadores e portadores crônicos) foram inoculados com uma mistura de cepas de *S. aureus*, evidenciou que indivíduos não portadores rapidamente eliminaram as cepas inoculadas, enquanto os indivíduos portadores crônicos selecionaram suas cepas originais da mistura inoculada. Assim, os pesquisadores concluíram que as características do hospedeiro são fatores determinantes para o estado de portador nasal e a relação entre micro-organismo e hospedeiro são essenciais para determinar a persistência desta colonização.

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

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.

Detectar precocemente a presença de portadores nasais de MRSA pode ter impacto no controle e prevenção de infecções hospitalares por este agente 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; IC 95% 6,2-70,1; $p < 0,001$) e *S. aureus* sensível a oxacilina (OR 3,4; IC 95% 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; $p = 0,01$). Neste estudo, de um total de 15 pacientes, a tipagem molecular por eletroforese em campo pulsado (PFGE - *Pulsed Field Gel Electrophoresis*) mostrou que 86.7% dos isolados obtidos a partir do sítio infectado foram idênticos ou fortemente relacionados ao isolado de origem nasal (Bert et al., 2005).

Prevenção e controle de infecção por MRSA pode ser feito por meio de medidas simples como isolamento de contato, coorte de pacientes infectados e/ou colonizados e também com a descolonização de pacientes e profissionais de saúde com aplicação nasal de mupirocina, tratamento com antibiótico e banho com antisséptico. Essas medidas já foram bastante utilizadas no

controle de surtos hospitalares de *S. aureus* resistente a oxacilina. O impacto dessas medidas na redução das taxas de infecção por *S. aureus* resistente a oxacilina na população de pacientes transplantados hepáticos, entretanto, ainda é controverso (Jerigan et al., 1996; Karchmer et al., 2002, Parras et al., 1995; Patel et al., 2001; Pujol et al., 1996; Panterson et al., 2003; Singh et al., 2006).

Cultura de *swab* nasal realizada em 70 pacientes transplantados hepáticos demonstrou que 44% dos pacientes eram portadores nasais de *S. aureus* resistente a oxacilina. Mupirocina nasal por cinco dias e cultura de vigilância cinco dias após o término do tratamento foi realizada em todos os pacientes portadores nasais de *S. aureus*. Oitenta e sete por cento foram descolonizados, desses 37% recolonizaram. Nenhuma cepa desenvolveu resistência a mupirocina. Apesar do uso da mupirocina, 23% pacientes desenvolveram infecção por MRSA (Paterson et al., 2003). Mostrando assim que esta medida se usada isoladamente pode não ser efetiva no controle de infecções por MRSA. Geralmente é necessária a implantação de pacotes de medidas.

Outro estudo que implantou um pacote de medidas evidenciou redução significativa da taxa de infecção por *S. aureus*. Neste estudo, um total de 47 pacientes transplantados hepáticos foi comparado com 97 controles históricos após a implementação de medidas de intervenção que incluíram cultura de vigilância nasal e retal, coorte e isolamento de contato de pacientes colonizados e ou infectados por *S. aureus* resistente a oxacilina e descolonização com o uso nasal de mupirocina. A taxa de colonização nasal diminuiu de 45,6% para 9,9% ($p<0,001$), de infecção de 40,4% para 4,1 ($p<0,001$) e da infecção de corrente sanguínea de 25,5% para 4,1% ($p<0,001$) (Singh et al., 2006).

1.2 Resistência

A resistência de *S. aureus* à oxacilina é causada pela alteração do sítio de ação da droga decorrente da expressão da proteína ligadora de penicilina PPB2a codificada pelo gene *mecA*. O gene *mecA* é carreado em um elemento genético móvel que está integrado no cromossomo das cepas MRSA, o cassete cromossômico estafilocócico (“staphylococcal cassette chromosome *mec*”- SCC*mec*) do qual onze formas (tipos I a XI), que diferem no tamanho e composição genética entre as cepas, foram descritas (Enright et al., 2002; Branger et al., 2003, Berglund et al., 2008, Zhang et al., 2009; McCarthy e Lindsay, 2010; IWG-SCC, 2009).

O primeiro elemento de SCC*mec* foi identificado no Japão na cepa de MRSA N315 (Ito et al., 1999) e em 2001, após estudo detalhado do cassete cromossomal (SCC*mec*), foram descritas mais 2 cepas de MRSA diferentes da N315 (Ito et al., 2001). Com o passar do tempo, novos tipos de SCC*mec* foram descobertos e hoje temos onze tipos descritos na literatura, tais como SCC*mec* IV (Ma et al., 2002), SCC*mec* V (Ito et al., 2004), SCC*mec* VI (Oliveira et al., 2006a), SCC*mec* VII (Berglund et al., 2008), SCC*mec* VIII (Zhang et al., 2009), SCC*mec* IX, SCC*mec* X (McCarthy e Lindsay, 2010), SCC*mec* XI (IWG-SCC, 2009). Nos últimos anos, muitas novas variantes têm sido relatadas por diferentes pesquisadores (Boyle-Vavra et al., 2005; Cha et al., 2005; Chlebowicz et al., 2010; Heusser et al., 2007; Higuchi et al., 2008; Hisata et al., 2005; Kwon et al., 2005; O'Brien et al., 2005; Oliveira e De Lencastre, 2002a; Shore et al., 2005; Stephens et al., 2007; Takano et al., 2008).

Com o número crescente de tipos de SCC*mec*, subtipos ou variantes publicados na literatura, tornou-se necessário a criação de regras internacionais de nomenclatura destes elementos estafilocócicos. Em 2009, o *International Working Group on Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome (SCC) Elements* definiu normas para a caracterização e classificação dos diferentes tipos de SCC*mec* baseada na análise estrutura deste elemento (IWG-SCC, 2009). Os SCC*mec* tipos I, II e III estão associados a cepas de origem hospitalar que 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). Muitos isolados de MRSA que apresentam múltipla resistência são susceptíveis apenas aos glicopeptídeos como a vancomicina. O SCCmec tipo IV 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, que é a sensibilidade a diversos antimicrobianos não beta-lactâmicos. (Oliveira e De Lencastre, 2002a; Enright et al., 2002; Okuma et al., 2002).

Para caracterização dos diferentes tipos de SCCmec tem sido amplamente empregada a técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase). A PCR *multiplex* permite a caracterização presuntiva e rápida dos diferentes tipos de elementos SCCmec e foi padronizada por diferentes pesquisadores (Oliveira et al., 2002a; Zhang et al., 2005; Zhang et al., 2009). Oliveira et al. (2002a) mostraram que a PCR *multiplex* é um método rápido e capaz de identificar, em um único ensaio, cinco tipos estruturais do elemento SCCmec entre diferentes estirpes de MRSA. Entretanto, estes mesmos autores relatam que pode haver certa dificuldade na amplificação destes elementos e que alguns isolados, portanto, são definidos como não-tipáveis.

Em estudo realizado por Perez-Roth et al. (2004), foi evidenciado a presença de 11 (2,93%) isolados não-tipáveis pela técnica de PCR proposta por Oliveira et al. (2002a). Outro trabalho realizado por Chung et al. (2004), mostrou que 4 de 113 isolados (3,54%) não foram tipáveis quando utilizado o mesmo ensaio proposto por Oliveira et al. (2002a). Com intuito de eliminar estes problemas de determinação do tipo de SCCmec em isolados MRSA, Zhang et al. (2005) propuseram outra reação de amplificação de DNA, PCR *Multiplex*, utilizando outros iniciadores e outras condições de amplificação do cassete cromossômico. Entretanto, este estudo também relatou a dificuldade de determinar o tipo de SCCmec em alguns isolados analisados. A explicação para estas observações pode estar relacionada com a presença de novos tipos e subtipos estruturais ou rearranjos estruturais e recombinação do elemento *mec* (Chung et al., 2004; Perez-Roth et al., 2004).

Assim, outras investigações, incluindo sequenciamento do elemento *mec*, são necessárias na caracterização desses isolados atualmente não-

tipáveis. (Oliveira et al., 2002a; Zhang et al., 2005; Zhang et al., 2009). Diferentes metodologias podem ser utilizadas para o sequenciamento genético dos genomas dos micro-organismos, dentre estas o *Ion Torrent PGMTM* (Life Technologies, EUA) (Howden et al., 2011; Mellmann et al., 2011; Vogel et al., 2012). Esta técnica, entretanto, foi pouco utilizada para bactérias. Em estudo realizado por Howden et al. (2011), a metodologia do *Ion Torrent PGMTM* mostrou-se útil na detecção de possíveis mutações no genoma de cepa VISA (*Vancomycin Intermediate Staphylococcus aureus*).

S. aureus é o principal agente infeccioso das infecções de corrente sanguínea no hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), e 70% dos isolados são resistentes a oxacilina.

Um estudo realizado no HC-FMUSP por Trindade et al. (2005), avaliou 115 isolados MRSA e demonstrou que 13% desses isolados eram sensíveis a quatro ou mais antibióticos sendo 95% deles identificados como *SCCmec* tipo IV. Quatro clones foram identificados pela eletroforese de campo pulsado como pertencentes a um clone predominante, o qual foi encontrado em 65% dos isolados.

Recentemente, foi relatado por Rossi et al. (2014) um caso de um paciente atendido no HC-FMUSP com infecção de corrente sanguínea causada por uma cepa de MRSA sensível à vancomicina (designado BR-VSSA), mas que adquiriu o gene *vanA* durante antibioticoterapia e tornou-se resistente à vancomicina (denominado BR-VRSA). Ambas as cepas estudadas pertenciam ao tipo de sequência (ST 8), uma linhagem genética associada à comunidade que carrega o cassete cromossômico estafilocócico (*SCCmec*) do tipo IV, a proteína A (*spa*) do tipo T292 e são filogeneticamente relacionados com o clone MRSA USA300. Neste estudo, foi identificado neste mesmo isolado a presença de um plasmídeo conjugativo de 55.706 pb (pBRZ01) capaz de carrear o gene *vanA*. A presença e disseminação de MRSA associado à comunidade contendo este gene pode, no futuro, tornar-se um grave problema de saúde pública.

1.3. Virulência

Além da resistência bacteriana e clonalidade, outro aspecto importante que deve ser considerado é a virulência de isolados MRSA. Estes micro-organismos podem ser produtores de inúmeros fatores de virulência, dentre os quais podemos destacar a produção de enzima coagulase, proteína A, desoxirribonucleases (DNAses), diferentes adesinas, hemolisinas e toxinas tal como a toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1) e até mesmo enterotoxinas estafilocócicas (SEs) (Dinges et al., 2000; Boyle-Vavra e Daum, 2007).

Algumas cepas de *S. aureus* produzem também um exopolissacarídeo capaz de impedir a fagocitose por polimorfonucleares neutrófilos e que promove a aderência do micro-organismo à célula hospedeira e também em dispositivos de próteses (Arbeit, 1984; Winn et al., 2008).

Os ácidos teicóicos atuam na aderência específica de bactérias Gram-positivas nas células de mucosa do hospedeiro e também podem contribuir na virulência do micro-organismo, uma vez que possuem atividades biológicas capazes de ativar o sistema complemento, aumentar a quimiotaxia de células polimorfonucleares e estimular a produção de anticorpos opsonizantes. Várias outras proteínas, incluindo adesinas, proteínas de ligação a fibronectina, proteínas de ligação ao colágeno e fator de agregação (*clumping factor*) contribuem para a aderência e virulência de *S. aureus*. (Winn et al., 2008).

A habilidade de *S. aureus* causar doenças está relacionada à sua capacidade de escapar dos mecanismos de defesa do sistema imunológico do hospedeiro. Para isso, este patógeno pode produzir diferentes proteínas extracelulares e de membrana, as quais constituem importantes fatores que promovem a sobrevivência no hospedeiro e contribuem para sua patogênese (Novick, 2000).

A produção de catalase por estafilococos contribui para sua virulência, pois esta enzima pode inativar o peróxido de hidrogênio e radicais livres formados pelo sistema da mieloperoxidase no interior das células fagocíticas (Winn et al., 2008). Segundo Rosenstein e Gotz (2000), alguns isolados de *S. aureus* produzem potentes lípases, as quais auxiliam na disseminação do

micro-organismo em tecidos cutâneos e subcutâneos. Marques et al. (1989) descreveram uma fosfolipase C fosfatidilinositol-específica que proporciona uma maior destruição tecidual por componentes do próprio sistema complemento do hospedeiro.

A enzima coagulase, a qual pode existir em forma livre ou ligada à célula bacteriana, liga-se a protrombina e torna-se enzimaticamente ativa, catalisando, assim, a conversão do fibrinogênio em fibrina. Essa atividade enzimática pode atuar para recobrir as células bacterianas com fibrina, tornando-as mais resistentes à opsonização e à fagocitose (Winn et al., 2008). Outras enzimas como as fibrinolisinases e hialuronidases também favorecem a disseminação do micro-organismo para tecidos adjacentes e, portanto são considerados importantes fatores de propagação do micro-organismo no organismo do hospedeiro (Makris et al., 2004; Rozpończyk et al., 2006; Hart et al., 2009).

Um dos fatores mais importantes na virulência de *S. aureus* é sua habilidade em produzir diferentes toxinas que tem como alvo as células inflamatórias do hospedeiro. Estas toxinas incluem α -hemolisinas, δ -hemolisinas, γ -hemolisinas, Leucocidina *Panton-Valentine* (PVL) e modulinas tipo α (α -type phenol soluble modulin peptides – *PSMa*) (Kobayayashi e DeLeo, 2009).

As hemolisinas possuem várias atividades biológicas. A α -hemolisina é um polipeptídeo de 33kDa, secretada pela maioria dos isolados de *S. aureus* em fase logarítmica tardia de crescimento e capaz de formar poros na membrana citoplasmática das células alvo (Gray et al., 1984; Tomita e Kamio, 1997). A δ -hemolisina e γ -hemolisina, também encontradas em algumas cepas de *S. aureus*, causam lise de uma variedade de tipos celulares. A δ -hemolisina é uma proteína de 3kDa que atua como surfactante, rompendo a membrana celular das células e também podendo interagir com esta membrana formando canais que resultam em extravasamento do conteúdo intracelular (Dinges et al., 2000).

As γ -hemolisinas consistem em três toxinas formadas, cada uma, por dois componentes, Hlg1 e Hlg2, que atuam na lise de eritrócitos de mamíferos. As leucocidinas LukD, LukE e PVL, as quais são também compostas por dois

componentes LukS e LukF, tem elevada afinidade por leucócitos polimorfonucleares e por macrófagos e monócitos. Estas toxinas, juntas, constituem diferentes combinações proteicas com graus variáveis de atividade lítica para a célula bacteriana (König et al., 1997; Tomita & Kamio, 1997).

O estudo da virulência de isolados de MRSA em pacientes hepatopatas é de grande importância no entendimento da evolução dos processos infecciosos principalmente no período pós-transplante. Para facilitar estes estudos de virulência, novas metodologias, baseadas no genoma bacteriano, tem sido propostas (Li et al., 2013; McNicholas et al., 2011). A tecnologia dos *microarrays* ou microarranjos tem impulsionado de maneira importante a pesquisa de genômica funcional dos diferentes organismos, desde bactérias até o homem, incluindo situações normais e patológicas. A técnica de microarranjo pode ser considerada uma importante ferramenta que permite detectar diferentes genes de virulência e descrever os níveis de expressão gênica de isolados de MRSA. Em estudo realizado por Camoez et al (2013) foi realizado a caracterização molecular de isolados MRSA ST398 provenientes de pacientes hospitalizados por diferentes métodos, incluindo a técnica de microarranjo. Esta metodologia proporcionou a detecção de alguns genes de virulência e resistência não detectados por metodologias convencionais como PCR. Outra casuística, realizada por Shore et al. (2012), mostrou que de um total de 107 isolados de MRSA, 94% apresentaram expressão por microarranjo de um ou mais genes codificadores de superantígenos e 91% apresentaram genes envolvidos na evasão do micro-organismo da resposta imune do hospedeiro. Segundo estes autores, a técnica de microarranjo permitiu detectar combinações características entre virulência e resistência bacteriana da maioria dos isolados MRSA estudados.

S. aureus contém muitos tipos de ilhas genômicas incluindo plasmídeos, transposons (Tn), sequências de inserção (IS), bacteriófagos, ilhas patogênicas e cassete cromossômicos. Estes elementos desempenham um papel importante no processo de adaptação do patógeno ao hospedeiro e são considerados elementos capazes de transferir informação genética entre as cepas bacterianas (Linsay, 2010). A troca destes elementos em *S. aureus* pode alterar o potencial patogênico e resistência das cepas. Para identificar com

maior facilidade estas alterações genéticas, a técnica de *microarranjo* pode ser empregada, pois realiza uma triagem dos principais genes presentes em diferentes isolados bacterianos. Vários estudos têm demonstrado que esta metodologia pode ser utilizada para distinguir entre as principais linhagens de MRSA, associadas às cepas comunitárias, e linhagens de *S.aureus* predominantes (Jamrozny et al., 2012; Yamamoto et al., 2012; Sung et al., 2008; Christianson et al., 2007).

1.4 Prevenção

O impacto da identificação de pacientes transplantados hepáticos portadores nasais de *S. aureus* nas taxas de infecção hospitalar permanece controverso (Patterson 2003; Singh et al. 2006). Outras medidas de erradicação e controle de *S. aureus* resistente á oxacilina também são controversas. O uso de mupirocina nasal, entretanto, já foi testado em diferentes populações de pacientes como renais crônicos, transplantados hepáticos e também no controle de surtos hospitalares (Jerigan et al. 1996; Karchmer et al. 2002, Parras et al. 1995; Patel et al. 2001; Pujol et al. 1996; Patterson 2003; Singh et al. 2006) com bons resultados. O uso de mupirocina na descolonização de portadores nasais em um período curto de tempo para prevenção de infecção hospitalar pode ser útil e não está associada ao desenvolvimento de resistência (Singh et al. 2006).

Em estudo conduzido por Takatsuki et al. (2010), em 9 transplantados hepáticos, o uso profilático de mupirocina nasal, por 3 dias, mostrou-se eficiente na descolonização de 4 (22,5%) pacientes portadores de MRSA, sem evidências de efeitos colaterais significativos.

1.5 Justificativa

A caracterização molecular de isolados de MRSA pode ser considerada uma importante ferramenta para definir estratégias que possam ser úteis no controle e prevenção de infecções por este micro-organismo.

Portanto, a realização de um projeto avaliando a colonização e infecção hospitalar, bem como a caracterização molecular de isolados MRSA provenientes de pacientes atendidos na unidade de transplante hepático do HC-FMUSP, se fez necessária.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo principal

Descrever a clonalidade e a virulência de isolados de MRSA obtidos de cultura de vigilância e de infecção de pacientes hepatopatas (lista de espera) e transplantados hepáticos por diferentes metodologias moleculares.

2.2 Objetivos secundários

Descrever a proporção de colonização e infecção por MRSA em pacientes hepatopatas e transplantados hepáticos atendidos no HC-FMUSP.

Comparar a clonalidade, perfil de sensibilidade e virulência de isolados de MRSA que colonizam e infectam o mesmo paciente.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Período e local do Estudo

O presente estudo foi realizado no período de agosto de 2010 a janeiro de 2012 e na Unidade de Transplante de Fígado do Instituto Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (ICHC-FMUSP). O Hospital das Clínicas (HC) é um hospital terciário estadual vinculado à Secretaria de Estado da Saúde para fins de coordenação administrativa e associado à Faculdade de Medicina para fins de ensino, pesquisa e assistência na área de saúde de alta complexidade. O complexo do HC possui clínicas especializadas destinadas a prestar assistência a pacientes em diversas especialidades médicas, permitindo a promoção da saúde e prevenção de diferentes doenças.

O ICHC é um instituto que dispõe de aproximadamente 883 leitos operacionais, 24 enfermarias clínicas de diversas especialidades, 12 enfermarias cirúrgicas e 12 unidades de terapia intensiva (UTI). A Unidade de Fígado é composta por um ambulatório localizado no 4º andar do PAMB (Prédio dos Ambulatórios) e por 25 leitos de enfermaria e 6 leitos de UTI.

3.2 Pacientes

Os pacientes hepatopatas tiveram suas coletas de vigilância realizadas nos dias das consultas agendadas com os médicos do ambulatório, ou quando estavam internados na Enfermaria e na UTI da Unidade de Transplante de Fígado. As coletas foram realizadas nos consultórios médicos ou em salas de enfermagem da unidade, sempre na presença de duas pessoas.

Antes de realizar a coleta, foi aplicado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para todos pacientes que participaram do estudo (Anexo 1).

Foram garantidos a confidencialidade, sigilo e privacidade dos dados do estudo. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa-CAPPesq (Anexo 2).

Foi aplicado também um questionário simples aos pacientes de lista de espera, onde foram coletados alguns dados como uso prévio de antimicrobianos, internação ou realização de algum atendimento ou procedimento hospitalar.

Já os pacientes submetidos a transplante hepático tiveram suas coletas de *swabs* realizadas no primeiro período do pós-operatório (1º P.O.), ou seja, nas primeiras 48 horas após a realização do transplante. A fim de aumentar o isolamento de MRSA nas culturas de colonização pós-transplante, foram realizadas coletas semanais de pacientes transplantados durante o período de internação, ou seja, a primeira coleta foi realizada em até 48 após o transplante e as demais coletas foram realizadas após 7, 14, 21, 28, 35 dias após o transplante e assim sucessivamente, até isolamento de MRSA ou até alta ou óbito do paciente.

Para o estudo de colonização dos pacientes hepatopatas e transplantados hepáticos foram coletados dois *swabs* nasais e dois inguinais, sendo um *swab* destinado para a cultura microbiológica e o outro para detecção direta de genes específicos de MRSA por reação de polimerase em cadeia (PCR). Assim, foram coletados quatro *swabs* do mesmo paciente: nasal direito, nasal esquerdo, inguinal direito e inguinal esquerdo. 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.

Os pacientes com indicação clínica de infecção foram submetidos a coletas de amostras clínicas, conforme solicitação médica. As amostras clínicas foram coletadas e encaminhadas ao setor de Microbiologia da Divisão do Laboratório Central (DLC) do ICHC (Instituto Central do Hospital das Clínicas) do HC-FMUSP, para análise microbiológica. Os isolados recuperados a partir destas amostras foram encaminhados para o Laboratório de Bacteriologia

(Laboratório de Investigação Médica - LIM54) para realização de testes fenotípicos e genotípicos.

Foi realizado o componente cirúrgico de todos pacientes submetidos a transplante hepático. Define-se como critério de inclusão no componente cirúrgico NNISS, todo paciente que entre no bloco cirúrgico, faça incisão na pele ou membrana mucosa e que o fechamento da incisão tenha ocorrido antes do paciente sair do bloco cirúrgico. Foram monitorados todos os pacientes submetidos a transplante hepático, em busca de infecção cirúrgica causada por *S. aureus*, em especial por MRSA, e também em todos os sítios corpóreos, até 30 dias após o ato cirúrgico. O paciente foi acompanhado até a alta hospitalar, e também no retorno ambulatorial até cumprimento do prazo estabelecido.

O preenchimento de uma ficha de coleta de dados (Anexo 3) ocorreu sempre após o retorno do paciente à unidade de origem, ou no 1º pós-operatório. Foram coletados os dados relativos à: (1) caracterização dos pacientes, descrevendo nome, registro, idade, sexo e doença de base; (2) cirurgia, constando data, tipo de transplante (intervivos, doador cadáver ou retransplante) e data do término do componente cirúrgico; (3) equipe cirúrgica, relatando o nome do cirurgião do doador e nome do cirurgião do receptor; (4) infecção hospitalar até 30 dias após o transplante.

Em relação às infecções hospitalares foram coletados dados referente ao tipo de infecção, tais como: (1) infecção do sítio cirúrgico que pode ser sítio cirúrgico incisional superficial (SCIS), sítio cirúrgico incisional profundo (SCIP) e sítio cirúrgico órgão e espaço (SCOE), todos constando a data e micro-organismo causador da infecção; (2) infecção do trato urinário sintomática (ITUS) ou assintomática (ITUA) com presença ou não de cateter vesical; (3) infecção da corrente sanguínea laboratorial (ICSL) com presença ou não de cateter central; (4) infecção da corrente sanguínea clínica (ICSC) com presença ou não de cateter central; (5) pneumonia com presença ou não de respirador; (6) outras infecções. Em todos os casos foram coletados dados referente à data da infecção e nome do micro-organismo isolado conforme Anexo 3.

A taxa de infecção de sítio cirúrgico foi calculada para os pacientes submetidos ao transplante hepático. Os diagnósticos de infecção foram

baseados nos critérios modificados do CDC de 1988 (Garner et al., 1988) (Anexo 4).

3.3 Métodos fenotípicos

3.3.1 Cultura microbiológica

Os *swabs* das secreções nasais e inguinais foram semeados em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*, Difco) acrescido de 2,5 % de cloreto de sódio, 3,5 MG/mL de cefoxitina e 20 mg/mL de aztreonam. Os caldos foram incubados a 35°C por até 48 horas conforme protocolo previamente padronizado por Bocher et al. (2008). Após este período de incubação (48 horas), os caldos foram semeados em placas de Petri contendo ágar sal-manitol e em seguida, estas placas foram incubadas a 35°C por mais 48 horas.

Staphylococcus aureus fermentam manitol formando colônias de características sugestivas deste micro-organismo (Winn et al., 2008). Colônias suspeitas de *Staphylococcus aureus* foram repicadas em placas de ágar-sangue de carneiro a 5% (Difco), incubadas a 35°C por 24 horas e, posteriormente, submetidas à coloração de Gram, prova da catalase e teste de DNase, para sua identificação fenotípica presuntiva (Mir et al., 1998).

A identificação dos micro-organismos a partir de amostras clínicas (denominados isolados clínicos) clínico foi realizada no Laboratório de Microbiologia da Divisão do Laboratório Central do HC-FMUSP, através de provas bioquímicas convencionais e por meio do sistema de identificação automatizado Vitek® (laboratório BioMérieux). A técnica de identificação dos micro-organismos foi feita com cartões GPI (para bactérias Gram-positivas). Os isolados de MRSA (resistência caracterizada pela determinação de CIM para oxacilina por método automatizado) foram enviados ao Laboratório de Bacteriologia (LIM54) em placas de Agar Sangue de carneiro 5% (AS), as quais foram transportadas à temperatura ambiente, conforme normas de biossegurança preconizadas pelo LIM54.

3.3.2 Pesquisa de *S. aureus* oxacilina resistente

Os isolados bacterianos identificados como *Staphylococcus aureus* foram submetidos ao teste de triagem para detecção de resistência a oxacilina, conforme recomendado pelo CLSI (*Clinical Laboratory Standards Institute*, 2011).

3.3.3 Detecção do gene *erm*

Os isolados de *S. aureus* resistentes aos macrolídeos podem apresentar resistência constitutiva ou induzível à clindamicina (metilação do rRNA 23S codificado pelo gene *erm*), também conhecida como resistência MLSB (macrolídeo, lincosomida e estreptogramina tipo B) ou podem ser resistentes apenas aos macrolídeos (mecanismo de efluxo codificado pelo gene *msrA*). A resistência induzível a clindamicina foi detectada pelo teste de aproximação de disco (teste de disco difusão), colocando um disco de 2 µg de clindamicina a uma distancia de 15 mm a 26 mm da borda de um disco de eritromicina de 15 µg. Este teste foi executado e interpretado de acordo com as normas preconizadas pelo CLSI (2011), onde após a incubação das placas, os micro-organismos que não apresentaram achatamento do halo de clindamicina foram relatados como sensíveis a clindamicina e aqueles que apresentaram achatamento do halo de clindamicina adjacente ao disco de eritromicina (chamado de Halo "D") foram indicativos de possuírem resistência induzível (RI) a clindamicina.

3.3.4 Testes de sensibilidade aos antimicrobianos

Os testes de sensibilidade foram realizados pelo método de microdiluição em caldo para determinação da CIM (Concentração Inibitória Mínima) para diferentes antimicrobianos (CLSI, 2011). Todos os isolados MRSA tiveram sua CIM determinada para os seguintes antimicrobianos: oxacilina, clindamicina, eritromicina, vancomicina, sulfametoxazol-trimetoprim, ciprofloxacina, gentamicina, cloranfenicol, e tetraciclina.

A solução estoque de antimicrobiano foi preparada a uma concentração final de 10 mg/mL. Para cada antimicrobiano foi empregado o solvente adequado, conforme os procedimentos e cálculos padronizados pelo CLSI (2011).

As concentrações testadas abrangeram os cortes descritos na tabela 2C do documento M100-S21 (para uso com M7-A8, CIM) do CLSI, de 0,125µg/mL a 256µg/mL. A solução inicial de 256µg/mL foi obtida a partir da solução estoque de concentração igual a 10.000µg/mL. Foram realizadas diluições do antimicrobiano com o diluente adequado para cada antimicrobiano conforme normas descritas no documento M100-S21 (CLSI, 2011). A suspensão bacteriana foi ajustada por espectrofotometria, com densidade óptica de 0,08 a 0,1 em comprimento de onda de 625nm, e as demais etapas do teste foram realizadas conforme recomendações do CLSI (2011). A CIM para cada antimicrobiano testado foi determinada de acordo com a observação macroscópica de crescimento bacteriano por dois pesquisadores e por espectrofotometria utilizando um comprimento de onda de 625nm. Os resultados foram interpretados de acordo com o documento M100-S21 (CLSI, 2011).

3.4 Métodos genotípicos

3.4.1 Detecção por PCR do gene 16S RNAr

O DNA (ácido desoxirribonucléico) genômico bacteriano proveniente das amostras de *swabs* nasais e inguinais dos pacientes de lista de espera e de pacientes transplantados hepáticos foi extraído pelo kit *Illustra™ Tissue & Cells Genomicprep Mini Spin* (Ge Healthcare Life Science, USA), de acordo com as instruções do fabricante.

Para detecção do gene 16S RNAr foi realizada reação de polimerase em cadeia (PCR) qualitativa com os iniciadores 16S-F (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) e 16S-R (ACGGCTACCTTGTTACGACTT) descritos por Mendes et al. (2007). O produto amplificado nesta reação foi de

1.499 bp (pares de bases). Para a amplificação deste gene foram empregados os seguintes parâmetros: um ciclo inicial de 3 minutos a 94°C seguido de 35 ciclos de amplificação, cada um consistindo de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 55 °C e 1 minuto a 72 °C, tendo um ciclo final de extensão de 7 minutos a 72 °C. Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose a 2 %, corados com 10 µL de SYBR Safe® “DNA gel stain” (Invitrogen, USA) e posteriormente visualizado e fotografado sob transiluminação ultravioleta em equipamento *AlphaImager® 2200 Imaging System* (Alpha Innotech Corp., USA)

3.4.2 Detecção por PCR dos genes *coA* e *mecA*

O DNA genômico bacteriano proveniente das amostras de *swabs* dos pacientes foi extraído pelo kit Illustra™ Tissue & Cells Genomicprep Mini Spin, conforme descrito anteriormente (item 3.4.1). Para os isolados de MRSA, o DNA genômico bacteriano foi 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.

Para detecção do gene da coagulase e do gene *mecA* foi realizada PCR *multiplex* de acordo com as condições descritas pelo kit NCL-SA-PS (Novo Castra, Reino Unido). 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 iniciadores (*primers*) SA-1, SA-2, SA-3 e SA-4 (tabela 1), 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.

Para a amplificação destes genes foi utilizado 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.

Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose a 2%, corados com 10 µL de SYBR Safe® “DNA gel stain” (Invitrogen, USA) e posteriormente visualizado e fotografado em equipamento *Alphamager® 2200 Imaging System* (Alpha Innotech Corp., USA)

Tabela 1 - Iniciadores empregados na reação de PCR multiplex para detecção de genes *coA* e *mecA* para triagem de isolados MRSA

Iniciador	Sequência de oligonucleotídeos (5´-3´)	Tamanho do amplicon	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		

3.4.3 Determinação do tipo de cassete cromossômico (SCC*mec*)

A determinação do tipo de SCC*mec* dos isolados foi realizada utilizando-se o método de PCR *multiplex*, conforme descrito por Zhang et al. (2005). Os iniciadores utilizados nestas reações estão descritos na tabela 2.

Tabela 2 - Sequencia dos iniciadores utilizados para PCR *multiplex* para determinação dos tipos de SCC*mec*

Iniciador	Sequência de oligonucleotídeos (5´-3´)	Tamanho do produto	Especificidade (tipo de SCC <i>mec</i>)
Tipo I-F	GCTTTAAAGAGTGTCTGTTACAGG	613	SCC <i>mec</i> I
Tipo I-R	GTTCTCTCATAGTATGACGTCC		
Tipo II-F	CGTTGAAGATGATGAAGCG	398	SCC <i>mec</i> II
Tipo II-R	CGAAATCAATGGTTAATGGACC		
Tipo III-F	CCATATTGTGTACGATGCG	280	SCC <i>mec</i> III
Tipo III-R	CCTTAGTTGTCGTAACAGATCG		
Tipo IVa-F	GCCTTATTCGAAGAAACCG	776	SCC <i>mec</i> IVa
Tipo IVa-R	CTACTCTTCTGAAAAGCGTCG		
Tipo IVb-F	TCTGGAATTACTTCAGCTGC	493	SCC <i>mec</i> IVb
Tipo IVb-R	AAACAATATTGCTCTCCCTC		
Tipo IVc-F	ACAATATTTGTATTATCGGAGAGC	200	SCC <i>mec</i> IVc
Tipo IVc-R	TTGGTATGAGGTATTGCTGG		
Tipo IVd-F5	CTCAAAATACGGACCCCAATACA	881	SCC <i>mec</i> IVd
Tipo IVd-R6	TGCTCCAGTAATTGCTAAAG		
Tipo V-F	GAACATTGTTACTTAAATGAGCG	325	SCC <i>mec</i> V
Tipo V-R	TGAAAGTTGTACCCTTGACACC		
<i>mecA</i> 147-F	GTGAAGATATACCAAGTGATT	147	<i>mecA</i>
<i>mecA</i> 147-R	ATGCGCTATAGATTGAAAGGAT		

3.4.4 Detecção por PCR qualitativo de genes de virulência

A determinação da presença de genes de virulência que codificam para adesinas e toxinas específicas de MRSA foi determinada por PCR *multiplex*, conforme protocolo descrito por Babba-Mousa et al. (2008). Os iniciadores utilizados para detectar estes genes de virulência estão descritos na tabela 3.

A amplificação dos genes de virulência foi realizada de acordo com Okuma et al. (2002). Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose a 2%, corados com SYBR Safe® “DNA gel stain” (Invitrogen, USA) e visualizados em equipamento *AlphaImager® 2200 Imaging System*.

Tabela 3 - Oligonucleotídeos utilizados nas reações de amplificação *multiplex* para detecção de genes de virulência de isolados de MRSA (Baba-Moussa et al., 2008)

Fator de Virulência	Iniciador	Sequência dos oligonucleotídeos	Fragmento amplificado	Nº de acesso GeneBank
<i>Clumping factor B</i>	clfB 1	5-ATTAGTGCAAACACAAACAGTGCG-3	305-304	AJ224764
	clfB 2	5-AGTTCCTTGCGCATTGGAAATCGT-3		
Proteína ligadora de fibrinogênio	fib 1	5-AGCGGCAATAGGTATTACTACAACT3	220-222	X72013
	fib 2	5-CGAATGTACCATCGTTAAATTCAT-3		
Proteína ligadora de fibronectina	fnbA 1	5-TTAACTTGGGATAATGGTTTAGTTT-3	273-277	AJ629521
	fnbA 2	5-GCTGATGAATCCGTTTCTTCTATTG-3		
LukE-LukD (leucocidina)	LUKDE-1	5- TGAAAAGGTTCAAAGTTGATACGAG-3	269	Y13225
	LUKDE-2	5- TGTATTGATAGCAAAAGCAGTGCA-3		
PVL (leucocidina)	PVL-1	5-ATCATTAGGTAAAATGTCTGGACATGATCCA-3	433	AB006796
	PVL-2	5- GCATCAASTGTATTGGATAGCAAAAGC-3		
TSST-1 (toxina da síndrome do choque tóxico)	TST-1	5-TTCACTATTTGTAAAAGTGTGACACCCACT-3	180	J02615
	TST-2	5-TACTAATGAATTTTTTATCGTAAGCCCTT-3		
Esfoliatina A (<i>eta</i>)	mpETA-1	5-ACTGTAGGAGCTAGTGCAATTTGT-3	190	M17347
	mpETA-3	5-TGGATACTTTTGTCTATCTTTTCATCAAC-3		
Esfoliatina B (<i>etb</i>)	mpETB-1	5-CAGATAAAGAGCTTTATACACACATTAC-3	612	M17348
	mpETB-2	5-AGTGAACCTATCTTTCTATTGAAAAACACTC-3		

Em virtude da origem da maioria dos isolados (mucosa nasal e pele) não foram incluídos nas reações de PCR qualitativas os genes codificadores de enterotoxinas.

3.4.5 PFGE

Os isolados de MRSA foram submetidos à análise do polimorfismo de seu DNA genômico por eletroforese em campo pulsado (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*). A digestão do DNA cromossômico foi realizada com a 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; McDougal et al., 2003).

Os perfis eletroforéticos gerados por PFGE foram analisados visualmente e utilizando-se o software de bioinformática BioNumerics versão 7.1 (*Applied Maths*, Sint-Martens-Latem, Belgium). Os agrupamentos realizados pelo método de *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* (UPGMA), com coeficiente de similaridade de Dice $\geq 80\%$, com otimização de 0,5% e tolerância de 1,5% foram identificados como pertencentes a um *cluster* (Mulvey et al. 2001). Foi atribuída uma letra maiúscula para cada tipo de perfil eletroforético e para diferenciar os subtipos foram designados números à respectiva letra.

Os diferentes perfis caracterizados por PFGE foram comparados com o perfil de virulência, tipo de *SCCmec* e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos.

3.4.6 Detecção por técnica de microarranjo de genes de virulência e resistência

Para caracterização do transcriptoma (conjunto de transcritos como RNAs mensageiros, RNAs ribossômicos e RNAs transportadores do micro-organismo) dos isolados de *S. aureus* foi empregada a técnica de microarranjo ou *microarray*. Esta técnica permite determinar os níveis de expressão de transcritos de cada isolado através do uso de um DNA-chip, *GeneChip*® *S. aureus* *Genome Array* (Affimetrix Inc., USA).

Os chips de *microarranjo* customizados para *S. aureus* e comercializados pela Affimetrix® possuem uma matriz contendo conjuntos de sondas para mais de 3.300 *open reading frames* (fases de leitura aberta) de *S. aureus*. Além disso, a matriz contém também sondas para estudar mais de 4.800 regiões intergênicas do genoma de *S. aureus* (*Data Sheet GeneChip*® *Made-to-Order Array Program, GeneChip*® *S. aureus* *Genome Array*, Affimetrix Inc., USA; 2005).

A seleção das cepas de MRSA submetidas ao experimento por técnica de microarranjo foi baseada na origem dos isolados e no perfil de virulência obtido. Assim, foram determinados seis grupos: (1) isolados MRSA de colonização obtidos do mesmo paciente antes e após realização do transplante hepático, (2) isolados MRSA obtidos do paciente AMB sendo um de infecção e os demais de colonização pós-transplante, (3) isolados MRSA obtidos do paciente KYK sendo um de infecção e os demais de colonização pós-transplante, (4) isolados MRSA obtidos do paciente HPR sendo um de infecção e os demais de colonização pós-transplante, (5) isolados clínicos de diferentes pacientes (com infecção clínica) e (6) isolados MRSA com PCR qualitativa positiva para gene de virulência *tst*.

3.4.6.1 Extração e integridade do RNA bacteriano

Os isolados MRSA foram cultivados em 5 mL caldo BHI sob agitação por 16 horas a 37°C, em aerobiose. Foram preparados 2mL de uma suspensão bacteriana na escala 0,5 de MacFarland ($\sim 1,5 \times 10^8$ UFC/ml), onde uma

alíquota de 1 mL foi diluída (pelo menos 3 diluições seriadas de 1:100) e a última diluição foi plaqueada (100 µL) em Agar Sangue e incubada a 37 °C por 18 a 24 horas para contagem das colônias viáveis. A outra alíquota de 1mL da suspensão bacteriana foi submetida ao tratamento com o reagente *RNA protect bacteria* (Qiagen, Valencia, CA) para posterior extração do RNA total.

O RNA foi extraído conforme protocolos descritos por Petinaki et al. (2006) e por Chini et al. (2007).

3.4.6.2 Síntese, purificação e quantificação de cDNA

Inicialmente foram preparadas diluições de RNA controle (*Poly-A RNA Controls*) conforme instruções do fabricante (*GeneChip® Expression Analysis Technical Manual*, 2005-2006 Affymetrix Inc., USA). A purificação do cDNA sintetizado foi utilizado o kit *MiniElute PCR Purification Columns* (Qiagen Valencia, CA; 2005). A quantificação do cDNA foi realizada em equipamento NanodropC® (Uniscience).

3.4.6.3 Fragmentação e hibridização do cDNA

Para fragmentação do cDNA foi preparada uma mistura de volume final de 20 µL contendo 2 µL de tampão 10 X DNase I, 10 µL de cDNA (quantificado anteriormente) e 0,6 U/µg de cDNA de DNase I (Pierce). Esta mistura foi incubada a 37 °C por 10 minutos seguida de incubação a 98°C por 10 minutos para inativação da enzima DNase I. As etapas de marcação terminal e hibridização do cDNA marcado foram realizadas de acordo com o formato do *Gene Chip® S.aureus* (formato 49).

Os procedimentos de lavagem, coloração e escaneamento dos chips de microarranjo foram realizados de acordo com as recomendações do fabricante, descritas no *Gene Chip® Expression Analysis Technical Manual* (Affimetrix, 2005).

3.4.6.4 Análise dos Resultados

Após realização dos ensaios de microarranjo, os grupos de amostras previamente definidos foram submetidos a uma análise estatística utilizando um software específico, o *Affymetrix Expression Console™ Software* (versão 1.0). Este programa permite a geração de valores normalizados de expressão gênica, a partir de arquivos específicos (CHP e CEL). Além disso, outra aplicação deste software é produzir medidas de Controle de Qualidade (CQ) para avaliar os resultados das hibridizações. Os ensaios de microarranjos da Affymetrix contêm controles de hibridização, de marcação e controles de referência que ajudam a determinar a qualidade das hibridizações.

Os valores gerados pelo programa *Affymetrix Expression Console™* foram analisados usando dois algoritmos, o algoritmo RMA (*Robust Multichip Analysis*) e o algoritmo MAS5 (também conhecido como algoritmo estatístico). O RMA é um algoritmo capaz de adaptar um modelo matemático robusto linear, realizando a normalização dos dados e proporcionando comparações mais significativas entre as amostras avaliadas. Já o algoritmo de MAS5 analisa cada matriz de forma independente e, portanto, ocasiona aumento da capacidade de detectar pequenas variações entre as amostras e os controles avaliados.

Foi realizada uma avaliação dos controles de hibridização e um monitoramento da qualidade das amostras empregando duas análises sugeridas pelo fabricante, utilizando-se este mesmo software. Estas análises métricas envolvem a média do sinal de todos os conjuntos de sondas incluídos no experimento (análise métrica *All Probe Set Mean*) e a média de expressão do logaritmo relativo – RLE (análise métrica *All Probe Set RLE Mean*). Ambas as análises foram realizadas de acordo com os procedimentos descritos no manual *Quick Reference Card - QC Metrics for Exon and Gene Design Expression Arrays* (Affimetrix Inc., USA).

Os grupos de amostras, previamente definidos, foram submetidos a uma sumarização e normalização dos dados obtidos utilizando os algoritmos RMA e MAS5, aplicando-se o coeficiente de Pearson (r^2). Este coeficiente avalia a concordância de sinal entre as amostras, comparando os valores de sinal

obtidos e correlacionando-os positivamente ou negativamente, assumindo assim valores entre -1 e 1. Se r^2 for igual a 1, significa que existe uma correlação perfeita positiva entre as duas variáveis e se r^2 for igual a 0, significa que as duas variáveis não dependem linearmente uma da outra. Mas se este coeficiente for igual a -1 é possível dizer que existe uma correlação negativa perfeita entre as duas variáveis, ou seja, se uma aumenta a outra sempre diminui. Assim, resultados de r^2 que estiverem entre o intervalo $0,8 \leq r^2 < 1$ indicam que existe uma correlação fortemente positiva entre as amostras e resultados entre $0,5 \leq r^2 < 0,8$, uma moderada correlação.

Os arquivos com extensão CEL, gerados pelo equipamento de *microarray*, foram importados e os valores de intensidade foram transformados em escala logarítmica. A normalização dos resultados foi realizada subtraindo a mediana do *array* de referência (amostra P14N *S.aureus*) do sinal de cada gene. Esse *array* de referência, por sua vez, foi escolhido por ter sua expressão mediana igual à mediana da expressão global de todos os *arrays*.

Foi aplicado o padrão *z-score* para indicar a quantos desvios padrão um valor de expressão medido está acima ou abaixo da média de todas as cepas. Assim, os genes com *z-score* superior a 1,6 foram rotulados como altamente expressos e quando o *z-score* estivesse abaixo de 1,6, os genes foram definidos como fracamente expressos em um isolado MRSA específico. O agrupamento pela técnica de *hierarchical clustering* foi realizado utilizando uma seleção não-supervisionada de cem genes com elevada variabilidade gênica.

3.4.7 Detecção de gene *tst* por PCR quantitativo (PCRq)

Para os isolados que apresentaram positividade para gene *tst* (gene codificador da toxina da síndrome do choque tóxico) na análise qualitativa e por técnica de microarranjo, foi realizada uma análise quantitativa da expressão deste gene pela técnica de PCR em tempo real ou PCR quantitativo (PCRq).

A extração do RNA bacteriano e a quantificação do gene *tst* por PCRq foram realizados conforme protocolos descritos por Petinaki et al. (2006) e Chini et al. (2007). Foi utilizado como gene de referência o gene 16S RNAr, o qual é caracterizado por alta expressão e estabilidade (Scheu et al., 1998). Os

iniciadores 16S-F (CAGCTCGTGTCTGAGATGT) e 16S-R (CGTAAGGGCCATGATGACT) utilizados para amplificar este gene foram desenhados de acordo com programa *Primer-Blast* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

Para padronizar as reações de PCRq, foram realizadas curvas-padrão de eficiência das reações empregando metodologia descrita por Jarraud et al. (2002) e Kuroda et al. (2001).

3.4.8 Sequenciamento do genoma bacteriano

O isolado que não foi capaz de ter seu tipo de cassete cromossômico determinado por reações de PCR *multiplex*, foi submetido à análise do genoma total pela técnica de sequenciamento *Ion Torrent PGM™* (Life Technologies, EUA), utilizando *chip* 316. A metodologia envolvida nesta análise genômica foi feita no Laboratório de Investigação Médica (LIM03) do HC-FMUSP, conforme instruções do fabricante (*Ion Torrent PGM™*, Life Technologies, EUA).

A montagem do genoma foi realizada através de leituras brutas do sequenciamento geradas pelo *Ion Torrent PGM™*, as quais foram extraídas do arquivo sff usando *sff_extract* (http://bioinf.comav.upv.es/seq_crumbs/), com a opção de retirar as sequências referentes aos adaptadores de sequenciamento para gerar um arquivo em formato fastq. As 1.493.894 leituras brutas sem adaptadores foram então analisadas com o pacote FASTQC (www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/) e foi constatada uma queda da qualidade Phred das bases a partir da centésima base. O pacote FASTX-toolkit (http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/) foi então usado para trimar as leituras a partir da base 100, assim efetuando a retirada das bases com qualidade Phred menor do que 18.

As leituras trimadas foram então usadas como entrada para montagens *de novo* em paralelo, usando os softwares Mira (Chevreux et al., 1999; Chevreux et al., 2004) e CLC Genomics Workbench6 (www.clcbio.com). Os *contigs* referentes a cada montagem foram mesclados em uma montagem *de novo* usando o software Geneious 7.1.5 com parâmetros muito estridentes de montagem (Kearse et al., 2012). Os *contigs* mesclados foram então

visualmente curados para resolver ambiguidades pontuais. Os *contigs* foram ordenados usando o software online Projector 2 para gerar um *scaffold* do genoma (Van Hijum et al., 2005). Esse *scaffold* foi então submetido a anotação automática através da plataforma RAST - *Rapid Annotation using Subsystems Technology* (Aziz et al., 2008). Esta anotação foi comparada ao cromossomo da cepa N315 de *Staphylococcus aureus* (número de acesso do *GenBank* NC_002745.2) pelo sistema GLIMMER, o qual permite encontrar aproximadamente 98% de todos os genes no genoma bacteriano sequenciado (Delcher et al., 1999).

Após a montagem, foi realizada curadoria dos genes pertencentes ao cassete cromossômico estafilocócico utilizando programa Artemis (*Genome Browser and Annotation Tool; Welcome Trust Sanger Institute*). As sequências codificadoras (CDS - *Coding Sequences*) foram comparadas aos diferentes tipos de cassetes cromossômicos descritos na literatura (McCarthy; Lindsay, 2010; IWG-SCC, 2009).

Para identificar os principais genes de virulência e resistência a antibióticos no genoma bacteriano sequenciado foram utilizados dois programas *VirulenceFinder* 1.2 e *ResFinder* 2.0, os quais utilizam o BLAST para identificar os genes de virulência e de resistência adquirida, respectivamente (Kleinheinz et al., 2014; Altschul et al., 1997).

O *ResFinder* é baseado em um banco de dados de mais de 2.000 genes de resistência que abrange 12 tipos de resistência a diferentes antimicrobianos, como aminoglicosídeos, beta-lactâmicos, fluoroquinolonas, fosfomicina, ácido fusídico, glicopeptídeos, macrolídeos-lincosamidas-estreptograminaB (MLS), cloranfenicol, rifampicina, sulfonamidas, tetraciclina e trimetoprim. Por padronização do programa, apenas os genes com 98% de identidade aos genes da base de dados do *ResFinder* e *Virulence Finder* foram relatados no isolado analisado.

ResFinder e *VirulenceFinder* estão disponíveis gratuitamente no site <http://cge.cbs.dtu.dk/services/>. Neste mesmo endereço eletrônico foi possível realizar a análise da sequência de sete genes alélicos (MLST - *MultiLocus Sequence Typing* 1.7) do genoma do isolado de MRSA sequenciado pelo *Ion Torrent PGM™* (Larsen et al., 2012).

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Pacientes

Nos anos de 2010 e 2011 foram realizados 114 e 89 transplantes hepáticos na Unidade de Transplante de Fígado do ICHC (HC-FMUSP), respectivamente.

No período de agosto de 2010 a janeiro de 2012, foram realizadas coletas de *swabs* nasais e inguinais de um total de 190 pacientes hepatopatas, sendo 126 (66,3%) pacientes da lista de espera de transplante hepático e 64 (33,7%) pacientes transplantados hepáticos do HC-FMUSP.

Dos 126 pacientes de lista de espera coletados, 47 (37,3%) foram internados nos últimos 6 meses antes da coleta e 30 (23,8%) pacientes relataram o uso prévio de antimicrobianos neste mesmo intervalo de tempo. Dos 126 pacientes, 58 (46,0%) relataram não ter utilizado nenhum tipo de antimicrobiano previamente e 38 (30,2%) não se lembravam de ter feito uso destes medicamentos. Dos 30 pacientes com uso prévio de antimicrobianos, 15 (50,0%) receberam fluorquinolonas sendo norfloxacin a mais utilizada (86,7%). Apenas um paciente fez uso de levofloxacin e norfloxacin previamente.

A principal doença de base observada nos 126 pacientes hepatopatas foi cirrose causada por vírus da hepatite C (30,2%) seguida de cirrose alcoólica (18,3%). Outros dados clínicos e demográficos de todos os pacientes envolvidos neste estudo estão descritos na tabela 4.

Tabela 4 –Características clínicas e demográficas de 190 pacientes hepatopatas e transplantados hepáticos submetidos à pesquisa de portadores de *S. aureus* resistente à oxacilina, atendidos na unidade de Fígado do HC-FMUSP

Características	Hepatopatas (n=126)	Transplantados (n=64)
Sexo masculino	85 (67,4%)	37 (57,8%)
Idade (anos)		
Média	50,2	46,3
Mediana	53	52
Intervalo	19 - 71	17 - 71
Desvio padrão	13,6	16,4
MELD		
Média	9,2	25,8
Mediana	8,9	25
Intervalo	2,3-16,5	16 - 53
Doença de base*		
Cirrose alcoólica	23 (18,3%)	8 (12,5%)
Cirrose biliar primária	4 (3,2%)	1 (1,5%)
Cirrose biliar secundária	3 (3,6%)	2 (3,1%)
Cirrose criptogênica	13 (10,3%)	9 (14,0%)
Cirrose esclerosante	5 (4,0%)	1 (1,5%)
Cirrose por vírus da hepatite B	8 (6,3%)	3 (4,6%)
Cirrose por vírus da hepatite C	38 (30,2%)	10 (15,6%)
Hepatite auto-imune	9 (7,1%)	2 (3,1%)
Hepatite fulminante	-	4 (6,2%)
Hepatocarcinoma	-	3 (4,6%)
Não esclarecidas	4 (3,2%)	14 (21,8%)
<i>Nash</i>	3 (2,4%)	1 (1,5%)
Outras	14 (11,1%)	8 (12,5%)
Síndrome de Budd-Chiari	2 (1,6%)	-

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

Foi realizada a coleta de *swabs* de 64 pacientes transplantados hepáticos, sendo que 2 (3,1%) destes pacientes foram submetidos ao

retransplante hepático. De um total de 62 pacientes transplantados analisados (primeiro transplante), 48 (77,4%) não apresentaram nenhum tipo de infecção de sítio cirúrgico. Entretanto, 13 (21,0%) destes pacientes apresentaram infecção do sítio cirúrgico órgão e espaço (SCOE) e apenas um (1,6%) apresentou infecção de sítio cirúrgico incisional superficial (SCIS). Nenhum dos pacientes estudados apresentou infecção de sítio cirúrgico incisional profundo (SCIP). Os diferentes dados coletados dos pacientes submetidos a transplante hepático estão representados na tabela 5.

Tabela 5 - Dados coletados dos 64 pacientes submetidos a transplante hepático no Hospital da Clínicas da FMUSP, no período de 2010 a 2012

Dados coletados	Número de pacientes (n=64)
Número de transplantes	64
realizados em 2010	15
realizados em 2011	47
realizados em 2012	2
Tipos de transplante	
Intervivos	7
Doador cadáver	48
Retransplante	2
Sem informação	7
Número de pacientes com infecção do sítio cirúrgico	15
Infecção de sítio cirúrgico incisional superficial (SCIS)	1
Infecção de sítio cirúrgico incisional profundo (SCIP)	0
Infecção de sítio cirúrgico órgão e espaço (SCOE)	14*
Infecção do Trato Urinário Sintomática (ITUS)	1
Infecção do Trato Urinário Assintomática (ITUA)	0
Infecção da Corrente Sanguínea**	1
Pneumonia***	1
Número de pacientes colonizados por MRSA	11
Positividade em cultura microbiológica	1
Positividade na PCR direta (gene <i>coA</i> e <i>mecA</i> positivos)	11

* Um paciente era retransplante; ** Isolamento de *Serratia marcescens*; *** Isolamento de MRSA;

No presente estudo, foi possível isolar apenas 6 isolados de MRSA de diferentes amostras clínicas. Alguns dados destes isolados estão descritos na tabela 6.

Tabela 6 - Dados dos 6 isolados clínicos de MRSA obtidos de 5 pacientes transplantados hepáticos com infecção clínica identificados no período no Hospital das Clínicas no período do estudo de 2010 a 2012

Número do isolado	Iniciais do paciente	Data da coleta	Material clínico	Tempo de internação pós-Tx (dias)	Desfecho
IS1	AMB	11/07/2011	Secreção traqueal	40	Óbito
IS2	KYK	08/04/2011	Secreção traqueal	60	Alta
IS3	ER	22/12/2010	Líquido ascético	13	Óbito
IS4	HPR	05/05/2011	Cateter venoso	60	Alta
IS5	RH	06/08/2011	Sangue via cateter	0	Óbito
IS6	RH	06/08/2011	Sangue periférico	0	Óbito

Tx: Transplante

Do total de 5 pacientes com infecção clínica, foi possível acompanhar apenas 60% (3/5) destes pacientes no período pós-transplante. Este fato pode ser explicado pois um dos pacientes foi a óbito após o procedimento cirúrgico (paciente RH) e o outro (paciente ER) não apresentou condições clínicas favoráveis para a coleta das amostras, vindo a falecer após 13 dias de internação após a cirurgia.

4.2 Colonização por MRSA

A coleta dos *swabs* inguinais foi incluída após o início do estudo, com intuito de aumentar a sensibilidade das culturas microbiológicas. Com isso, totalizamos 316 *swabs* inguinais coletados, sendo 190 *swabs* obtidos de 126

pacientes de lista de espera e 126 *swabs* deste mesmo sítio de 63 pacientes transplantados. Durante o período de coleta dos pacientes transplantados, não foi possível realizar a coleta inguinal de um paciente e a coleta nasal de outro paciente em virtude do uso de sonda e condição clínica de cada paciente. O número total de *swabs* coletados de todos os pacientes submetidos à análise microbiológica (cultura) e análise molecular (pesquisa direta por PCR de genes específicos, *coA* e *mecA*) está representado na figura 1.

Figura 1 - Número total de *swabs* coletados de pacientes hepatopatas e transplantados hepáticos submetidos à cultura microbiológica e detecção direta por PCR de DNA bacteriano no Hospital das Clínicas - FMUSP, no período do estudo de 2010 a 2012.

Dos 126 pacientes de lista analisados, 38 (30,2%) *swabs* nasais apresentaram crescimento para *S. aureus*, sendo que em apenas 15 (39,5%) *swabs* foram isolados MRSA, confirmados pelo método de triagem para resistência a oxacilina. Já os 95 *swabs* inguinais coletados destes mesmos pacientes apresentaram positividade de 8,4% (8/95) para MRSA. Para os 64 pacientes transplantados, 14 (22,2%) tiveram cultura positiva para MRSA em sítio nasal e 6 (9,5%) pacientes apresentaram positividade para este micro-organismo resistente em região inguinal. Todos os resultados obtidos nas

culturas microbiológicas dos pacientes de lista e dos transplantados constam na tabela 7.

Tabela 7 - Resultados das culturas bacteriológicas obtidas dos 190 de pacientes hepatopatas e transplantados hepáticos avaliados no Hospital das Clínicas da FMUSP no período do estudo de 2010 a 2012

Resultados da cultura*	Pacientes hepatopatas		Pacientes transplantados	
	Swabs nasais	Swabs inguinais	Swabs nasais	Swabs inguinais
Positiva para MRSA	15 (11,9%)	8 (8,4%)	14 (22,2%)	6 (9,5%)
Positiva para MSSA	23 (18,3%)	8 (8,4%)	0 (0%)	1 (1,6%)
Positiva para <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativos	59 (46,8%)	51 (53,7%)	11 (17,5%)	14 (22,2%)
Positiva para outros micro-organismos	29 (23,0%)	27 (28,4%)	37 (58,7%)	41 (65,1%)
Cultura sem crescimento bacteriano	0 (0%)	1 (1,1%)	1 (1,6%)	0 (0%)
Total	126 (100%)	95 (100%)	63 (100%)	63 (100%)

*subcultura em Agar manitol; ** Material não coletado: sítio de coleta incluído posteriormente ao início do estudo

Tx = transplante; MRSA = *Meticillin-resistant Staphylococcus aureus*; MSSA = *Meticillin-susceptible Staphylococcus aureus*

Os resultados das culturas mostram que 72,7% (16/22) dos pacientes transplantados apresentaram cultura positiva para MRSA logo no primeiro período pós-transplante. A quantidade de coletas realizadas no presente estudo, bem como a positividade das culturas microbiológicas, pode ser observada na tabela 8.

Tabela 8 - Número de coletas e positividade das culturas de amostras nasais e inguinais de pacientes submetidos a transplante de fígado no Hospital das Clínicas durante o período de 2010 a 2012

Número de coletas	Número de pacientes	Número de pacientes com culturas positivas para MRSA	Número da primeira coleta em que houve positividade							
			1ª	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª	7ª	8ª
1	27	8	8	-	-	-	-	-	-	-
2	7	1	1	-	-	-	-	-	-	-
3	11	5	2	1	2	-	-	-	-	-
4	8	4	3	1	-	-	-	-	-	-
5	4	2	2	-	-	-	-	-	-	-
6	2	0	-	-	-	-	-	-	-	-
7	3	2	-	1*	-	1	-	-	-	-
8	2	0	-	-	-	-	-	-	-	-
Total	64	22	16	3	2	1	-	-	-	-

* Paciente com cultura positiva para MRSA apenas em amostra inguinal

Foram obtidos, durante o estudo de colonização, 23 isolados MRSA obtidos de 17 pacientes hepatopatas. Nos 22 pacientes transplantados analisados, o número total de isolados MRSA foi 40. Assim, o presente estudo analisou 63 isolados de colonização e 6 isolados clínicos (de infecção), totalizando 69 isolados de MRSA.

Dentre os 63 isolados de colonização, 43 (68,3%) MRSA foram isolados de sítio nasal e 20 (31,7%) de sítio inguinal. Do total de 40 isolados MRSA obtidos dos pacientes transplantados, 21 (52,5%) isolados MRSA foram obtidos no primeiro período pós-operatório e os outros 19 isolados MRSA foram obtidos em coletas posteriores, sendo 11 em segunda coleta, 4 em terceira coleta e os outros 4 em quarta coleta. Em 4 amostras coletadas de pacientes transplantados (3 swabs nasais e 1 swab inguinal), houve crescimento de 2 isolados de MRSA por amostra. Assim, dentre os 69 isolados de MRSA, 8 (11.6%) foram provenientes de 4 amostras clínicas distintas, onde os isolados foram caracterizados como colônia A e colônia B.

Do total de 5 pacientes com infecção clínica, 60% (3/5) apresentaram culturas microbiológicas positivas, ou seja, estavam colonizados por MRSA no período pós-transplante.

Um total de 221 amostras de DNA, obtidas a partir de *swabs* nasais (126) e inguinais (95) de pacientes hepatopatas, foi submetido à amplificação para gene 16S RNAr e apenas 4 (1,6%) não apresentaram positividade para esta reação. As reações para estas 4 amostras foram repetidas com outros *primers* (descritos no item 3.4.7) e realmente não houve positividade na amplificação do gene 16SRNAr. Por tratar-se de uma região conservada do material genético de toda bactéria, é possível que a não amplificação deste gene, nessas três amostras, tenha sido ocasionada por um problema na extração do DNA. Outra possibilidade seria o uso prévio de algum agente antisséptico pelo paciente antes da realização da coleta destas amostras.

A detecção do gene 16S RNAr para a maioria das amostras foi observada pela amplificação de um produto de 1.499bp, conforme ilustrado na figura 2.

Figura 2 – Foto de PCR de amostra clínica do gene 16S RNAr
Coluna 1: Peso molecular (100bp); Colunas 2 a 6: amostras de *swabs* nasais positivas para gene 16S; Coluna 3: controle negativo da reação

Para detecção do gene *mecA* e, simultaneamente, do gene coagulase (*coA*), foi realizado PCR *multiplex* de todas 221 amostras de *swabs* (nasais e inguinais), inclusive das amostras que se apresentaram negativas para amplificação do gene 16S RNAr.

Ambos os genes foram detectados em 87 *swabs* de pacientes de lista, sendo que somente 15 (17,3%) destes *swabs* apresentaram positividade na cultura microbiológica para MRSA. De um total de 111 culturas negativas para MRSA destes pacientes, 65,8% (73/111) foram positivas para detecção do gene *mecA* (Figura 3). Os resultados das culturas e das PCRs foram comparados e descritos na tabela 9.

Tabela 9 - Comparação entre os resultados das culturas dos *swabs* nasais e amplificações dos genes 16S RNAr, *coA* e *mecA* dos 126 pacientes de lista de espera do transplante hepático avaliados no Hospital das Clínicas no período do estudo, 2010 a 2012

PCR	Pacientes de lista de espera					
	Cultura de <i>swab</i> nasal (126 <i>swabs</i>)			Cultura de <i>swab</i> inguinal (95 <i>swabs</i>)		
	Positiva para MRSA (n=15)	Positiva para MSSA (n= 23)	Outras bactérias** (n=88)	Positiva para MRSA (n=8)	Positiva para MSSA (n=8)	Outras bactérias** (n=79)
Positiva gene 16S RNAr	15 (100%)	23 (100%)	85 (97,3%)	8 (100%)	8 (100%)	78 (98,7%)
Negativa gene 16S RNAr	0 (0%)	0 (0%)	3 (2,7%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (1,3%)
Positiva genes <i>coA</i> e <i>mecA</i>	15 (100%)	17 (74%)	55 (62,5%)	7 (8,5%)	6 (75%)	58 (73,4%)
Negativa genes <i>coA</i> e <i>mecA</i>	0 (0%)	1 (4,3%)	11 (12, 5%)	(0%)	0 (0%)	10 (12,6%)
Positiva somente gene <i>mecA</i>	0 (0%)	0(0%)	1 (1,1%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Positiva somente gene <i>coA</i>	0 (0%)	5 (21,7%)	21 (23,9%)	1 (12,5%)	2 (25%)	11 (14%)

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

Figura 3 – Foto de PCR para detecção dos genes *coA* (117bp) e *mecA* (214bp). 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

Em relação aos 63 *swabs* coletados de 64 pacientes transplantados, apenas um (1,6%) dos *swabs* nasais e um (1,6%) dos *swabs* inguinais analisados apresentaram positividade para MRSA em cultura e pesquisa negativa para 16S RNAr (Tabela 10).

Tabela 10 - Comparação entre os resultados das culturas dos *swabs* nasais e amplificações dos genes 16S RNAr, *coA* e *mecA* dos 64 pacientes transplantados hepáticos avaliados no Hospital das Clínicas, no período do estudo, 2010 a 2012

	Pacientes Transplantados					
	Cultura de <i>swab</i> nasal (63)*			Cultura de <i>swab</i> inguinal (63)*		
	Positiva para MRSA (n=14)	Positiva para MSSA (n=0)	Outras bactérias** (n=49)	Positiva para MRSA (n=6)	Positiva para MSSA (n=1)	Outras bactérias** (n=56)
PCR						
Positiva gene 16S RNAr	14 (100%)	0 (0%)	48 (100%)	6(100%)	1(100%)	55 (98,2%)
Negativa gene 16S RNAr	0 (0%)	0 (0%)	1 (0%)	0(0%)	0(0%)	1 (1,8%)
Positiva genes <i>coA</i> e <i>mecA</i>	14 (100%)	0 (0%)	31 (63,3%)	6 (100%)	1(100%)	35 (62,6%)
Negativa genes <i>coA</i> e <i>mecA</i>	0 (0%)	0 (0%)	5 (10,2%)	0 (0%)	0 (0%)	4 (7,1%)
Positiva somente gene <i>mecA</i>	0 (0%)	0 (0%)	2 (4,1%)	0 (0%)	0 (0%)	4 (7,1%)
Positiva somente gene <i>coA</i>	0 (0%)	0 (0%)	11 (22,5%)	0 (0%)	0 (0%)	13 (23,2%)

* Foram coletados 14 *swabs* inguinais destes pacientes

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

Os *swabs* nasais e inguinais coletados dos pacientes hepatopatas (lista de espera) que apresentaram amplificação por PCR dos genes *coA* e *mecA*, considerados então como MRSA, foram submetidos a caracterização do tipo *SCCmec*. Foram coletados 221 *swabs* dos quais 158 apresentaram positividade para os genes *coA* e *mecA*, sendo 87 (55,1%) nasais e 71 (44,9%) inguinais. Deste total de 158 *swabs* positivos, 92 (58,2%) foram caracterizados com sucesso quanto ao tipo de *SCCmec*. As reações de PCR foram realizadas inicialmente de acordo com o protocolo proposto por Zhang et al. (2005) e somente as amostras que apresentaram mais de uma banda na amplificação ou que não foram amplificadas por este método, foram submetidas a caracterização de *SCCmec* por outra metodologia (Oliveira et al. 2002a). Deste total de 92 amostras caracterizadas, apenas uma apresentou dificuldade de determinação do tipo de *SCCmec* pela metodologia de Zhang et al. (2005),

mas foi determinada como sendo do tipo I por PCR proposta por Oliveira et al. (2002a).

Assim, um total de 41,8% (66/158) *swabs* foi submetido à amplificação por ambas as reações de PCR, sendo que 41 amostras apresentaram amplificação para mais de um tipo de *SCCmec* (amplificação inespecífica) e 25 não foram amplificadas por nenhuma destas reações. Os tipos de *SCCmec* evidenciados nesta análise foram 42,3% do tipo II, 20,6% do tipo I, 16,3% do tipo III e 17,4% do tipo IVa.

Dentre os pacientes submetidos a transplante de fígado houve o predomínio de MRSA *SCCmec* tipo II, detectado em 34,5% (30/87) das amostras. Neste grupo de pacientes foi possível caracterizar a colonização de um paciente (1,6%; 1/64) por MRSA *SCCmec* tipo V, resultado este que foi concordante com os resultados fenotípicos (cultura microbiológica e caracterização do tipo de *SCCmec* do isolado obtido).

A determinação dos diversos tipos de *SCCmec* a partir das amostras clínicas coletadas para todos os pacientes avaliados neste estudo pode ser observada na tabela 11.

Tabela 11 - Distribuição dos tipos de SCCmec caracterizados diretamente em *swabs* nasais e inguinais coletados de 190 pacientes (126 hepatopatas e 64 transplantados hepáticos) avaliados no Hospital da Clinicas-FMUSP, no período do estudo, 2010 a 2012

Tipos de SCCmec	Swabs de pacientes	swabs de pacientes
	hepatopatas	transplantados
	<i>coA/ mecA</i> positivos (158 swabs)	<i>coA/ mecA</i> positivos (87 swabs)
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 (8,1%)
Tipo IVb	2 (1,3%)	-
Tipo IVc	1 (0,7%)	-
Tipo IVd	-	-
Tipo V	-	1 (1,1%)
Indefinido*	41 (25,9%)	22 (25,3%)
Não caracterizado**	25 (15,8%)	7 (8,1%)
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., 2002a)

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

O presente estudo demonstrou que 20,5% (39/190 pacientes) pacientes estavam colonizados com MRSA pelo método de cultura e esta taxa de colonização aumentou para 82,1% (156/190) quando foi realizada a detecção direta por PCR das amostras de *swabs*.

4.3 Infecção de sítio cirúrgico (ISC)

Dos 15 pacientes com infecção de sítio cirúrgico (transplantados e retransplantados), apenas um mostrou-se positivo para isolamento de MRSA em cultura microbiológica. Este mesmo paciente também apresentou amplificação dos genes específicos de MRSA (gene *coA* e gene *mecA*) nas

reações de PCR feitas diretamente das amostras de *swabs* nasais e inguinais coletadas.

Ao analisar a positividade das reações de PCR para as amostras clínicas de pacientes com ISC, observou-se que 8 (53,3%) pacientes apresentaram amplificação dos genes específicos em ambos os sítios coletados e apenas 6,7% (1/15) apresentaram PCR positiva somente em amostra de sítio inguinal. Foi observado também que 2 amostras obtidas de um mesmo paciente em momentos diferentes (primeiro transplante e retransplante) apresentaram positividade em PCR para ambos os genes somente em amostras nasais.

Deste total de pacientes com ISC avaliados, apenas um (6,7%) apresentou positividade em PCR somente para gene *coA* e outro positividade somente para gene *mecA*, tanto em *swabs* de sítio nasal como inguinal.

A coleta de dados realizada neste estudo, evidenciou que apenas um (1,6%) paciente apresentou pneumonia por MRSA, sendo que este mesmo paciente teve isolamento deste micro-organismo em cultura de colonização após o transplante e seu isolado clínico foi recuperado em amostra de secreção traqueal. Ambos os isolados MRSA apresentaram o perfil A (*cluster* A; *cluster* predominante) na análise molecular feita por PFGE.

Do total de pacientes com infecção de sítio cirúrgico, apenas 6,7% (1/15) apresentou infecção de SCIS sem isolamento do agente infeccioso em cultura bacteriológica. Entretanto, este paciente evidenciou positividade nas reações de PCR a partir de amostra inguinal para genes *coA* e *mecA* e para a amostra de secreção nasal foi detectado apenas o gene *coA*.

Em relação aos aspectos microbiológicos, não foi isolado nenhum MRSA de infecção de sítio cirúrgico. Dos 15 pacientes que apresentaram ISC, 80% (12/15) tiveram isolamento do agente infeccioso em cultura microbiológica. Os principais agentes infecciosos isolados de pacientes com infecção de SCOE e SCIS podem ser observados na tabela 12.

Tabela 12 – Principais agentes infecciosos isolados de infecção de SCOE de 12 pacientes transplantados hepáticos internados no Hospital das Clínicas FMUSP, no período do estudo, 2010 a 2012

Iniciais do pacientes	Micro-organismo(s) isolado(s)
AJB	<i>E. faecium</i> (VRE)
AAL	<i>K. pneumoniae</i>
ALBC	<i>E. coli</i> , <i>E. faecium</i> , <i>C. glabrata</i>
AJOS	<i>A. baumannii</i> (MDR)
DMSC	<i>A. baumannii</i> (MDR)
HPR	<i>A. baumannii</i> (MDR), <i>K. pneumoniae</i> , <i>E. faecium</i> (VRE)
JAS	<i>C. parapsilosis</i>
LCN	<i>E. faecalis</i> , <i>C. krusei</i>
ODL	<i>A. baumannii</i> (MDR), <i>M. morganii</i>
RMB	<i>A. baumannii</i> (MDR)
SCPC	<i>E. faecium</i> , <i>K. pneumoniae</i>
WRB	<i>E. faecium</i>

MDR: *Multi Drug Resistant* (micro-organismo multirresistente); VRE: *Vancomycin-Resistant-Enterococcus*

4.4 Estudo dos isolados de MRSA

Dos 69 isolados de MRSA, submetidos à pesquisa fenotípica da presença do gene *erm* pelo D-teste, nenhum mostrou a presença de zona de achatamento nos testes de disco-difusão por aproximação de disco de clindamicina e eritromicina.

Os 69 isolados MRSA analisados pelo método de microdiluição mostraram-se resistentes a oxacilina, com valores de CIM₅₀ e CIM₉₀ de >64,0 µg/mL. Em relação à vancomicina, todos os isolados testados apresentaram sensibilidade com CIM₅₀ e CIM₉₀ igual a 1,0 µg/mL. Os resultados das CIMs obtidas para os outros antimicrobianos testados estão descritos na Tabela 13.

Tabela 13 - Atividade antimicrobiana de 69 isolados MRSA de pacientes hepatopatas e transplantados hepáticos acompanhados no Hospital das Clínicas da FMUSP, no período do estudo, 2010 a 2012

Antimicrobiano	CIM ₅₀ *	CIM ₉₀ *	Intervalo*	% Susceptibilidade
Ciprofloxacina	32,0	>64,0	0,25 - >64,0	18,9
Cloranfenicol	4,0	32,0	1,0 - 32,0	79,7
Clindamicina	>32,0	>32,0	≤0,06 - >32,0	21,7
Eritromicina	>32,0	>32,0	0,25 - >32,0	10,1
Gentamicina	1,0	>32,0	≤0,06 - >32,0	56,5
Oxacilina	>64,0	>64,0	32,0 - >64,0	0
Penicilina	>32,0	>32,0	16,0 - >32,0	0
Sulfametoxazol-trimetoprim	<0,25	16,0	<0,25 - 128,0	82,6
Tetraciclina	0,25	32,0	≤0,06 - >32,0	84,0
Vancomicina	1,0	1,0	0,5-1,0	100

*Valores de CIM são expressos em µg/mL

Os 69 isolados de MRSA obtidos das culturas microbiológicas foram analisados tanto fenotipicamente como genotipicamente. Dos 63 isolados MRSA de colonização, todos apresentaram presença tanto o gene *coA* quanto o gene *mecA* e todos foram caracterizados quanto ao tipo de *SCCmec* (Zhang et al. 2005). Entre estes isolados, 14 (22,2%) foram definidos como *SCCmec* tipo I, 27 (42,9%) como *SCCmec* tipo II, 13 (20,6%) como *SCCmec* tipo III, 8 (12,7%) como *SCCmec* tipo IVa e apenas um (1,6%) *SCCmec* tipo V. Os 6 isolados clínicos obtidos neste estudo também foram caracterizados conforme o tipo de *SCCmec* e todos foram positivos por PCR para os genes *coA* e *mecA*. Em relação aos tipos de *SCCmec*, 2 (33,3%) destes isolados foram do tipo II, um do tipo III (16,7%), 2 (33,3%) do tipo IV e 1 (16,7%) do tipo IVa. A distribuição dos tipos de *SCCmec* para pacientes hepatopatas (pré-TX) e transplantados (pós-TX) pode ser observada na figura 4.

Figura 4 – Distribuição dos tipos de SCCmec dos 69 isolados de MRSA obtidos de pacientes hepatopatas e transplantados hepáticos, acompanhados no Hospital das Clínicas da FMUSP, no período do estudo, 2010 a 2012

Os isolados com SCCmec do tipo II foram provenientes de 11 pacientes de lista de espera distintos, 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, portanto 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., 2002a).

Na figura 5 podem ser observados os perfis SCCmec apresentados por alguns dos isolados de MRSA.

Figura 5 – Foto da PCR *multiplex* para determinação do tipo de *SCCmec* em amostras de MRSA isolados na em pacientes de lista e transplantados hepáticos

PM: marcador de peso molecular de 100-bp (Invitrogen®); **Colunas 2 a 16: pacientes de lista de espera.** Coluna 1, 2, 3, 4, 7, 11, 12 e 15: *SCCmec* tipo II; Colunas 5, 6, 9, 10 e 16: *SCCmec* tipo IVa; Colunas 8, 13, 14: *SCCmec* tipo I; **Colunas 17 a 20: pacientes submetidos ao transplante.** Coluna 17: *SCCmec* tipo II; Colunas 18: *SCCmec* tipo V; Coluna 19 e 20: *SCCmec* tipo I; 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

Para os seis isolados de MRSA, obtidos a partir de amostras de pacientes com infecção clínica, foi evidenciado a presença de diferentes perfis de susceptibilidade, tipos de *SCCmec* e perfis eletroforéticos caracterizados por PFGE (Tabela 14). Deste total, dois isolados (IS5 e IS6) foram provenientes do mesmo paciente e ambos mostraram as mesmas características fenotípicas e genotípicas. Estes isolados foram então caracterizados como idênticos pois apresentaram mesmo perfil de sensibilidade, mesmo tipo de cassete cromossômico e mesmo perfil molecular por PFGE.

Tabela 14 - Perfil de susceptibilidade e dos 5 isolados clínicos MRSA (de diferentes tipos de *SCCmec* e perfis moleculares) de pacientes transplantados hepáticos com infecção clínica acompanhados no Hospital das Clínicas da FMUSP, no período do estudo, 2010 a 2012

Antimicrobiano	IS1	IS2	IS3	IS4	IS5
	<i>SCCmec</i> tipo III	<i>SCCmec</i> tipo II	<i>SCCmec</i> tipo IVa	<i>SCCmec</i> tipo II	<i>SCCmec</i> tipo IVa
	PFGE clone K	PFGE clone A	PFGE clone H1	PFGE clone A1	PFGE clone M
Ciprofloxacina	32,0	>64,0	0,5	>64,0	0,25
Cloranfenicol	32,0	4,0	4,0	4,0	2,0
Clindamicina	>32,0	>32,0	32,0	>32,0	≤0,06
Eritromicina	>32,0	>32,0	16,0	>32,0	0,25
Gentamicina	>32,0	0,5	0,5	0,5	0,5
Oxacilina	>64,0	>64,0	32,0	>64,0	>64,0
Penicilina	>32,0	>32,0	32,0	>32,0	>32,0
Sulfametoxazol-trimetoprim	16,0	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25
Tetraciclina	32,0	≤0,06	32,0	0,5	≤0,06
Vancomicina	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

IS1= paciente AMB; IS2= paciente KYK; IS3= paciente ER; IS4= paciente HPR; IS5=IS6=RH

*Valores de CIM são expressos em µg/mL

Em relação aos genes de virulência detectados por PCR qualitativa, podemos observar que nenhum *Staphylococcus aureus* isolado mostrou-se positivo para gene codificador da proteína *Panton-Valentine Leukocidin* (PVL). Entretanto, foi detectada a presença do gene *tst* (codificador para proteína da toxina da síndrome do choque tóxico) em 4 (6,3%) dos 63 isolados de MRSA de colonização, sendo todos *SCCmec* tipo I. Um destes isolados foi proveniente de paciente ambulatorial e os demais pacientes transplantados hepáticos que estavam hospitalizados.

A pesquisa de genes relacionados à virulência dos 63 isolados revelou que algumas cepas apresentaram alguns fatores de virulência, como presença

de genes codificadores para produção de toxina do choque tóxico (gene *tst*), leucocidina *lukDE*, proteína ligadora de fibronectina (gene *fnbA*) e *Clumping factor* (gene *clf*).

Os resultados obtidos das reações de PCR para os diferentes genes de virulência podem ser evidenciados na tabela 15.

Tabela 15 - Distribuição de diferentes genes (estruturais, resistência e virulência), tipos de *SCCmec* para os 69 isolados de MRSA

Número de isolados com PCRs positivas para diferentes genes								
Isolados MRSA (colonização)	gene	gene <i>tst</i>	gene <i>lukDE</i>	gene <i>eta</i>	gene <i>etb</i>	gene <i>clf</i>	gene <i>fib</i>	gene <i>fnbA</i>
Transplantados (n=40)	0	1	35	0	0	38	0	38
Lista de espera de transplante (n=23)	0	3	21	0	0	20	0	20
Isolados clínicos (n=6)	0	0	6	0	0	6	0	4
Total de positivos	0	4	62	0	0	64	0	62
Total de negativos	69	65	7	69	69	5	69	7

O estudo dos genes de virulência mostrou que nenhum dos 63 isolados de colonização apresentou a presença de genes *fib*, genes de adesão codificadores para proteína ligadora de fibrinogênio (gene *fib*). Os genes responsáveis por produção de esfoliatinas A e B (gene *eta* e *etb*) também não foram detectados nestes isolados de MRSA por esta metodologia.

Em relação aos genes de virulência detectados nos seis isolados de infecção de MRSA, pode-se observar que todos estes isolados apresentaram gene *lukDE* e gene *clf*. Entretanto 4 (66,7%) isolados clínicos apresentaram positividade para os genes codificadores de proteína ligadora de fibronectina (gene *fnbA*), de leucocidinas D e E (gene *lukDE*) e *Clumping factor* (gene *clf*).

As reações de amplificação dos genes codificadores para as toxinas PVL, TSST e leucocidina *lukDE* estão ilustradas na figura 6 e os resultados das PCRs de alguns isolados de MRSA podem ser evidenciados na Figura 7.

Figura 6 – Foto da PCR para detecção dos genes de virulência (*Panton-Valentine* Leucocidina – PVL; Toxina da Síndrome do Choque Tóxico – TSST; Leucocidinas D e E).

PM: peso molecular 100 bp (InVitrogen, USA); Colunas 1 a 5, 8 e 9: isolados positivos para *lukDE*; Coluna 6: isolado negativo para estes genes; Coluna 7: isolado positivo para genes *lukDE* e *tst*; Colunas 10, 11 e 12: controles negativos

Figura 7 – Foto da PCR para detecção dos genes de virulência (genes *clf*, *fib*, *fnbA*, *eta* e *etb*)

PM: peso molecular 100bp (InVitrogen, USA); Colunas 1 a 4, 7 e 8, 10 a 17, 19 a 22: isolados positivos para genes *clf* e *fnbA*; Colunas 5, 6, 9 e 18: isolados negativos para estes genes; Colunas 23 a 25: controles negativos

Os 69 isolados de MRSA foram submetidos à eletroforese de campo pulsado e agrupados de acordo com sua origem (pacientes de onde foram isolados) e conforme virulência. Analisando-se visualmente os perfis de DNA gerados por PFGE, foi evidenciada a presença de um perfil predominante em 36,2% (25/69) isolados, denominado de perfil A (Figura 8). Este perfil foi encontrado tanto em isolados MRSA de pacientes hepatopatas como nos isolados de pacientes transplantados.

Figura 8 – Foto de PFGE da representação do perfil molecular predominante (perfil A) dos isolados de MRSA

PM: Marcador de peso molecular (*Lambda Ladder PFG Marker*[®], New England Biolabs); Colunas 1 a 8: isolados MRSA com perfil A, Coluna 19: Variante pertencente ao Clone Endêmico Brasileiro (BEC 79, coleção FCF-USP); Coluna 20: Variante pertencente ao Clone Endêmico Brasileiro (HSJ216)

A análise da diversidade genética analisada pela clivagem cromossomal seguida de eletroforese em campo pulsado (PFGE) permitiu a identificação de 7 agrupamentos de isolados de MRSA com similaridade $\geq 80\%$, definidos como *clusters* (*clusters* A a F).

Entre os 23 isolados de pacientes pré-transplante, a análise filogenética por dendrograma identificou 10 (43,5%) isolados pertencentes ao *cluster* A (perfis A1 a A5) e entre estes isolados houve o predomínio de *SCCmec* tipo II

(90%; 9/10). Dentre os isolados provenientes de pacientes transplantados foi observado a presença do *cluster* A em 32,5% (13/40) sendo o cassete cromossômico tipo II evidenciado em 61,5% (8/13) dos isolados pertencentes a este mesmo *cluster*. Apenas um isolado pertencente a este *cluster* (com perfil A5) foi caracterizado como *SCCmec* tipo III.

Em relação à virulência dos isolados pertencentes ao *cluster* A, todos apresentaram um perfil comum para os genes pesquisados por PCR qualitativa com positividade para os genes *lukDE*, *clf* e *fnbA*. Este perfil de virulência foi definido como Perfil 1 (P1). A distribuição dos diferentes perfis eletroforéticos, tipos de *SCCmec* e perfis de virulência pode ser observada na Figura 9.

Figura 9 - Dendrograma criado a partir dos diferentes perfis eletroforéticos gerados por PFGE de 69 isolados de MRSA (coeficiente de similaridade de Dice, otimização de 0,5%, tolerância de 1,5%; método de *clusterização*: UPGMA)

1 O valor de *cutt-off* para definir perfis e *clusters* de PFGE foi fixado em 80% de similaridade

2 Perfil de genes de virulência detectados pelo método qualitativo PCR - Perfil 1 (P1) = genes *lukDE*, *clf* e *fnbA* positivos; Perfil 2 (P2) = genes *tst*, *lukDE*, *clf* e *fnbA* positivos; Perfil 3 (P3) = genes *tst*, *clf* e *fnbA* positivos; Perfil 4 (P4) = genes *clf* e *fnbA* positivos; Perfil 5 (P5) = genes *lukDE* e *clf* positivos; Perfil 6 (P6) = somente *lukDE* positivo; Perfil 7 (P7) = nenhum gene de virulência pesquisado foi detectado

3 PE = isolado de paciente de lista de espera (pré-transplante); PO = isolado de paciente transplantado (pós-transplante); CI = isolado clínico (paciente com infecção)

Dos quatro isolados de MRSA com gene *tst* positivos, observamos que 3 (75%) apresentaram poucas diferenças na análise filogenética (perfis de PFGE D, D1 e D2) mas todos incluídos num mesmo agrupamento (*cluster* D). Estes 3 isolados foram determinados como *SCCmec* tipo I.

Os diversos perfis moleculares obtidos neste estudo foram comparados com os clones endêmicos BK2464 (clone NY/Japão; *SCCmec* Tipo II) e HSJ216 (clone endêmico brasileiro BEC; *SCCmec* tipo III). A análise por dendrograma revelou que isolados pertencentes ao *cluster* A estão relacionados ao clone BK2464 e oito isolados do *cluster* F estão relacionados ao clone BEC HSJ216.

Dos 64 pacientes submetidos a transplante hepáticos, apenas 4,7% (3/64) pacientes tiveram isolados clínicos de colonização (pós-transplante) e infecção.

Os isolados clínicos destes pacientes e seus isolados de colonização foram analisados molecularmente e foi determinada a presença de dois a três perfis de PFGE distintos para cada paciente.

Além disso, o presente estudo evidenciou que isolados de MRSA do mesmo paciente, além de apresentar perfis moleculares distintos, apresentaram também diferenças em sua virulência. Neste mesmo paciente foi evidenciado diferentes tipos de *SCCmec* pertencentes ao mesmo perfil de PFGE (F1).

Além disso, observou-se que de uma mesma cultura microbiológica foi possível isolar mais de uma colônia de MRSA, com diferente perfil molecular e diferente tipo de *SCCmec*. Os perfis moleculares e de virulência também mostraram diferenças entre estas colônias (tabela 16).

Tabela 16 - Análise molecular (tipagem do SCCmec e PFGE) de 3 pacientes com isolados de colonização e infecção clínica acompanhados no Hospital das Clínicas da FMUSP, no período do estudo, 2010 a 2012

Isolado MRSA/descrição	Paciente	Origem do isolado	Tipo de SCCmec	Perfil de PFGE	Perfil de virulência
AMB	AMB	Clínico	tipo III	K	<i>lukDE, clfB, fnbA</i>
P39NB	AMB	Colonização (pós-TX)	tipo III	F1	<i>lukDE, clfB, fnbA</i>
P39NC	AMB	Colonização (pós-TX)	tipo I	D1	<i>tst, clfB, fnbA</i>
P39N-2A	AMB	Colonização (pós-TX)	tipo III	F1	<i>lukDE, clfB, fnbA</i>
P39N-2B	AMB	Colonização (pós-TX)	tipo I	F1	<i>tst, clfB, fnbA</i>
517	HPR	Clínico	tipo II	A1	<i>lukDE, clfB, fnbA</i>
P26N	HPR	Colonização (pós-TX)	tipo II	A1	<i>lukDE, clfB, fnbA</i>
P26N-2	HPR	Colonização (pós-TX)	tipo II	L	<i>lukDE, clfB, fnbA</i>
KAREN	KYK	Clínico	tipo II	A	<i>lukDE, clfB, fnbA</i>
P17I-2	KYK	Colonização (pós-TX)	tipo II	A	<i>lukDE, clfB, fnbA</i>
P17N-4A	KYK	Colonização (pós-TX)	tipo I	C1	<i>clfB, fnbA</i>
P17N-4B	KYK	Colonização (pós-TX)	tipo II	A	<i>lukDE, clfB, fnbA</i>

Tx: transplante

A técnica de microarranjo foi realizada para um total de 21 isolados obtidos a partir de 8 pacientes diferentes. Estes isolados foram selecionados de acordo com sua origem (mesmo paciente em diferentes momentos) e perfil de virulência (isolados com detecção do gene *tst*). Os grupos estudados por esta metodologia estão descritos anteriormente (no item 3.4.6).

Os resultados obtidos desta análise proporcionaram a geração de mapas de cores, onde o valor de r^2 (coeficiente de Pearson) foi convertido em uma escala de cores entre as amostras analisadas. Todos os grupos de amostras submetidos a esta análise mostraram valores de r^2 entre 0,8 e 1,0, indicando uma correlação fortemente positiva entre os isolados MRSA de cada grupo.

Os 21 isolados de MRSA, submetidos aos ensaios de microarranjo, foram agrupados hierarquicamente (*hierarchical clustering*) por meio de análise

da expressão de 100 sondas selecionadas de maneira não-supervisionada e com elevada variabilidade genética. Os resultados deste agrupamento foram muito semelhantes à análise filogenética feita por realização de dendrograma dos diferentes perfis de PFGE (Figura 10). O agrupamento hierárquico evidenciou 4 grupos com similaridade entre os isolados provenientes dos mesmos pacientes. O paciente ACJ (grupo 1) apresentou 5 isolados de colonização (2 isolados no período pré-transplante e 3 pós-transplante) e todos estavam relacionados entre si quando avaliados tanto pela *clusterização* hierárquica (microarranjo) como pelo dendrograma gerado por PFGE. Entretanto, outro paciente com 4 isolados de MRSA (3 de colonização pós-transplante e 1 isolado clínico; grupo 3) apresentou dois perfis de PFGE distintos (A e C1) e um agrupamento concordante com PFGE pela na análise de agrupamento hierárquico.

Além desta análise dos *clusters*, foi realizada uma análise da expressão dos principais genes de virulência e de aderência dos 21 isolados de MRSA. Os resultados obtidos após análise dos *arrays* foram planilhados em programa *Microsoft Excel* e os dados foram filtrados de acordo com principais genes de virulência previamente detectados por PCR qualitativa.

Esta planilha de dados normalizados forneceu uma série de resultados numéricos, os quais foram analisados de acordo com o grupo de sondas específicas para cada gene de interesse. Os genes de virulência e resistência avaliados, com seus respectivos genes e transcritos, estão identificados na tabela 17.

Figura 10 - Agrupamento hierárquico (*hierarchical clustering*) realizado utilizando uma seleção não-supervisionada de cem genes com elevada variabilidade gênica definida em ensaios de microarranjo

Tabela 17 - Lista dos genes de virulência e resistência detectados pela técnica de microarranjo em 21 isolados de MRSA obtidos de pacientes acompanhados no Hospital das Clínicas da FMUSP, no período de 2010 a 2012

Produtos	Nome dos genes	Função dos genes
Exoenzimas		
Coagulase	<i>coa</i>	Possível coagulação de tecidos do hospedeiro
Lipase	<i>geh</i>	Degradação hidrolítica de lipídios
Termonuclease/Nuclease estafilocócica	<i>nuc</i>	Degradação de ácidos nucleicos da célula do hospedeiro
Estafiloquinase (protease III)	<i>sak</i>	Proteólise de células do hospedeiro
Toxinas		
Esfoliatina A	<i>eta</i>	Proteólise de células do hospedeiro (toxinas tipo "epidermolisinas")
Esfoliatina B	<i>etb</i>	Proteólise de células do hospedeiro (toxinas tipo "epidermolisinas")
Aureolisina (zinco metaloproteinase)	<i>aur</i>	Proteólise de células do hospedeiro
δ -hemolisina	<i>hld</i>	Destruição de células sanguíneas e teciduais
γ -hemolisina (componentes)	<i>hlgA, hlgC, hlgB</i>	Destruição de células sanguíneas
α -hemolisina	<i>hly</i> (ou <i>hla</i>)	Destruição de células sanguíneas e teciduais
Hialuronidase	<i>hysA</i>	Degradação de ácido hialurônico das células do hospedeiro
Triacilglicerol lipase	<i>lip</i>	Degradação hidrolítica de lipídios
Leucotoxinas	<i>lukD, lukE</i>	Destruição de leucócitos do hospedeiro
Enterotoxina A	<i>sea</i>	Superantígeno
Enterotoxinas	<i>seg, sen, sei, sem, seo, sel, sek, sec3, yent2, yent1,</i>	Superantígeno
Enterotoxina P	<i>sep</i>	Superantígeno
Exotoxinas (prováveis)	<i>set6, set7, set8, set9, set10, set11, set12, set13, set14, set15</i>	Não esclarecida
Toxina da síndrome do choque tóxico (TSST- 1)	<i>tst</i>	Febre, choque e <i>rash</i> cutâneo

Continua

Tabela 17 - Lista dos genes de virulência e resistência detectados pela técnica de microarranjo em 21 isolados de MRSA obtidos de pacientes acompanhados no Hospital das Clínicas da FMUSP, no período do estudo, 2010 a 2012 (continuação)

Produtos	Nome dos genes	Função dos genes
Adesinas		
Proteínas ligadoras de fibrinogênio (proteínas Ser-Asp)	<i>clfA, clfB</i>	Adesão bacteriana às células do hospedeiro
Proteína ligadora de elastina	<i>ebpS</i>	Adesão bacteriana às células do hospedeiro
Proteínas ligadoras de fibronectina	<i>fnbB, fnbA</i>	Adesão bacteriana às células do hospedeiro
Proteínas ligadoras de fibrinogênio	<i>fib</i>	Adesão bacteriana às células do hospedeiro
Proteínas de adesão intercelular	<i>icaA, icaD, icaB, icaC, icaR</i>	Agregação celular em tecidos infectados
Proteínas do complexo de histocompatibilidade (PCH) classe II (proteínas tipo Map-w)	<i>map</i>	Adesão bacteriana às células do hospedeiro - proteína capaz de ligar-se à vitronectina, fibrinogênio e fibronectina
Proteínas ligadoras de fibrinogênio (proteínas Ser-Asp)	<i>sdrC, sdrD, sdrE</i>	Adesão bacteriana às células do hospedeiro
Outros fatores de virulência		
Proteínas envolvidas na síntese de polissacarídeo capsular	<i>capA-P</i>	Evasão do sistema imune
Transtransferase	<i>ispA</i>	Síntese de pigmento
S-ribosil homocisteína liase	<i>luxS</i>	Síntese de auto-indutor secretado pela bactéria e útil na comunicação entre células para metabolismo bacteriano e aumento da densidade bacteriana no meio ambiente
Proteína ligadora em imunoglobulina tipo IgG	<i>sbi</i>	Potencial desordem imunológica no hospedeiro
Proteína A	<i>spa</i>	Potencial desordem imunológica no hospedeiro

Continua

Tabela 17 - Lista dos genes de virulência e resistência detectados pela técnica de microarranjo em 21 isolados de MRSA obtidos de pacientes acompanhados no Hospital das Clínicas da FMUSP, no período do estudo, 2010 a 2012 (conclusão)

Produtos	Nome dos genes	Função dos genes
Genes de resistência		
Aminoglicosídeo adeniltransferase	<i>aadD</i>	Resistência a aminoglicosídeos
Estreptomicina 3-adenililtransferase (AAD-9)	<i>ant1-5</i>	Resistência bacteriana à estreptomicina e espectomicina
Dihidrofolato redutase	<i>dfrA</i>	Resistência ao trimetoprim
rRNA adenina N-6-metiltransferase	<i>ermA</i>	Resistência aos macrolídeos-lincosamidas-estreptogramina B
Proteína FosB	<i>fosB</i>	Resistência à fosfomicina
Mercúrio redutase	<i>merA</i>	Resistência ao mercúrio; responsável pela volatilização do mercúrio ($\text{Hg}^{2+} \rightarrow \text{Hg}^0$)
Metionina-sulfóxido redutase (MsrA 1)	<i>msrA</i>	Resistência aos macrolídeos-lincosamidas-estreptogramina B
Proteína para resistência à tetraciclina	<i>tetM</i>	Resistência a tetraciclina

Os resultados da expressão dos genes de virulência e resistência avaliados pelo ensaio do microarranjo para os 21 isolados de MRSA foram comparados com os resultados fenotípicos (teste de sensibilidade aos antimicrobianos) e genotípicos (determinação do tipo de *SCCmec*, perfis de PFGE e perfis de virulência por PCR qualitativo). Todos estes resultados podem ser observados na tabela 18.

Tabela 18 - Resultados fenotípicos e genotípicos de 21 isolados de MRSA avaliados pela técnica de microarranjo acompanhados no Hospital das Clínicas da FMUSP, no período do estudo, 2010 a 2012

Número/ descrição dos Isolados MRSA	Paciente	Origem dos isolados MRSA	Tipos de SCCmec	Perfis de PFGE	Genes de Virulência			Genes de resistência aos antimicrobianos		Teste de Sensibilidade (categoria)	
					Detectados por PCR	Genes de baixa expressão por microarranjo	Genes de alta expressão por microarranjo	Genes de baixa expressão por microarranjo	Genes de alta expressão por microarranjo	Sensível	Resistente
78I	ACJ	Colonização (pré-Tx)	tipo I	E	<i>lukDE, clfB, fnb</i>	Nenhum	Nenhum	Nenhum	Nenhum	VAN, SXT, TET, CLO	OXA, PEN, ERI, CLI, CIP, GEN
78N	ACJ	Colonização (pré-Tx)	tipo I	E	<i>lukDE, clfB, fnb</i>	<i>spa</i>	<i>set6</i>	Nenhum	Nenhum	VAN, SXT, TET, CLO	OXA, PEN, ERI, CLI, CIP, GEN
P19I	ACJ	Colonização (pós-Tx)	tipo I	E	<i>lukDE, clfB, fnb</i>	<i>clfA, hld</i>	<i>set7</i>	<i>msrA</i>	Nenhum	VAN, SXT, TET, CLO	OXA, PEN, ERI, CLI, CIP, GEN
P19I-2	ACJ	Colonização (pós-Tx)	tipo I	E	<i>lukDE, clfB, fnb</i>	<i>hld, fnbB, sak</i>	<i>luxS</i>	Nenhum	Nenhum	VAN, SXT, TET, CLO	OXA, PEN, ERI, CLI, CIP, GEN
P19N	ACJ	Colonização (pós-Tx)	tipo I	E	<i>lukDE, clfB, fnb</i>	Nenhum	<i>coA, sea, set8, set9</i>	Nenhum	Nenhum	VAN, SXT, TET, CLO	OXA, PEN, ERI, CLI, CIP, GEN
AMB	AMB	Clínico	tipo III	K	<i>lukDE, clfB, fnb</i>	<i>capJ, sei, ispA</i>	<i>spa, set11, set10</i>	Nenhum	<i>fosB, msrA</i>	VAN, SXT	OXA, PEN, ERI, CLI, CIP, TET, CLO, GEN
P39NB	AMB	Colonização (pós-Tx)	tipo III	F1	<i>lukDE, clfB, fnb</i>	<i>coA, sei, sem, set15, set6, aur, capJ, capK, capL</i>	<i>sea, icaA, icaD, icaB, lukD, lukE, set10, set11, set15</i>	Nenhum	<i>fosB, tetM</i>	VAN, SXT, CLO	OXA, PEN, ERI, CLI, CIP, TET, GEN
P39NC	AMB	Colonização (pós-Tx)	tipo I	D1	<i>tst, clfB, fnb</i>	<i>icaA, set8</i>	<i>capB, capC, capD, capE, capF, capG, capJ, capL, capM, capN, capO, capP, seg, sem, yent1, yent2, tst geh, icaB, icaC, icaD, map, lukD, lukE, hly, set8, set14, set15</i>	Nenhum	Nenhum	VAN, SXT, TET, CLO	OXA, PEN, ERI, CLI, CIP, GEN
P39N-2A	AMB	Colonização (pós-Tx)	tipo III	F1	<i>lukDE, clfB, fnb</i>	<i>capJ, capB, capA, icaR, sem, seb, sen, set6, aur</i>	<i>capC, capD, capE, capF, capG, capL, capN, capM, capO, capP, set10, set11 geh, sdrC, sdrD, sdrE, sbi, fib, sep, set12, set13, set15</i>	Nenhum	<i>tetM</i>	VAN, CLO	OXA, PEN, ERI, CLI, CIP, SXT, TET, GEN
P39N-2B	AMB	Colonização (pós-Tx)	tipo I	F1	<i>tst, clfB, fnb</i>	<i>clfB, ebpS, fnbA, sdrE, spa, sei, sbi, set6, set7, set9, set14</i>	<i>capC, capD, capE, capF, capG, capL, capN, capM, capO, capP, set10, set11 geh, sdrC, sdrD, sdrE, sbi, fib, sep, set12, set13, set15</i>	Nenhum	<i>fosB, tetM</i>	VAN, SXT, CLO	OXA, PEN, ERI, CLI, CIP, TET, GEN
350	ER	Clínico	tipo IVa	H	<i>lukDE, clfB, fnb</i>	<i>icaA, icaB, icaD, lukD, lukE, sea</i>	<i>ant1-5, ermA</i>	<i>msrA</i>	Nenhum	VAN, SXT, TET, CIP, CLO, GEN	OXA, PEN, ERI, CLI
517	HPR	Clínico	tipo II	A1	<i>lukDE, clfB, fnb</i>	<i>capM, coA, fnbA, icaA, icaB, icaC, icaD, lukD, lukE, sea, set7, set14, hysA</i>	<i>eta, hld</i>	Nenhum	Nenhum	VAN, SXT, TET, CLO, GEN	OXA, PEN, ERI, CLI, CIP
P26N	HPR	Colonização (pós-Tx)	tipo II	A1	<i>lukDE, clfB, fnb</i>	<i>capN, icaC, fib</i>	<i>sep, sdrD, aur, eta</i>	Nenhum	Nenhum	VAN, SXT, CLI, TET, GEN	OXA, PEN, ERI, CIP, CLO
P26N-2	HPR	Colonização (pós-Tx)	tipo II	L	<i>lukDE, clfB, fnb</i>	Nenhum	<i>sei, seb, sep, set9, sec3</i>	Nenhum	Nenhum	VAN, SXT, CLI, TET, GEN	OXA, PEN, ERI, CIP, CLO
P14N	JMC	Colonização (pós-Tx)	tipo I	D2	<i>tst, lukDE, clfB, fnb</i>	<i>set15</i>	<i>capC, capP, capO, sbi, sdrE, fib, hlgA, tst</i>	Nenhum	Nenhum	VAN, SXT, TET	OXA, PEN, ERI, CLI, CIP, CLO, GEN
KAREN	KYK	Clínico	tipo II	A	<i>lukDE, clfB, fnb</i>	Nenhum	Nenhum	Nenhum	Nenhum	VAN, SXT, TET, CLO, GEN	OXA, PEN, ERI, CLI, CIP,
P17I-2	KYK	Colonização (pós-Tx)	tipo II	A	<i>lukDE, clfB, fnb</i>	<i>capF, capG, capM, capN, lip, ispA</i>	<i>icaR, sdrC, set15, sei, sek, sel, aur seb, fnbB, fnbA, sak, sea, sek, sel, sep, seo, icaA, nuc</i>	Nenhum	Nenhum	VAN, SXT, TET, CLO, GEN	OXA, PEN, ERI, CLI, CIP
P17N-4A	KYK	Colonização (pós-Tx)	tipo I	C1	<i>clfB, fnb</i>	<i>clfA, clfB, ebpS, luxS, sea</i>	<i>merA, ermA</i>	Nenhum	Nenhum	VAN, SXT, ERI, CLI, TET, CIP, CLO, GEN	OXA, PEN
P17N-4B	KYK	Colonização (pós-Tx)	tipo II	A	<i>lukDE, clfB, fnb</i>	Nenhum	Nenhum	Nenhum	Nenhum	VAN, SXT, ERI, CLI, TET, CIP, CLO, GEN	OXA, PEN
62N	ORF	Colonização (pré-Tx)	tipo I	D	<i>tst, lukDE, clfB, fnb</i>	<i>set15</i>	<i>capC, hlgA, tst, lip, map</i>	Nenhum	Nenhum	VAN, SXT, TET, CLO	OXA, PEN, ERI, CLI, CIP, GEN
635	RH	Clínico	tipo IV	M	<i>lukDE, clfB</i>	<i>hly, sdrD, sdrE, seg, set12, nuc</i>	<i>map</i>	<i>ermA, ant1-5</i>	<i>merA, dfrA</i>	VAN, SXT, ERI, CLI, CIP, TET, CLO, GEN	OXA, PEN

Tx: Transplante; N = isolado nasal; I = isolado inguinal; IS: isolado clínico; OXA = oxacilina; PEN = Penicilina; ERI = eritromicina; CLI = clindamicina; CIP = ciprofloxacina; GEN = gentamicina; VAN = vancomicina; TET = tetraciclina; SXT = sulfametoxazol-trimetoprim; CLO = cloranfenicol.

* Valores numéricos com z-score superiores a 1,6 foram definidos como genes de alta expressão e valores inferiores a 1,6 foram definidos como genes de baixa expressão em cada isolado MRSA estudado.

Para toxina do choque tóxico (TSST-1), a análise dos resultados obtidos pelo ensaio de microarranjo revelou elevada expressão para gene *tst* em 3 isolados obtidos a partir de dois pacientes (um paciente pré-transplante e um pós-transplante). Estes resultados foram confirmados por amplificação tanto qualitativa como quantitativa feitas por técnicas de PCR e PCRq, respectivamente.

Em relação à expressão do gene *tst*, dos 3 isolados com amplificação específica, um isolado (62N) apresentou cerca de 300 vezes mais expressão do gene que o isolado (P14N) com menor expressão. O outro isolado (P39NC) expressou um quantidade intermediária, sendo cerca de 4 vezes mais expresso que o isolado de menor expressão (P14N). Estes resultados confirmam, portanto, os dados obtidos nas análises de expressão gênica pela técnica de microarranjo. Do total de 4 isolados positivos para este gene, por PCR qualitativa, apenas um não apresentou expressão do gene *tst* tanto por metodologia de microarranjo como por PCRq.

Um dos pacientes transplantados, com isolado de colonização pós-transplante positivo para gene *tst* (de expressão intermediária), não apresentou infecção de sítio cirúrgico mas morreu após 40 dias de internação.

A expressão dos genes que codificam leucocidinas D e E (*lukD* e *lukE*) foi detectada em níveis elevados em 9,5% (2/21) dos isolados, sendo que estes isolados foram provenientes do mesmo paciente (AMB). Estes 2 isolados apresentaram mesmo perfil de PFGE (perfil D1; *cluster* D) e cassete cromossômico do tipo III. Embora todos os 21 isolados tenham apresentado positividade para os genes destas leucotoxinas pela técnica de PCR qualitativa, 2 (9,5%) isolados mostraram baixos níveis de expressão destes genes pela hibridização por microarranjo.

Genes envolvidos na potencial desordem imunológica do hospedeiro, como os genes *spa* e *sbi*, foram detectados como altamente expressos em 1 (4,8%) e 2 (9,6%) isolados, respectivamente. Os genes *cap* apresentaram alta expressão em 4 isolados de colonização (1 obtido de paciente no período pré-transplante e 3 provenientes de pacientes transplantados), todos caracterizados como SCCmec tipo I.

Todos os isolados apresentaram gene *fnbA* por PCR qualitativa, mas um único isolado expressou altos níveis deste gene pelo experimento de microarranjo. Os genes *clfA* e *clfB* foram detectados em todos os isolados, mas 14,3% (3/21) apresentaram baixos níveis de expressão. Alguns genes de adesão foram detectados em alta expressão, como genes *icaA-D* (14,3%, 3/21), genes *sdrC-E* (14,3%; 3/21) e gene *map* (14,3%, 3/21). No entanto, o gene de adesão *ebpS* foi detectado como fracamente expresso em 9,5% (2/21) dos isolados analisados.

Em relação aos genes envolvidos na evasão da resposta imune do hospedeiro, como *geh* (codificador de lipase), *sak* (estafiloquinase) e *nuc* (nuclease estafilocócica) foram identificados poucos isolados. Dois (9,5%) isolados apresentaram alta expressão para o gene *geh*, um (4,8%) para o gene *sak* e outro isolado (4,8%; 1/21) para o gene *nuc*.

Em relação a expressão de genes de resistência, o presente estudo mostrou que 3 isolados do mesmo paciente (AMB) apresentaram resistência fenotípica à tetraciclina (CIMs 32,0 µg/mL) e presença do gene *tetM* em altos níveis de expressão. Para o gene *msrA* (gene que codifica resistência a macrolídeos-lincosamidas-estreptogramina B), dois isolados clínicos mostraram expressão elevada e resistência tanto à clindamicina e eritromicina (CIMs 32,0 µg/mL para ambas as drogas). Houve apenas um resultado discordante entre a resistência fenotípica ao sulfametoxazol-trimetoprim (isolado considerado sensível com CIM <0,25µg/mL) e elevada expressão do gene *dfrA* que codifica a resistência ao trimetoprim. Os demais resultados fenotípicos e genotípicos da resistência aos antimicrobianos estão descritos na tabela 18.

Nosso estudo mostrou que entre os isolados *SCCmec* tipo II, analisados por microarranjo, 66,7% (4/6) evidenciaram elevada expressão de genes codificadores de toxinas e adesinas, mas baixa expressão de genes de resistência antimicrobiana.

Neste estudo foi realizado o sequenciamento de um único isolado de MRSA (P31N2) que apresentou cassete cromossômico indefinido pela técnica de PCR. As métricas referentes às montagens geradas pelos *softwares* Mira e CLC, independentemente, e pela mesclagem das duas montagens estão apresentadas na tabela 19.

Tabela 19 - Métricas referentes às montagens geradas pelos *softwares* Mira e CLC, independentemente, e pela mesclagem das duas montagens do genoma bacteriano sequenciado pelo *Ion Torrent PGMTM*

Software	Número de contigs	Tamanho dos contigs somados (pb)	Tamanho do contig maior (pb)	Contig N50 (pb)	Contig N90 (pb)
Mira 4.0	238	2.811.648	57.690	22.410	6.670
CLC Genomics Workbench6	223	2.571.561	50.861	16.588	5.342
Merge com Geneious 7	48	2.878.127	472.287	107.473	36.501

O sequenciamento completo do genoma do isolado MRSA foi eficiente para representar a totalidade do conteúdo gênico da cepa, uma vez que o número de *contigs* obtidos após a mesclagem das duas montagens *de novo* foi relativamente pequeno. A somatória do tamanho dos *contigs* também foi coincidente com o tamanho de um cromossomo de *S. aureus* (2,8 Mpb). O valor de N50 da montagem também se apresenta alto, sendo 107.473 pb, o que significa que mais de 50% da informação genética está presente em *contigs* maiores do que esse tamanho. Ainda, 90% da informação genética está presente em *contigs* maiores do que 36.501 pb, o que possibilita a avaliação de genes inteiros sem problemas de encontrar genes truncados, dado que genes de procariotos têm em média aproximadamente 1.000 bp e há apenas 48 *gaps* no *scaffold*.

A curadoria feita pelo *software* Artemis, permitiu evidenciar que o isolado sequenciado apresentou os seguintes elementos: (1) sequências de inserção IS431, (2) gene regulatório *mecR1* (truncado), (3) sequência de inserção IS1272 e (4) complexo *ccr* formado por genes *ccrA2* e *ccrB2*. Diante destes resultados, foi possível caracterizar o isolado como pertencente ao complexo do gene *mec* classe B ("class B *mec* gene complex") o qual é composto por *mecA*, *mecR1* truncada resultante da inserção de IS1272 e IS431 localizada *downstream* do gene *mecA*. Os cassetes cromossômicos pertencentes ao complexo do gene *mec* classe B podem ser do tipo I, IV ou VI. Entretanto, o

isolado apresentou genes *ccrA2* e *ccrB2* e portanto foi classificado como sendo pertencente ao SCCmec tipo IV. Este isolado foi caracterizado como pertencente ao perfil alélico *arcC-1*, *aroE-4*, *glpf-1*, *gmK-4*, *pta-12*, *tpi-1* e *yqil-10*, classificado como ST5 e foi considerado virulento mas com resistência limitada, apresentando resistência apenas aos beta-lactâmicos e à tetraciclina. Os resultados do perfil de virulência e resistência deste isolado podem ser observados nas tabelas 20 e 21.

Tabela 20 - Genes de virulência detectados por sequenciamento em isolado de MRSA utilizando servidor *VirulenceFinder* 1.2

Fator de virulência	% Identidade	Posição no <i>contig</i>	Função da proteína	Número de acesso
Adesinas				
<i>efb</i>	100,00	1074738..1075235	Proteína ligadora de fibrinogênio	CP001781.1
<i>vwb</i>	99,63	1337944..1339831	Proteína ligadora de fator de <i>von Willebrand</i>	CP002643.1
<i>ebpS</i>	100,00	1440296..1441756	Proteína ligadora de elastina	CP001844.2
<i>fnbB</i>	100,00	2392369..2395254	Proteína ligadora de fibronectina B	BA000018.3
<i>fnbA</i>	99,97	2395935..2399051	Proteína ligadora de fibronectina A	AP009324.1
<i>icaR</i>	100,00	2586768..2587328	Regulador de fator de agregação intracelular	BA000018.3
<i>icaA</i>	100,00	2587492..2588730	Fator de agregação intracelular A	CP001781.1
<i>icaB</i>	100,00	2588996..2589868	Fator de agregação intracelular B	BA000018.3
<i>icaC</i>	100,00	2589855..2590907	Fator de agregação intracelular C	BA000018.3
<i>vwb</i>	99,73	797265..798769	Proteína ligadora de fator de <i>von Willebrand</i>	CP000736.1
<i>eap</i>	99,08	892864..893298	Proteína de adesão extracelular	CP000730.1
<i>atl</i>	99,97	965232..968979	Autolisina bifuncional (Atl)	BA000018.3
Toxinas				
<i>set/01</i>	100,00	1076090..1076806	proteína superantígeno	BA000018.3
<i>set/04</i>	99,86	1076914..1077640	proteína superantígeno	BA000018.3
<i>set/03</i>	100,00	1077735..1078460	proteína superantígeno	BA000018.3
<i>eta</i>	100,00	1083422..1084369	esfoliatina A	BA000017.4
<i>lukD</i>	100,00	1775986..1776969	leucotoxina (leucocidina), LukD	BA000018.3
<i>lukE</i>	100,00	1776971..1777906	leucotoxina (leucocidina) LukE	BA000018.3
<i>SEntG</i>	100,00	1783053..1783829	enterotoxina extracelular tipo G	BA000018.3
<i>SEntN</i>	99,87	1784112..1784887	enterotoxina N	BA000018.3
<i>SEnt</i>	99,61	1784905..1785676	enterotoxina	HE681097.1
<i>SEntI</i>	100,00	1785830..1786558	enterotoxina extracelular tipo I (precursor)	BA000018.3
<i>SEntM</i>	100,00	1786593..1787312	enterotoxina extracelular tipo I	BA000018.3
<i>SEntO</i>	100,00	1787593..1788375	enterotoxina O	BA000018.3
<i>hly</i>	99,89	1911841..1912710	beta-hemolisina	CP001844.2
<i>lukF-PV</i>	99,21	1912948..1913964	Leucocidina LukF-PV (PVL)	CP003166.1
<i>lukS-PV</i>	99,17	1914075..1915041	Leucocidina LukS-PV (PVL)	CP003166.1
<i>hld</i>	100,00	1925660..1925797	delta-hemolisina	HE681097.1
<i>hlyA</i>	99,38	2306483..2307448	gamma-hemolisina (precursor)	CP002110.1

Continua

Tabela 20 - Genes de virulência detectados por sequenciamento em isolado de MRSA utilizando servidor *VirulenceFinder* 1.2 (continuação)

Fator de virulência	% Identidade	Posição no <i>contig</i>	Função da proteína	Número de acesso
Toxinas				
<i>hlgC</i>	100,00	2308015..2308962	gama-hemolisina componente C	BA000018.3
<i>hlgB</i>	100,00	2308964..2309941	gama-hemolisina componente B precursor	BA000018.3
<i>SEnt-like</i>	100,00	354903..355514	<i>enterotoxin-like toxin</i>	CP001781.1
<i>set/06</i>	100,00	379324..380004	proteína superantígeno	CP001844.2
<i>set/07</i>	100,00	380290..380985	proteína superantígeno	BA000018.3
<i>set/08</i>	99,91	381276..382346	proteína superantígeno	BA000018.3
<i>set/09</i>	99,89	382710..383589	proteína superantígeno	BA000018.3
<i>set/10</i>	99,86	383953..384657	proteína superantígeno	CP001844.2
<i>set/11</i>	100,00	385103..385798	proteína superantígeno	BA000018.3
<i>set/12</i>	100,00	386137..386835	proteína superantígeno	BA000018.3
<i>set/13</i>	100,00	387212..387910	proteína superantígeno	BA000018.3
<i>set/14</i>	99,85	388276..388960	proteína superantígeno	BA000018.3
<i>set/15</i>	100,00	392367..393050	proteína superantígeno	BA000018.3
Exoenzimas				
<i>nuc</i>	100,00	1254513..1255046	termonuclease	BA000018.3
<i>spIC</i>	100,00	1769526..1770245	serina protease spIC	BA000018.3
<i>spIB</i>	99,86	1770303..1771024	serina protease spIB	BA000018.3
<i>spIA</i>	100,00	1771149..1771856	serina protease spIA	BA000018.3
<i>sspB2</i>	100,00	1840415..1841581	cisteína protease SspB	CP001781.1
<i>scn</i>	100,00	1870823..1871173	inibidor de complemento SCIN	CP002120.1
<i>sak</i>	100,00	1873382..1873873	estafiloquinase	BA000018.3
<i>coa</i>	99,78	202089..203871	coagulase	BA000018.3
<i>hysA</i>	100,00	2102231..2104660	hialuronidase	BA000018.3
<i>lip</i>	100,00	2591241..2593286	triacilglicerol lipase	BA000018.3
<i>geh</i>	100,00	304310..306385	glicerol ester hidrolase	BA000018.3
<i>nuc</i>	99,56	801341..802027	termonuclease	HE681097.1
<i>sspC</i>	100,00	958906..959235	cisteína protease	AP009324.1
<i>sspB</i>	100,00	959273..960454	cisteína protease	BA000018.3
<i>sspA</i>	100,00	960536..961564	serina V8 protease	BA000018.3
Evasão do sistema imune				
<i>cap5A</i>	100,00	104848..105516	Proteína de síntese de polissacarídeo capsular cap5A	CP001781.1
<i>capB</i>	100,00	105523..106218	Proteína de síntese de polissacarídeo capsular capB	AP009351.1
<i>cap5D</i>	100,00	107005..108828	Proteína de síntese de polissacarídeo capsular cap5D	CP001781.1
<i>cap5E</i>	100,00	108818..109846	Proteína de síntese de polissacarídeo capsular cap5E	CP001781.1
<i>cap5F</i>	100,00	109859..110968	Proteína de síntese de polissacarídeo capsular cap5F	CP001781.1
<i>cap5G</i>	100,00	110972..112096	Proteína de síntese de polissacarídeo capsular cap5G	CP001781.1
<i>cap5H</i>	100,00	112099..112725	Proteína de síntese de polissacarídeo capsular cap5H	CP001781.1
<i>cap5I</i>	100,00	112730..113839	Proteína de síntese de polissacarídeo capsular cap5I	CP001781.1
<i>cap5K</i>	100,00	115012..116217	Proteína de síntese de polissacarídeo capsular cap5K	CP001781.1

Continua

Tabela 20 - Genes de virulência detectados por sequenciamento em isolado de MRSA utilizando *VirulenceFinder* 1.2 (conclusão)

Fator de virulência	% Identidade	Posição no <i>contig</i>	Função da proteína	Número de acesso
Evasão do sistema imune				
<i>cap5L</i>	100,00	116218..117423	Proteína de síntese de polissacarídeo capsular <i>cap5L</i>	CP001781.1
<i>cap5M</i>	100,00	117434..117991	Proteína de síntese de polissacarídeo capsular <i>cap5M</i>	CP001781.1
<i>cap5N</i>	100,00	117991..118878	Proteína de síntese de polissacarídeo capsular <i>cap5N</i>	CP001781.1
<i>cap5O</i>	100,00	118932..120194	Proteína de síntese de polissacarídeo capsular <i>cap5O</i>	CP001781.1
<i>cap8P</i>	100,00	120241..121416	Enzima de síntese de polissacarídeo capsular <i>cap8P</i>	CP001844.2
<i>sbi</i>	100,00	2304673..2305983	Proteína ligadora em imunoglobulina tipo IgG	BA000018.3
<i>capC</i>	100,00	2583784..2584551	Proteína de síntese de polissacarídeo capsular <i>capC</i>	BA000018.3
<i>capB</i>	100,00	2584548..2585240	Proteína de síntese de polissacarídeo capsular <i>capB</i>	BA000018.3
<i>capA</i>	99,85	2585257..2585919	Proteína de síntese de polissacarídeo capsular <i>capA</i>	CP001844.2
<i>capD</i>	99,38	525596..526561	Proteína de síntese de polissacarídeo capsular <i>capD</i>	AP009351.1
Sistema secretório				
<i>esaC</i>	100,00	2485753..2486049	Proteína ESAC inserida no gene ESAT-6 <i>cluster</i>	CP001844.2
<i>esxA</i>	100,00	270530..270823	Proteína secretada ESAT-6/WXG100 da família EsxA/YukE	CP002114.2
<i>esaA</i>	100,00	270906..273935	Proteína de secreção EsaA tipo VII	CP001844.2
<i>essA</i>	99,35	273935..274394	Sistema de proteína de secreção EssA	CP001844.2
<i>esaB</i>	100,00	274366..274608	Proteína hipotética de secreção acessória EsaB/YukD	CP001844.2
<i>essB</i>	100,00	274621..275955	Componente hipotético de sistema de secreção EssB	CP001844.2
<i>essC</i>	100,00	275977..280416	Proteína de secreção EssC tipo VII	BA000018.3
<i>esaC</i>	100,00	280446..280838	Proteína EsaC inserida em gene ESAT-6 <i>cluster</i>	CP001844.2
<i>esxB</i>	100,00	280854..281168	Proteína da família EsxB	CP001844.2

Tabela 21 - Genes de virulência detectados por sequenciamento de última geração em isolado de MRSA utilizando *ResFinder* 2.0

Gene de resistência	% Identidade	Posição no <i>contig</i>	Fenótipo preditivo	Número de acesso
<i>mecA</i>	100,00	2608..4617	Resistência aos beta-lactâmicos	AB505628
<i>tet</i>	100,00	89046..90398	Resistência a tetraciclina	AY825285

A análise realizada pelo servidor *ResFinder 2.0* detectou a presença de apenas dois genes de resistência. Entretanto, outros genes de resistência pesquisados pelo BLAST foram encontrados no isolado estudado, como genes de resistência para fluoroquinolonas, fosfomicina, ácido fusídico, macrolídeo-lincosamida-estreptogramina B, cloranfenicol, rifampicina, sulfonamidas, trimetoprim e glicopeptídeos.

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Em transplantes de fígado as infecções bacterianas podem ocorrer em 30% a 50% dos casos especialmente nos primeiros meses após o procedimento cirúrgico, sendo MRSA é um importante patógeno destas infecções (Romanelli et al., 2010; Souza et al., 2007; Bedini et al., 2007).

Ainda não existem, entretanto, estudos publicados que abordem aspectos de virulência e caracterização molecular dos diferentes tipos de SCCmec e perfil eletroforético por PFGE de isolados de MRSA em pacientes hepatopatas e transplantados hepáticos.

O presente estudo demonstrou que, nos pacientes atendidos no Hospital das Clínicas do ICHC-FMUSP, a taxa de colonização foi 20,5% (39/190 pacientes) quando se utilizou a cultura microbiológica e de 82,1% (156/190) na detecção direta por PCR das amostras clínicas coletadas. A colonização nasal e inguinal de indivíduos que aguardam por um transplante de fígado é um importante fator para o desenvolvimento de infecções por MRSA, principalmente no período pós-operatório. Bert et al. (2005) mostraram que 87,5% das infecções por MRSA ocorrem primeiramente em pacientes colonizados quando comparados a pacientes não-colonizados, entretanto, apenas 10,1% evoluem para infecção.

Alguns autores recomendam que a monitoração da colonização seja feita tanto na admissão como no período após o transplante. Coia et al. (2006) sugerem que estas coletas sejam feitas semanalmente ou mensalmente, dependendo da prevalência local.

O rastreamento nasal permite uma elevada detecção de portadores de MRSA, mas apenas a coleta de amostras nasais pode falhar na determinação do número de portadores de MRSA, uma vez que este micro-organismo pode estar colonizando outros sítios do corpo e podem ser transmitidos de maneira efetiva a outros indivíduos, propagando assim sua disseminação (Eveillard et al., 2006).

Em 2002, Squier et al. demonstraram que pacientes transplantados hepáticos podem apresentar taxas de colonização nasal e retal por *S. aureus*,

concomitantemente, de até 25,5%. Estes autores evidenciaram também que pacientes com colonização em ambos os sítios apresentam maior risco de infecção de corrente sanguínea quando comparados com aqueles pacientes com colonização nasal somente ($p = 0,025$).

Com a intenção de aumentar a detecção de pacientes portadores de MRSA foi introduzida a coleta de amostras inguinais tanto dos pacientes ambulatoriais como dos pacientes internados. Do total de 190 pacientes estudados, apenas 3 (1,6%) apresentaram positividade de cultura para MRSA somente em sítio inguinal. Entretanto, dois destes três pacientes foram positivos para PCR direta da amostra clínica, tanto de *swab* nasal como inguinal. Assim, podemos dizer que a coleta de *swab* inguinal não apresenta, para este grupo de pacientes, grande impacto na detecção de colonização por MRSA.

A positividade da cultura para pesquisa de portador de MRSA no nosso estudo foi baixa, portanto, com intuito de detectar precocemente a colonização por MRSA em pacientes hepatopatas foi realizado a amplificação direta de genes específicos de MRSA em amostras clínicas. O estudo mostrou que embora a cultura microbiológica seja o padrão-ouro para detecção de isolados MRSA, a PCR direta de amostras clínicas apresentou alta positividade para este patógeno (82,1% de pacientes portadores de MRSA).

A colonização nasal ou mucocutânea por MRSA é um potencial reservatório para a infecção no paciente, bem como transmissão para outros pacientes e profissionais de saúde (Stevens et al., 2010; Honda et al., 2010; Hamel et al., 2010). Entretanto, alguns autores argumentam que colonização nasal pode não ser a principal via para a aquisição de infecção de sítio cirúrgico (Berthelot et al., 2010; Harbarth et al., 2008).

Em um estudo com cerca de 4.000 pacientes ortopédicos, apesar de colonização nasal ter sido considerada um fator de risco para infecção de sítio cirúrgico por *S. aureus*, a maioria das infecções ocorreram em indivíduos não portadores deste micro-organismo (Berthelot et al., 2010). Em contraste, Bode et al. (2010) relataram que o rastreamento nasal de *S. aureus* com a descolonização reduziu o número de infecções de feridas cirúrgicas.

Em nosso estudo, os pacientes transplantados analisados não apresentaram nenhum tipo de infecção de sítio cirúrgico causada por MRSA. Estes dados foram semelhantes aos resultados relatados em estudo publicado por Berthelot et al. (2010).

Durante o período do nosso estudo, houve um aumento de infecções causadas por bactérias Gram-negativas devido a ocorrência de surtos hospitalares na Unidade de Transplante Hepático do HC-FMUSP. O que pode talvez justificar a baixa frequência de infecção por MRSA em nossa casuística.

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 (Honda et al., 2010; Stürenburg E, 2009). Kearns et al. (1999) desenvolveram um PCR *multiplex* para encontrar a presença de *S. aureus* por meio da amplificação do gene *coA* (gene da coagulase, patognomônico de *S. aureus*) e encontrar a resistência à meticilina pela amplificação do gene *mecA* (característico da resistência à meticilina) em um teste único, com intervalo de uma hora e meia, propondo assim a identificação de MRSA. Os autores obtiveram correta distinção entre os isolados de *S. aureus* sensíveis e resistentes, e também diferenciação entre isolados de *S. aureus* e estafilococos coagulase-negativo. Além disso, eles 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* é urgente (Kearns et al., 1999).

O surgimento de novas cepas de MRSA com diversas origens genéticas também implica em uma atualização contínua dos testes moleculares, a fim de detectar novas sequências de elementos genéticos estafilocócicos tais como os diferentes tipos de *SCCmec*.

A caracterização dos diferentes tipos de *SCCmec* tem sido estudada por diferentes métodos (Oliveira et al., 2002a; Zhang et al., 2005; Kondo et al., 2007; Milheirico et al., 2007; Zhang et al., 2009) e assume grande importância na epidemiologia das infecções por MRSA.

Em relação aos isolados de MRSA detectados neste estudo, também pudemos observar a prevalência de *SCCmec* do tipo II, tanto em pacientes transplantados como em pacientes ambulatoriais, 17,5% e 25,4%, respectivamente. Entretanto, em estudo brasileiro realizado no HC-FMUSP por Pacheco et al. (2011), no período de maio de 2005 a novembro de 2005, foram detectados 64 pacientes colonizados por MRSA em Unidade de Dermatologia do HC-FMUSP, sendo 14 (22%) pertencentes a *SCCmec* do tipo III e 13 (20%) MRSA *SCCmec* do tipo IV. Outro estudo realizado no mesmo complexo hospitalar, em 2005, evidenciou que de um total de 151 isolados de MRSA hospitalares (HA-MRSA) obtidos de hemoculturas, 75% pertenciam ao *SCCmec* do tipo III e apenas um isolado era *SCCmec* do tipo IV (Trindade et al., 2005). Em nosso estudo, as amostras clínicas identificadas por PCR dos pacientes em lista de espera (período pré-transplante) foram submetidas a análise dos tipos de *SCCmec* e houve grande dificuldade nesta caracterização. Uma possível explicação para este problema é a presença de outras bactérias da microbiota, o que permite a amplificação inespecífica de outros micro-organismos. Contudo, dos 87 pacientes com positividade em *swab* nasal para genes *coA* e *mecA*, 22 apresentaram *SCCmec* tipo II (25,3%). Este resultado mostra que estes pacientes em algum momento entraram em contato com cepas hospitalares de MRSA ou que este tipo de *SCCmec* está circulando mais em nosso hospital.

A distribuição dos tipos de *SCCmec* vem sofrendo algumas modificações ao longo do tempo. Um estudo realizado em Goiânia, 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 possuíam *SCCmec* tipo III que é descrito classicamente de origem hospitalar (Lamaro-Cardoso et al., 2007).

O presente estudo mostrou que em um único isolado de MRSA não foi possível caracterizar o tipo de *SCCmec* pelas metodologias habitualmente utilizadas, como a PCR. Assim, foi realizada técnica de sequenciamento por tecnologia de *Ion Torrent Personal Genome Machine* (*Ion Torrent PGM*®), a

qual permitiu evidenciar a presença de tipo IV de *SCCmec*. Esta metodologia vêm sendo utilizada na microbiologia para ajudar na caracterização molecular de isolados bacterianos e até mesmo na investigação de surtos, conforme trabalhos publicados por Mellmann et al. (2011) e Sherry et al. (2013). Em estudo realizado por Vogel et al. (2012), foi evidenciado que esta tecnologia apresenta concordância de 100% com os métodos tradicionais de tipagem molecular, permitindo ainda uma melhor caracterização genética dos micro-organismos estudados.

De acordo com todos estes dados, concluímos que podem existir diferentes tipos de *SCCmec* circulantes em nosso hospital (nas diferentes unidades) ou que realmente houve uma mudança na distribuição dos tipos de *SCCmec* evidenciado em 2005 para o ano de 2011.

Outra questão importante foi a observação de um cassete classicamente de origem hospitalar (*SCCmec* tipo II) ter sido encontrado nos pacientes ambulatoriais estudados. Este fato pode ser explicado pela internação prévia destes pacientes. Do total de 126 pacientes ambulatoriais estudados, 47 pacientes (37,3%) relataram terem sido internados para realização de algum procedimento hospitalar previamente ao transplante, período em que podem ter entrado em contato com alguma cepa hospitalar de MRSA. Por tratar-se de pacientes com graves problemas hepáticos, estas internações costumam ser frequentes. No presente estudo, de um total de 15 pacientes de lista de espera colonizados por MRSA, 73,3% (11/15) apresentaram cassete cromossômico do tipo II. Destes, 54,5% (6/11) pacientes relataram internação prévia nos últimos seis meses, momento em que podem ter sido colonizados por este micro-organismo.

Healy et al. (2004) relataram uma situação similar em uma Unidade de Terapia Intensiva (UTI) neonatal nos Estados Unidos, onde se evidenciou bacteremia de origem hospitalar por isolados de MRSA com características genéticas idênticas aos isolados comunitários (CA-MRSA). Saiman et al. (2003) relataram em um surto de mastite e infecções de partes moles de origem hospitalar em mulheres pós-parto, que as cepas causadoras do referido surto apresentavam características genéticas idênticas à cepa MW-2, uma cepa de MRSA portadora do *SCCmec* tipo IV e vários fatores de virulência (Baba et al.,

2002), associada a infecções adquiridas na comunidade. Esses autores acreditam que houve introdução de uma cepa de CA-MRSA no ambiente hospitalar.

Dentre os pacientes com infecção de sítio cirúrgico, observou-se que apenas um paciente apresentou colonização por MRSA, cujo isolado foi caracterizado como *SCCmec* tipo II e pertencente ao perfil A1 (*cluster* A) por PFGE.

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

Entre os isolados de MRSA estudados foram encontrados variados perfis de resistência aos antimicrobianos. Antimicrobianos como clindamicina, eritromicina e ciprofloxacina apresentaram pouca atividade antimicrobiana para os isolados MRSA analisados. Entretanto, todos os isolados apresentaram resistência à penicilina e sensibilidade à vancomicina. Grande parte dos MRSA isolados em ambiente hospitalar possui múltipla resistência aos antimicrobianos (Fluit et al., 2001; Oliveira, 1998; Sader, 1993). A maioria dos isolados estudados apresentou *SCCmec* tipo II e o cassete cromossômico do tipo III foi evidenciado apenas em 14 isolados de pacientes transplantados. Os isolados de MRSA hospitalares (HA-MRSA) pertencentes aos tipos I, II e III de *SCCmec* apresentam altos níveis de resistência aos antimicrobianos pois possuem múltiplos elementos genéticos, móveis ou não, que conferem este perfil (Zetola et al., 2005). Neste trabalho, foi observado que isolados pertencentes a este tipo de *SCCmec* demonstraram elevada resistência para eritromicina (96,5%; 55/57), clindamicina (89,5%; 51/57), ciprofloxacina (91,2%; 52/57) e beta-lactâmicos (100%; 57/57).

Do total de 69 isolados analisados, 20,3% (14/69) apresentaram resistência ao sulfametoxazol-trimetoprim (SXT), sendo apenas um isolado com valores elevados de CIM (128,0µg/mL). Este isolado com elevada resistência ao SXT foi caracterizado como sendo *SCCmec* tipo V, resultado interessante pois o tipo V de *SCCmec* é considerado comunitário (CA-MRSA), bem como o tipo IV, e portanto deveria apresentar apenas resistência para os β-lactâmicos, codificada pela presença do único gene de resistência, o gene *mecA* (Ito et al., 2004).

Entre os 14 isolados resistentes ao SXT, 12 apresentaram *SCCmec* tipo III, resultado este concordante com os dados da literatura. Apenas dois isolados caracterizados como pertencentes ao cassete cromossômico do tipo III foram sensíveis ao SXT. Estudos posteriores destes isolados tornam-se necessários para um melhor entendimento deste perfil de susceptibilidade, onde a resistência pode estar relacionada à presença da 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). Os isolados resistentes ao SXT também foram avaliados molecularmente por PFGE e foi observado a presença de 8 perfis eletroforéticos sendo 42,9% (6/14) isolados pertencentes ao *cluster* F (2 perfis F, 2 perfis F1 e 2 perfis F2). Apenas um isolado apresentou perfil A5, perfil de PFGE relacionado ao *cluster* A.

A resistência a tetraciclina foi evidenciada em apenas 15,9% (11/69) dos isolados estudados, sendo 81,8% (9/11) pertencente ao *SCCmec* tipo III e 18,2% ao *SCCmec* tipo IVa. Esta resistência pode ser codificada pelo gene *tetK*, geralmente portado por plasmídeos de baixo peso molecular, um deles o pT181 que está inserido no *SCCmec* tipo III (Ito et al., 2003). O gene *tetK* codifica uma proteína que promove o efluxo da tetraciclina. A ausência do plasmídeo pT181 no *SCCmec* tipo III (Oliveira et al, 2002b), portanto, explicaria a sensibilidade a tetraciclina apresentada por 4 isolados com *SCCmec* tipo III encontrados em pacientes transplantados. Por outro lado, a maioria dos isolados que possuem *SCCmec* tipo III apresentaram resistência a tetraciclina, a qual pode ser explicada pela presença de outro gene de resistência, *tetM*.

Esse gene, que codifica uma proteína que interage com o ribossomo e promove a liberação da tetraciclina, é encontrado em um transposon conjugativo – Tn5801 – encontrado em *S. aureus* (Ito et al., 2003).

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

A presença de algumas sequências de inserção e transposons no *SCCmec*, 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 trimetoprim, 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 sulfametoxazol-trimetoprim observada em 14 isolados MRSA.

Foi observada a existência de 55 isolados 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). A determinação do tipo de *SCCmec* para esses isolados foi realizada e observou-se que 13 eram pertencentes ao *SCCmec* tipo I, 29 do *SCCmec* tipo II, 3 do *SCCmec* tipo III, 9 do *SCCmec* tipo IV e um do *SCCmec* tipo V. Deste total de isolados, 45,5% (25/55) pertenciam ao clone predominante (*cluster A*).

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. 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 virulência, isolados produtores de PVL e toxinas tipo TSST-1 são comumente de origem comunitária (Dinges et al., 2000; Kobayashi et al., 2009). Entretanto, no presente estudo observamos a presença do gene *tst* em 4 isolados, sendo 3 de pacientes transplantados e um proveniente de paciente ambulatorial, onde este último relatou não ter sido internado nos últimos seis meses mas foi submetido a antibiocoterapia neste mesmo período. Os quatro isolados *tst* positivos apresentaram o mesmo tipo de *SCCmec* (tipo I) e sendo 75,0% (3/4) pertencentes ao mesmo clone (*cluster* D), porém com perfis moleculares relacionados entre si (perfis D, D1 e D2). Entretanto, dentre estes isolados, apenas um isolado de MRSA nasal, obtido de segunda coleta após o transplante, não apresentou positividade na reação quantitativa feita por PCRq e no ensaio de microarranjo. A análise dos demais isolados mostrou que a expressão do gene *tst* foi mais elevada em isolado MRSA de paciente pré-transplante. Os resultados da PCR em tempo real, para este mesmo gene, foram concordantes com os resultados obtidos pela técnica de microarranjo.

Em estudo realizado em 100 hospitais japoneses por Ohkura et al. (2009), foram isolados 208 MRSA hospitalares (HA-MRSA), dos quais 80,3% foram positivos para gene *tst*. Este trabalho evidenciou também a presença de outros genes de virulência bem como sua relação com os tipos de *SCCmec*. Foram encontrados 90 (43,3%) de isolados HA-MRSA positivos para 13 genes de virulência, porém com perfis moleculares, caracterizados por PFGE, distintos. Todos os isolados deste estudo japonês foram caracterizados como *SCCmec* tipo II.

Nossa casuística mostrou resultados concordantes com o estudo acima citado, pois detectou elevada presença de genes *lukDE* em isolados MRSA

também de origem hospitalar (só que pertencentes ao cassete *SCCmec* tipo I). Além disso, outros genes de adesão como gene *clf* e gene *fnbA* foram detectados na maioria dos isolados MRSA, o que aumentaria a chance deste micro-organismo colonizar fortemente a mucosa nasal ou pele (região inguinal) dos pacientes analisados.

Em relação à presença de genes codificadores de PVL, não foi observado nenhum isolado positivo no nosso estudo. Como já descrito anteriormente, por vários autores, a presença deste tipo de gene é esperada em pacientes da comunidade e, mesmo entre estes pacientes, não apresenta altos níveis de positividade (Lo e Wang, 2011; Morrel e Balkin, 2010; Kobayashi et al., 2009; Ho et al., 2007). Em estudo realizado por Sharma-Kuinkel et al. (2012), a presença do gene codificador para PVL foi evidenciada em 10,4% dos isolados de MRSA (18/173 MRSA). Segundo estes autores, apenas a presença de genes de virulência não deve ser associada ao alto índice de morbidade ou mortalidade por este patógeno.

Os resultados da análise de expressão gênica observados nos 21 ensaios realizados mostraram que alguns genes estavam presentes no genoma, mas não estavam sendo expressos pela célula bacteriana. No presente estudo, foi evidenciado que, por exemplo, o gene *fnbA* estava presente em todos isolados, mas somente um isolado expressou este gene em nível elevado.

No presente estudo, foi evidenciado também que alguns isolados não apresentaram positividade nas reações de PCR qualitativo. Entretanto quando estes mesmos isolados foram submetidos à análise de expressão gênica pela técnica de microarranjo, foram detectados baixos níveis de expressão dos mesmos genes. Este fato poderia ser explicado devido a possíveis problemas de sensibilidade com as reações tradicionais de amplificação para genes bacterianos com baixa expressão.

Outros estudos, baseados na tecnologia de microarranjo, mostram que esta técnica pode ser de grande utilidade não só na quantificação da expressão gênica mas também na realização de uma triagem dos principais genes de virulência e resistência presentes num isolado bacteriano (Shore et al., 2012; Aamot et al., 2012).

Na nossa casuística, observamos que a hibridização do DNA bacteriano por microarranjo permitiu a detecção dos principais genes de resistência e virulência presentes em diferentes clones de MRSA. Isolados pertencentes ao *cluster* A (SCCmec tipo II) apresentaram alta expressão de genes codificadores de adesinas (genes *sdrC* e *sdrE*) e de algumas toxinas. Os demais isolados, pertencentes a outros *clusters*, apresentaram níveis elevados de expressão gênica para outras adesinas, como MSCRAMM (*Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules*) e genes envolvidos na formação de biofilme (*fnbA*, *clfA*, *clfB*, *ebpS*, *fib*, *icaA*, *icaD* e *map*). De acordo com estudo realizado por alguns pesquisadores (Aamot et al., 2012), estas adesinas desempenham importante papel na adesão e possível invasão de *S. aureus* em infecções profundas de sítio cirúrgico em pacientes ortopédicos.

No entanto, a maioria dos isolados estudados mostraram elevados níveis de expressão gênica de diferentes toxinas. Trinta e oito por cento dos isolados apresentaram um ou mais genes codificadores de proteínas que agem como superantígenos, como enterotoxinas e TSST-1. O gene *tst*, o qual pode estar localizado em várias ilhas de patogenicidade (Malachowa et al., 2010), foi identificado em apenas três isolados obtidos de dois pacientes diferentes (um hepatopata e um transplantado hepático). Shore et al. (2012) evidenciaram resultados similares, onde 94,0% de um total de 175 isolados de MRSA apresentaram expressão de um ou mais genes codificadores de superantígenos.

Em relação à resistência bacteriana, este estudo mostrou que, na maioria dos casos, a elevada expressão de um determinado gene estava relacionada com o perfil fenotípico de resistência, mas baixos níveis de expressão gênica não foram indicativos de susceptibilidade para alguns antimicrobianos. Um exemplo desta última situação, foi a detecção de um isolado fenotipicamente resistente à clindamicina e eritromicina que apresentou baixo nível de expressão para o gene *ermA*. É importante ressaltar que a resistência aos macrolídeos (como eritromicina) pode ser ocasionada por outro mecanismo como o efluxo codificado pelo gene *msrA*, o que explicaria, portanto, o perfil fenotípico encontrado pois o isolado em questão apresentou altos níveis de expressão deste gene.

Outra ocorrência interessante de nosso estudo foi a detecção de elevada expressão do gene *dfrA* para um isolado MRSA (SCCmec tipo IV) com aparente susceptibilidade ao sulfametoxazol-trimetoprim (CIM 0,25 µg/mL). De acordo com Leelaporn et al. (1996) a resistência ao trimetoprim pode ser mediada pela presença do gene *dfrA*, de localização plasmidial em isolados de *S. aureus*. Assim, uma possível explicação para esta susceptibilidade encontrada no teste de sensibilidade poderia ser explicada por uma possível perda deste plasmídeo.

Estudo realizado por Shore et al. (2012), constatou que embora os ensaios de microarranjo sejam de grande utilidade na detecção de genes de resistência, estes não são capazes de substituir os testes fenotípicos de sensibilidade. Isso porque alguns isolados apresentam mutações genéticas que podem não ser detectadas pela técnica de microarranjo. Assim, o uso do microarranjo em conjunto com os testes de sensibilidade permite uma melhor caracterização dos mecanismos de resistência bacteriana.

Alguns estudos, baseados na hibridização por microarranjo, vêm sendo propostos com intuito de realizar uma caracterização molecular (genotipagem) tanto de isolados de *S. aureus* sensíveis (MSSA) como resistentes (MRSA) à meticilina. Ruffing et al. (2012) publicaram a aplicação da técnica de microarranjo para genotipagem de 46 isolados MRSA e 46 isolados MSSA obtidos de culturas nasais de pacientes atendidos em um hospital alemão. Estes pesquisadores mostraram que, além de permitir a caracterização de diversos genes de virulência, os *arrays* para *S. aureus* possibilitaram detectar a presença de 5 *clusters* entre os isolados MRSA e doze complexos clonais entre os isolados MSSA. Neste estudo, também foi descrito que o repertório genético do grupo MRSA foi caracterizado por mais genes de virulência quando comparado ao grupo de MSSA.

Outro estudo, utilizando a mesma tecnologia de microarranjo para genotipagem de isolados MRSA, foi realizado por Li et al. (2013) em um total de 45 cepas de *S. aureus* de origem humana. Segundo este trabalho, foi determinado a presença de 10 *clusters* para os isolados MRSA, sete descritos em trabalhos anteriores e 3 novos *clusters* determinados por estes pesquisadores.

Nosso estudo evidenciou a presença de 4 *clusters* entre os 21 isolados MRSA analisados por microarranjo. Estes resultados, quando comparados à análise filogenética gerada pelos perfis de PFGE, mostraram concordância, exceto para um isolado clínico onde a PFGE determinou perfis distintos e a clusterização hierárquica feita por microarranjo considerou-os relacionados. Estudo realizado por Camoez et al. (2013), evidenciou que alguns isolados não-tipáveis por PFGE foram caracterizados molecularmente por outras técnicas moleculares, incluindo a técnica de microarranjo e tipagem do gene *spa*. Trabalho realizado por Oliveira et al. (2014), revelou que apenas um dos isolados MRSA estudados não foi genotipado por técnica de *spa-typing* e que, embora a técnica de PFGE seja mais trabalhosa, seu poder discriminatório é superior à tipagem molecular do gene *spa*.

Em relação à clonalidade, determinada por PFGE, observamos que houve o predomínio de um clone (*cluster A*) entre 15,9% (11/69) dos isolados de pacientes hepatopatas (pré-transplante) e 17,4% (12/69) em pacientes transplantados. Dos isolados de MRSA pertencentes ao *cluster A*, 20,0% (5/25) apresentaram *SCCmec* do tipo I e 76,0% (19/25) *SCCmec* do tipo II.

Entretanto, quando analisamos todos os isolados *SCCmec* do tipo II, observamos que nem todos apresentaram o mesmo perfil molecular. De um total de 27 isolados MRSA (de colonização) com *SCCmec* do tipo II, 66,7% (18/27) foram caracterizados molecularmente como pertencentes ao *cluster A*, o qual está relacionado ao clone endêmico *NY/Japan*. De acordo com estudo feito por Caiaffa-Filho et al. (2013), dois clones distintos (caracterizados por PFGE) de isolados MRSA *SCCmec* tipo II provenientes de pacientes com bacteremia atendidos no HC-FMUSP, também apresentaram similaridade com este clone endêmico japonês. Entretanto, este mesmo estudo evidenciou a prevalência do clone BEC (*Brazilian Endemic Clonal*), em 2010, em 10% dos isolados MRSA analisados.

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

Em estudo realizado por Sader et al (1994), foi descrita a propagação inter-hospitalar de um único clone de MRSA em oito dos nove hospitais avaliados que estavam sob vigilância epidemiológica na cidade de São Paulo entre 1990 e 1992. Um ano depois, isolados MRSA coletados a partir de cinco grandes hospitais de ensino em diferentes partes do Brasil compartilharam 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 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, *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 e D'Azevedo, 2008).

Em nosso trabalho, detectamos a presença de *SCCmec* tipo III em 13 pacientes submetidos ao transplante e em apenas um isolado clínico. Dentre estes isolados foram identificados oito isolados relacionados ao clone BEC, mostrando que este clone está presente em nosso hospital.

Em estudo realizado por Oliveira et al. (1998, 2001), foi relatada a presença de 70% de cepas pertencentes ao clone BEC em hospitais de diversas regiões do Brasil. Coimbra et al. (2000) relataram que 49% dos isolados de MRSA, provenientes de três hospitais em duas cidades argentinas, também apresentaram perfil idêntico ao BEC. Contudo, outros estudos têm demonstrado a diversificação de perfis ou até mesmo substituição de clones. Van Leeuwen et al. (1998) estudou três coleções de MRSA, compreendendo cepas com genótipos disseminados localmente, nacionalmente e internacionalmente, utilizando diversos métodos moleculares, (incluindo a PFGE) e evidenciou elevado grau de evolução genômica, principalmente em regiões de grande extensão geográfica. Segundo Melter et al. (2003), houve a substituição do clone BEC por um novo clone, denominado clone Tcheco, a partir de 2001, em duas coleções de MRSA estudadas na República Tcheca.

Ghebremedhin et al. (2005) relataram maior heterogeneidade entre isolados de MRSA em um hospital alemão e a emergência de clones apresentando sensibilidade a diversas classes de antimicrobianos, exceto β -lactâmicos. Portanto, a diversificação de perfis encontrada no presente estudo era esperada, uma vez que o relato da disseminação do BEC ocorreu há mais de uma década no Brasil e durante esse período deve ter ocorrido transferência horizontal de genes e até mesmo rearranjos genéticos.

Embora não seja frequente a descrição de surtos hospitalares causados por MRSA nas Unidades de Transplante Hepático, 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 et al. (2009) descreveu um surto em unidade de transplante hepático ocasionado por MRSA em infecções de sítio cirúrgico 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 antes da realização dos procedimentos cirúrgicos, evitando assim o aumento das infecções pós-transplante.

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Houve uma maior proporção de colonização nasal por MRSA entre os pacientes hepatopatas do que nos pacientes transplantados hepáticos.

A detecção de MRSA diretamente da amostra clínica por meio da técnica de PCR apresentou maior positividade que a cultura microbiológica.

Dentre os isolados de MRSA, o cassete cromossômico mais prevalente foi SCCmec tipo II. Novas tecnologias, como a técnica de sequenciamento por *Ion Torrent PGM*[®], podem permitir uma melhor caracterização molecular de alguns isolados MRSA não determinados por métodos convencionais.

Foi detectada elevada presença de genes de virulência *lukDE* em isolados MRSA de origem hospitalar. Além disso, outros genes de adesão como gene *clf* e gene *fnbA* foram detectados na maioria dos isolados MRSA.

Não foi observado nenhum isolado positivo para o gene codificador de PVL e apenas três isolados confirmados como produtores de Toxina da Síndrome do Choque Tóxico (TST) por técnicas de microarranjo e PCRq.

A PCR em tempo real evidenciou que um isolado MRSA de colonização de paciente hepatopata apresentou elevado nível de expressão para o gene de virulência *tst* e os isolados obtidos dos pacientes transplantados apresentaram níveis menores de expressão para este mesmo gene.

A técnica de microarranjo permitiu detectar os principais genes de virulência e resistência em isolados MRSA, realizando uma quantificação estimada da expressão destes genes.

Houve predomínio de um *cluster* (A) entre os isolados de pacientes hepatopatas (pré-transplante) e em pacientes transplantados. Apenas dois isolados clínicos (de infecção) apresentaram perfil molecular igual ao *cluster* A.

Isolados pertencentes ao *cluster* A (*SCCmec* tipo II) apresentaram alta expressão de genes codificadores de adesinas (genes *sdrC* e *sdrE*) e de algumas toxinas.

O clone BEC foi encontrando em alguns dos isolados estudados e todos os isolados pertencentes ao *cluster* predominante apresentaram similaridade com o clone endêmico NY/Japan.

Alguns pacientes apresentaram colonização por mais de um *cluster* de MRSA, com diferentes tipos de *SCCmec* e perfil de virulência.

7 ANEXOS

7 ANEXOS

Anexo 1 - Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) aplicado a todos os pacientes que participaram do estudo.

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), 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, 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.

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

PESQUISADOR RESPONSÁVEL : .Profa. Dra Silvia Figueiredo Costa.

CARGO/FUNÇÃO: Medica 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 HC-FMUSP no período de 03 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 (.....).....

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

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) 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, 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. Silvia 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

Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha

Data ____ / ____ / ____

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

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

Prof. Dra. Silvia Costa

Data ____ / ____ / ____

Anexo 2 - Documento de aprovação pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa-CAPPesq.

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 01/07/2009, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0307/09**, intitulado: **"INFECÇÕES HOSPITALARES CAUSADAS POR S. AUREUS EM PACIENTES TRANSPLANTADOS HEPÁTICOS"** apresentado pelo Departamento de **MOLÉSTIAS INFECCIOSAS E PARASITÁRIAS**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Profa.Dra. Sílvia Figueiredo Costa**

Pesquisador (a) Executante: **Inneke Marie van der Heijden**

CAPPesq, 01 de Julho de 2009

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de
Ética para Análise de Projetos
de Pesquisa

Anexo 3 - Ficha de coleta de dados preenchida para pacientes submetidos ao transplante hepático.

Nome: _____

RG: _____

Data de nascimento: _____ Sexo: 1. () FEM. 2. () MASC.

Data de adm.: ____/____/____

Doença de base: _____

DATA DA CIRURGIA: ____/____/____

DATA TÉRMINO DO C. CIRÚRGICO: ____/____/____

Tipo de TX HEPATICO

() TX INTER - VIVOS () HEPATITE FULMINANTE

() TX DOADOR CADAVER () RETRANSPLANTE

EQUIPE CIRÚRGICA DOADOR EQUIPE CIRÚRGICA RECEPTOR

CIRURGIÃO 1: _____ CIRURGIÃO 1: _____

CIRURGIÃO 2: _____ CIRURGIÃO 2: _____

CLASSIFICAÇÃO DA CIRURGIA: () P C () C () I

ASA () 1 () 2 () 3 () 4 () 5

TEMPO DE CIRURGIA-TOTAL : _____ hs _____ min

IRIC: _____

RECONSTRUÇÃO BILIAR () C – C () B – D

CHILD: _____ MELD: _____

TEMPO DE ISQUEMIA TOTAL ____hs ____min.

ISQUEMIA QUENTE: _____ min

VOLUME SANGUÍNEO ADMINISTRADO: _____bolsas

CREATININA PRÉ – OP _____POI _____3º PO _____7º PO _____

DIÁLISE : SIM () NÃO ()

INÍCIO ____/____/____ TÉRMINO: ____/____/____

NÚMERO DE SESSÕES: _____

INFECÇÕES HOSPITALARES CAUSADA POR *S. aureus* ATÉ 30 DIAS PÓS- OPERATÓRIO

() SCIS ____/____/____ MICRO: _____

() SCIP ____/____/____ MICRO: _____

() SCOE ____/____/____ MICRO: _____

() ITUS ____/____/____ MICRO: _____ Sonda vesical () S () N

() ITUA ____/____/____ MICRO: _____ Sonda vesical () S () N

() ICSL ____/____/____ MICRO: _____ Cateter Central () S () N

() ICSC ____/____/____ MICRO: _____ Cateter Central () S () N

() PNEU ____/____/____ MICRO: _____ Respirador () S () N

OUTRAS INFECÇÕES: ____/____/____ MICRO: _____

1ª Cultura de vigilância ____/____/____
S. aureus () () Sensibilidade: _____

2ª Cultura de vigilância ____/____/____
S. aureus () () Sensibilidade: _____

3ª Cultura de vigilância ____/____/____
S. aureus () () Sensibilidade: _____

4ª Cultura de vigilância ____/____/____
S. aureus () () Sensibilidade: _____

RELATORIO DE ALTA:

PASSAGENS DURANTE A INTERNAÇÃO PARA TX

DATA	CLÍNICA
____/____/____	
____/____/____	
____/____/____	

Critérios de gravidade

Método de Classificação do Índice de risco de infecção cirúrgica (IRIC)

É determinado de acordo com o potencial de contaminação cirúrgico, o Asa e o tempo cirúrgico, dependendo das intercorrências encontradas nestas variáveis a cirurgia vai receber uma pontuação que somado pode variar de 0 a 3.

Potencial de contaminação da ferida cirúrgica

É feita pelo cirurgião, e pode ter as seguintes classificações:

Limpa: cirurgia eletiva, primariamente fechada, sem a presença de dreno, não traumática, sem inflamação ou infecção encontrada durante o ato operatório, sem quebra de técnica asséptica e sem invasão do trato respiratório, digestivo, geniturinário e orofaringe.

Potencialmente Contaminada: há penetração dos tratos respiratórios e digestivos com condições controladas e sem contaminações não usuais, apendicectomia, invasão da orofaringe, trato biliar, geniturinário ou vagina na ausência de infecção. Inclui-se também a drenagem mecânica.

Contaminada: ferida traumática recente, aberta, contaminação grosseira de conteúdo digestivo, invasão biliar ou geniturinário com presença de infecção. Quebra de técnica asséptica. Incisões com sinais inflamatórios sem presença de pus local.

Infectada: ferida cirúrgica traumática com tecido desvitalizado, com atraso no início do tratamento ou com presença de material contaminado, presença de corpo estranho, secreção purulenta ou perfuração de vísceras encontradas durante a cirurgia.

Se a cirurgia for limpa ou potencialmente contaminada: não recebe ponto.

Se a cirurgia for contaminada ou infectada: recebe 01 ponto.

ASA

Esta classificação é feita pelo anestesista quando paciente entra no bloco cirúrgico ou na visita pré-operatória, o Asa pode variar de 01 a 05.

- ASA–P1 Paciente cirúrgico sem doença associada.
- ASA-P2 Paciente com doença sistêmica leve.
- ASA–P3 Paciente com doença sistêmica grave.
- ASA–P4 Paciente com doença sistêmica que representa ameaça constante a vida.
- ASA–P5 Paciente moribundo, sem expectativa de vida a menos que seja operado.

Se o ASA for 1 ou 2, não recebe ponto.

Se o ASA for 3, 4 ou 5 recebem 01 ponto.

Tempo cirúrgico

As cirurgias previamente definidas para o componente cirúrgico, deverão ser realizadas dentro do tempo determinado pelo NNISS, que para o transplante de fígado é de 06 horas:

Se o ato cirúrgico for inferior ao tempo estipulado: não recebe ponto.

Se o ato cirúrgico for superior ao tempo estipulado: recebe 01 ponto.

Método de Classificação do Child-Pugh

Variáveis	Pontuação (Escore)		
	1 Ponto	2 Pontos	3 Pontos
Ascite	Ausente	Leve	Moderada
Bilirrubina (mg/dl)	<2	2 a 3	>3
Albumina (g/dl)	>3.5	2.8 a 3.5	>2.8
Tempo de Protrombina (NR)	>50% (<1.7)	40 a 50% (1.7-2.3)	>40% (<2.3)
Encefalopatia	Ausente	Leve a moderada Grau 1 e 2	Grave ou coma (grau 3 e 4)

Child A = 05 a 06 pontos; Child B = 07 a 09 pontos; Child C = 10 a 45 pontos.

Método de Classificação do Meld

O Meld é calculado utilizando tempo de protrombina (INR), bilirrubina e creatinina através da fórmula:

$$\text{Meld} = 9,57 \times \log_e \text{ creatinina mg/dL} + 3,78 \times \log_e \text{ bilirrubina (total) mg/dL} + 11,20 \times \log_e \text{ INR} + 6,42$$

A pontuação pode variar de 06 a 40 pontos, quanto maior o valor maior a gravidade do paciente e menor sua expectativa de vida. Valor igual ou superior a 15 é considerado caso de hepatopatia grave.

Anexo 4 - Definições das infecções hospitalares e critérios para diagnóstico de infecção (Garner et al., 1988).

A - INFECÇÃO DA CORRENTE SANGUÍNEA PRIMÁRIA:

CRITÉRIO I: Patógeno isolado em hemocultura não relacionado a outro foco reconhecido, exceto cateter vascular.

CRITÉRIO II: Um ou mais dos seguintes sinais ou sintomas sem outra causa reconhecida: febre $\geq 37,5$ °C(axilar), calafrio, hipotensão.

B - INFECÇÃO DA CORRENTE SANGUÍNEA PRIMÁRIA CLÍNICA:

CRITÉRIO III: Hemocultura não realizada ou micro-organismo não isolado e ausência de foco infeccioso definido (exceto cateter vascular).

Dois ou mais dos seguintes sinais ou sintomas sem outra causa reconhecida: febre $\geq 37,5$ °C(axilar), hipotermia $<35,5$ °C(axilar), hipotensão (pressão arterial sistólica <90 mmHg), necessidade do uso de drogas vasoativas (dopamina, noradrenalina, dobutamina, etc.) para manter estabilidade hemodinâmica, CAV <3 e alteração das medidas hemodinâmicas sugestivas de infecção (débito cardíaco elevado, resistência periférica baixa).

C- INFECÇÃO DO SÍTIO CIRÚRGICO: Considerar Infecção do Sítio Cirúrgico quando ocorrer até 30 dias após o ato cirúrgico e ou um ano quando houver implantação de prótese não humana.

C1 - INCISIONAL SUPERFICIAL (PELE E SUBCUTÂNEO) (SCIS):

CRITÉRIO I: Drenagem purulenta da incisão superficial.

CRITÉRIO II :Micro-organismo isolado em cultura de líquidos ou tecidos da incisão superficial, colhidos com técnica asséptica.

CRITÉRIO III: Abertura deliberada da incisão pelo cirurgião, com micro-organismo isolado em cultura.

E um dos seguintes sinais ou sintomas: dor ou sensibilidade localizada, rubor, calor e edema.

CRITÉRIO VI: Diagnósticos de infecção feito pelo médico. Abscessos dos pontos, infecção em episiotomia ou circuncisões e enxertos não são considerados infecção de sítio cirúrgico.

C2 – INCISIONAL PROFUNDO (TECIDOS MOLES PROFUNDOS FÁSCIA E MÚSCULOS)(SCIP):

CRITÉRIO I: Drenagem purulenta, proveniente da incisão profunda, mas não do espaço ou órgão relacionado.

CRITÉRIO II: Incisão profunda com deiscência e micro-organismo isolado em cultura.

CRITÉRIO III: Abertura espontânea ou deliberada da incisão pelo cirurgião, com micro-organismo isolado em cultura

E um dos seguintes sinais ou sintomas: (1) febre, (2) dor e sensibilidade local, (3) abscesso ou outra evidência de infecção envolvendo a incisão profunda visualizado durante a cirurgia ou por exame histopatológico ou radiológico.

D – INFECÇÃO DO SÍTIO CIRÚRGICO ÓRGÃO E ESPAÇO (SCOE):

Envolve órgãos e espaços profundos em qualquer região anatômica manipulada ou seccionada, envolvendo ou não o local da incisão.

CRITÉRIO I: Drenagem purulenta de dreno colocado em órgão ou espaço.

CRITÉRIO II: Micro-organismo isolado em cultura obtida assepticamente de fluidos ou tecidos de órgãos ou espaço acometido.

CRITÉRIO III: Abscesso ou coleção vistas à reoperação, por histopatologia ou por exames de imagem.

CRITÉRIO IV: Diagnóstico de infecção feito pelo médico. Infecção que se desenvolve nos tecidos próximos ao dreno são considerados infecção de pele e subcutâneo e não incisionais propriamente dito.

E - PNEUMONIAS

CRITÉRIO I: Alteração clínica (estertores crepitantes ou sub macicez à percussão). E um dos seguintes achados: (1) micro-organismo isolado em hemocultura, (2) surgimento de escarro purulento ou mudança de características do mesmo, (3) isolamento de micro-organismo de amostra obtida por biópsia ou lavado brônquico alveolar (cultura quantitativa).

CRITÉRIO II: Alteração radiológica (nova ou progressiva infiltração, consolidação, cavitação ou derrame pleural).

E um dos seguintes achados: (1) surgimento de escarro purulento ou mudança de características do mesmo, (2) micro-organismo isolado na hemocultura, (3) isolamento de micro-organismo ou antígeno viral em lavado brônquico alveolar (cultura quantitativa) ou biópsia $\geq 10^3$ UFC, (4) sorologia positiva para IgM ou aumento seriado de 4 vezes do título de IgG, (5) febre e leucocitose com desvio à esquerda, (6) piora da função respiratória (ex.: gasometria, aumento de FiO₂ e aumento de PEEP) e (7) infecção intra-abdominal

F - INFECÇÃO INTRA-ABDOMINAL: infecção em vesícula biliar; ducto biliar; fígado; baço, pâncreas; peritônio; espaço subfrênico ou subdiafragmático; ou outro tecido intrabdominal ou área não especificada.

CRITÉRIO I: Micro-organismo isolado de material purulento da região intrabdominal obtido durante cirurgia ou por punção.

CRITÉRIO II: Abscesso ou outra evidência de infecção intrabdominal observado durante cirurgia ou exame histopatológico.

CRITÉRIO III: Dois ou mais dos seguintes sinais ou sintomas sem outra causa reconhecida, tais como: (1) febre $\geq 37,5^\circ\text{C}$ (axilar), (2) náusea, (3) vômito, (4) dor abdominal, (5) icterícia, (6) um dos seguintes:

- agente visto pelo GRAM de secreção purulenta ou tecido obtido durante cirurgia ou aspiração por agulha;
- hemocultura positiva mais evidência radiológica de infecção, isto é, anormalidades em ultrassonografia, tomografia, ressonância magnética ou radioisótopos (galium, tecnésio, etc.). ou Raios-X de abdômen;

OBSERVAÇÃO: Não considerar pancreatite (síndrome inflamatória caracterizada por dor abdominal, náusea, vômito, associada com níveis séricos altos de enzimas pancreáticas), a menos que tenha origem infecciosa.

8 REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS

1. Aamot HV, Blomfeldt A, Skråmm I, Müller F, Monecke S. Molecular characterisation of methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* from deep surgical site infections in orthopaedic patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012. Aug;31(8):1999-2004.
2. Affymetrix. (2005) *GeneChip™ Expression Analysis Data Analysis Fundamentals*. Data Sheet GeneChip® Made-to-Order Array Program, GeneChip® S. aureus Genome Array, Affimetrix Inc., USA. Available from: <http://www.affymetrix.com/support/technical/manuals.affx>
3. Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*. 1997; 25:3389–402.
4. Amaral MM, Coelho LR, Flores RP, Souza RR, Silva-Carvalho MC, Teixeira LA et al. 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*. 1995;192:801–810.
5. 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;28(10):1223-6.
6. Arbeit RD, Karakawa WW, Wann WF, Robbins JB. Predominance of two newly described capsular polysaccharide types among clinical isolates *Staphylococcus aureus*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1984; 2: 85-91.
7. Associação Brasileira de Transplante de Órgãos [on-line]. Available from: www.abto.org.br
8. Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, Formsma K, Gerdes S, Glass EM, Kubal M, Meyer F, Olsen GJ, Olson R, Osterman AL, Overbeek RA, McNeil LK, Paarmann D, Paczian T, Parrello B, Pusch GD, Reich C, Stevens R, Vassieva O, Vonstein V, Wilke A, Zagnitko O. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics*. 2008; 8;9:75.

9. 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;25;359(9320):1819-27.
10. Baba-Moussa L, Anani L, Scheftel JM, Couturier M, Riegel P, Haïkou N, Hounsou F, Monteil H, Sanni A, Prévost G. Virulence factors produced by strains of *Staphylococcus aureus* isolated from urinary tract infections. *J Hosp Infect*. 2008;68(1):32-8.
11. Bailey RJ, Woolf IL, Cullens H et al. Metabolic inhibition of polymorphonuclear leucocytes in fulminant hepatic failure. *Lancet* 1976; 11:1162-3.
12. Bedini A, Codeluppi M, Cocchi S, Guaraldi G, Di Benedetto F, Venturelli C, Masetti M, Prati F, Mussini C, Borghi V, Girardis M, Gerunda GE, Rumpianesi F, Esposito R. Gram-positive bloodstream infections in liver transplant recipients: incidence, risk factors, and impact on survival. *Transplant Proc*. 2007; Jul-Aug;39(6):1947-9.
13. 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.
14. Bert F, Bellier C, Lassel L, Lefranc V, Durand F, Belghiti J, Mentre F, Fantin B. Risk factors for *Staphylococcus aureus* infection in liver transplant recipients. *Liver Transpl*. 2005; (9):1093-9.
15. 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;16(3):393-401.
16. Berthelot P, Grattard F, Cazorla C, Passot JP, Fayard JP, Meley R, Bejuy J, Farizon F, Pozzetto B, Lucht F. Is nasal carriage of *Staphylococcus aureus* the main acquisition pathway for surgical-site infection in orthopaedic surgery? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2010 Apr;29(4):373-82.

17. Böcher S, Smyth R, Kahlmeter G, Kerremans J, Vos MC, Skov R. Evaluation of four selective agars and two enrichment broths in screening for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*. 2008;46(9):3136-8.
18. Bode LG, Kluytmans JA, Wertheim HF, Bogaers D, Vandenbroucke-Grauls CM, Roosendaal R, Troelstra A, Box AT, Voss A, van der Tweel I, van Belkum A, Verbrugh HA, Vos MC. Preventing surgical-site infections in nasal carriers of *Staphylococcus aureus*. *N Engl J Med*. 2010; Jan7;362(1):9-17.
19. Boyle-Vavra S, Daum RS. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the role of Panton-Valentine leukocidin. *Lab Invest*. 2007;87:3-9.
20. Boyle-Vavra S, Ereshefsky B, Wang CC, Daum RS. Successful multiresistant community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineage from Taipei, Taiwan, that carries either the novel Staphylococcal chromosome cassette mec (SCCmec) type VT or SCCmec type IV. *J Clin Microbiol*. 2005;Sep;43(9):4719-30. Erratum in: *J Clin Microbiol*. 2005;Dec;43(12):6223.
21. Brandão A, Fuchs SC, Gleisner AL, Marroni C, Zanotelli ML, Cantisani G. Model for the end-stage liver disease and death prediction in a cohort of Brazilian patients on the waiting list for liver transplantation. *Clin Transplant*. 2008;Sep-Oct;22(5):651-6.
22. Brandão A, Marroni C. Modelos prognósticos de sobrevida. In: Mattos AA, Dantas-Correa EB, editors. Tratado de Hepatologia. Rio de Janeiro: Rubio; 2010;p.867-76.
23. Branger C, Gardye C, Galdbart JO, Deschamps C, Lambert N. Genetic relationship between methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from France and from international sources: delineation of genomic groups. *J Clin Microbiol*. 2003; Jul;41(7):2946-51.
24. 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;46:2151-4.

25. Caiaffa-Filho HH, Trindade PA, Gabriela da Cunha P, Alencar CS, Prado GV, Rossi F, Levin AS. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying SCCmec 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.
26. Camoez M, Sierra JM, Pujol M, Hornero A, Martin R, Domínguez MA. Prevalence and molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 resistant to tetracycline at a Spanish hospital over 12 years. *PLoS One*. 2013;Sep 5;8(9):e72828.
27. Cha HY, Moon DC, Choi CH, Oh JY, Jeong YS, Lee YC, Seol SY, Cho DT, Chang HH, Kim SW, Lee JC. Prevalence of the ST239 clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and differences in antimicrobial susceptibilities of ST239 and ST5 clones identified in a Korean hospital. *J Clin Microbiol*. 2005;Aug;43(8):3610-4.
28. 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;(5):328-32.
29. Chapoutot C, Pageaux GP, Perrigault Pf. *Staphylococcus aureus* nasal carriage in 104 cirrhotic and control patients: a prospective study. *J Hepatol* 1999;30:249-53.
30. Chen L, Mediavilla JR, Oliveira DC, Willey BM, de Lencastre H, Kreiswirth BN. Multiplex real-time PCR for rapid *Staphylococcal* cassette chromosome mec typing. *J Clin Microbiol*. 2009;Nov;47(11):3692-706.
31. Chevreux B, Pfisterer T, Drescher B, Driesel AJ, Müller WE, Wetter T, Suhai S. Using the miraEST assembler for reliable and automated mRNA transcript assembly and SNP detection in sequenced ESTs. *Genome Res*. 2004;Jun;14(6):1147-59.
32. Chevreux B, Wetter T, Suhai S. Genome Sequence Assembly Using Trace Signals and Additional Sequence Information. 1999;p.45–56.
33. Chini V, Foka A, Dimitracopoulos G, Spiliopoulou I. Absolute and relative real-time PCR in the quantification of *tst* gene expression among

- methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: evaluation by two mathematical models. *Lett Appl Microbiol*. 2007;45(5):479-84.
34. Chlebowicz MA, Nganou K, Kozytska S, Arends JP, Engelmann S, Grundmann H, Ohlsen K, van Dijl JM, Buist G. Recombination between *ccrC* genes in a type V (5C2&5) staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) of *Staphylococcus aureus* ST398 leads to conversion from methicillin resistance to methicillin susceptibility in vivo. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;Feb;54(2):783-91.
 35. Christianson S, Golding GR, Campbell J, Mulvey MR. Comparative genomics of Canadian epidemic lineages of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*. 2007;45:1904–1911.
 36. Chung M, Dickinson G, De Lencastre H, Tomasz A. International clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in two hospitals in Miami, Florida. *J Clin Microbiol*. 2004;Feb;42(2):542-7.
 37. *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Tenth Edition. CLSI document M02-A10, Wayne, Pennsylvania USA, 2009.
 38. *Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI)*. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth Information Supplement M100-S21. Wayne, Pennsylvania: CLSI, 2011.
 39. *Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI)*. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7–A8. Eighth Edition. Wayne, Pennsylvania. USA, 2009.
 40. Coia JE, Duckworth GJ, Edwards DI et al. Joint Working Party of the British Society of Antimicrobial Chemotherapy; Hospital Infection Society; Infection Control Nurses Association. Guidelines for the control and prevention of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in healthcare facilities. *Hosp Infect*. 2006;63:S1-44.
 41. Coimbra MVS, Teixeira LA, Ramos RL, Predari SC, Castello L, Famiglietti A, Vay C, Klan L, Figueiredo AM. Spread of the Brazilian epidemic clone of a multiresistant MRSA in two cities in Argentina. *J Med Microbiol*. 2000 Feb;49(2):187-92.

42. de Miranda OP, Silva-Carvalho MC, Ribeiro A, Portela F, Cordeiro RP, Caetano N, Vidal CF, Figueiredo AM. Emergence in Brazil of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates carrying SCCmecIV that are related genetically to the USA800 clone. *Clin Microbiol Infect.* 2007;Dec;13(12):1165-72.
43. Delcher AL, Harmon D, Kasif S, White O, Salzberg SL. Improved microbial gene identification with GLIMMER. *Nucleic Acids Res.* 1999; Dec1;27(23):4636-41.
44. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev.* 2000;Jan;13(1):16-34.
45. 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;May28;99(11):7687-92.
46. Eveillard M, de Lassence A, Lancien E, Barnaud G, Ricard JD, Joly-Guillou ML. Evaluation of a strategy of screening multiple anatomical sites for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at admission to a teaching hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2006;27:181–4
47. Fink AS, Brown Junior RS. Current Indications, contraindications, delisting criteria, and timing for liver transplantation. In: Busuttil RW, Klintmalm GK, editors. *Transplantation of the Liver*. Philadelphia Elsevier Saunders; 2005.p.95-114.
48. 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.
49. 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.
50. Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, Horan TC, Hughes JM. CDC definitions for nosocomial infections. *Am. J. Infect. Control.* 1988;16:128-140.

51. Ghebremedhin B, König W, König B. Heterogeneity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains at a German university hospital during a 1-year period. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2005;24(6):388-98.
52. Gray GS, Kehoe M. Primary sequence of the alpha-toxin gene from *Staphylococcus aureus* wood 46. *Infect Immun*. 1984;46(2):615-8.
53. Hamel M, Zoutman D, O'Callaghan C. Exposure to hospital roommates as a risk factor for health care-associated infection. *AmJ Infect Control*. 2010;38:173–81.
54. Harbarth S, Huttner B, Gervaz P, Fankhauser C, Chraiti MN, Schrenzel J, et al. Risk factors for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* surgical site infection. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2008;29:890–3.
55. Hart ME, Hart MJ, Roop AJ. Genotypic and Phenotypic Assessment of Hyaluronidase among Type Strains of a Select Group of Staphylococcal Species. *Int J Microbiol*. 2009;614371.
56. Health Resources and Service Administration. US Department of Health and Human Services. Available from: www.hrsa.gov
57. Healy CM, Hulten KG, Palazzi DL, Campbell JR, Baker CJ. Emergence of new strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a neonatal intensive care unit. *Clin Infect Dis*. 2004;15;39 (10):1460-6.
58. Heusser R., M. Ender, B. Berger-Bachi and N. McCallum. Mosaic staphylococcal cassette chromosome mec containing two recombinase loci and a new mec complex, B2. *Antimicrob. Agents. Chemother*. 2007;51: 390–393.
59. Higuchi W, Takano T, Teng LJ, Yamamoto T. Structure and specific detection of staphylococcal cassette chromosome mec type VII. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;Dec 19;377(3):752-6.
60. Hiramatsu K, Ito T, Hanaki H. Mechanisms of methicillin and vancomycin in *Staphylococcus aureus*. *Ballière's Clin. Infect. Dis*. 1999;5:221-242.
61. Hiramatsu K, Kuroda M, Cui L, Ito T. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol*. 2001;9:486-93.
62. Hisata K, Kuwahara-Arai K, Yamanoto 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.
63. Ho PL, Wang TK, Ching P, Mak GC, Lai E, Yam WC, Seto WH. Epidemiology and genetic diversity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in residential care homes for elderly persons in Hong Kong. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2007;28(6):671-8.
64. 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.
65. Howden BP, McEvoy CR, Allen DL, Chua K, Gao W, Harrison PF, Bell J, Coombs G, Bennett-Wood V, Porter JL, Robins-Browne R, Davies JK, Seemann T, Stinear TP. Evolution of multidrug resistance during *Staphylococcus aureus* infection involves mutation of the essential two component regulator WalKR. *PLoS Pathog.* 2011;7(11): e1002359.
66. Ito T, Katayama Y, Asada K, et al. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome mec integrated in the chromossome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45:1323-36.
67. 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; 43:1449-58.
68. 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.
69. Ito T, Okuma Y, Ma XX, Yuzawa H, Hiramatsu K. Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. *Drug Resist Updates.* 2003;6:41-52.
70. IWG-SCC. Classification of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec): guidelines for reporting novel SCCmec elements. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 2009;53:4961–4967.

71. Jamrozy DM, Fielder MD, Butaye P, Coldham NG. Comparative Genotypic and Phenotypic Characterisation of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* ST398 Isolated from Animals and Humans. *PLoS One*. 2012;7:e40458.
72. Jarraud S, Mougél C, Thioulouse J, Lina G, Meugnier H, Forey F, Nesme X, Etienne J, Vandenesch F. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease. *Infect Immun*. 2002;Feb;70(2):631-41.
73. Jernigan JA, Titus MG, Gröschel DH, Getchell-White S, Farr BM. Effectiveness of contact isolation during a hospital outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Am J Epidemiol*. 1996;Mar 1;143(5):496-504.
74. Johnston L, Chui L, Chang N, Macdonald S, McKenzie M, Kennedy W, Haldane D, Bethune R, Taylor G, Hanakowski M, Tyrrell G. Cross-Canada spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* via transplant organs. *Clin Infect Dis*. 1999;4:819-23.
75. Kamath PS, Kim WR. The model for end-stage liver disease (MELD). *Hepatology*. 2007;45(3):797-805.
76. Kamath PS, Wiesner RH, Malinchoc M, Kremers W, Therneau TM, Kosberg CL, et al. A model to predict survival in patients with end-stage liver disease. *Hepatology*. 2001;33(2):464-70.
77. Karchmer TB, Durbin LJ, Simonton BM, Farr BM. Cost-effectiveness of active surveillance cultures and contact/droplet precautions for control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Hosp Infect*. 2002; 51(2):126-32.
78. Kearns AM, Seiders PR, Wheeler J, Freeman R, Steward M. Rapid detection of methicillin-resistant staphylococci by multiplex PCR. *J Hosp Infect*. 1999; 43:33–7.
79. Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C, Thierer T, Ashton B, Meintjes P, Drummond A. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*. 2012;Jun15;28(12):1647-9.

80. Kleinheinz KA, Joensen KG, Larsen MV. Applying the ResFinder and VirulenceFinder web-services for easy identification of acquired antibiotic resistance and *E. coli* virulence genes in bacteriophage and prophage nucleotide sequences. *Bacteriophage*. 2014;Jan1;4(1):e27943.
81. Kobayashi SD, DeLeo FR. An update on community-associated MRSA virulence. *Curr Opin Pharmacol*. 2009;9(5):545-51.
82. 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.
83. König B, Prévost G, König W. Composition of staphylococcal bi-component toxins determines pathophysiological reactions. *J Med Microbiol*. 1997;46(6):479-85.
84. Kuroda M, Ohta T, Uchiyama I, Baba T, Yuzawa H, Kobayashi I, Cui L, Oguchi A, Aoki K, Nagai Y, Lian J, Ito T, Kanamori M, Matsumaru H, Maruyama A, Murakami H, Hosoyama A, Mizutani-Ui Y, Takahashi NK, Sawano T, Inoue R, Kaito C, Sekimizu K, Hirakawa H, Kuhara S, Goto S, Yabuzaki J, Kanehisa M, Yamashita A, Oshima K, Furuya K, Yoshino C, Shiba T, Hattori M, Ogasawara N, Hayashi H, Hiramatsu K. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*. 2001 Apr 21; 357(9264):1225-40.
85. Kwon N.H., K.T. Park, J.S. Moon et al. Staphylococcal cassette chromosome *mec* (*SCCmec*) characterization and molecular analysis for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and novel *SCCmec* subtype IVg isolated from bovine milk in Korea. *J. Antimicrob. Chemother*. 2005;56: 624–632.
86. Lamaro-Cardoso J, Castanheira M, de Oliveira RM, e Silva SA, Pignatari AC, Mendes RE, Pimenta FC, Andrade AL. Carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children in Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2007;Apr;57(4):467-70.
87. Larsen MV, Cosentino S, Rasmussen S, Friis C, Hasman H, Marvig RL, Jelsbak L, Sicheritz-Pontén T, Ussery DW, Aarestrup FM, Lund O.

- Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. *J Clin Microbiol.* 2012. 50(4):1355-61.
88. Laurent C, Bogaerts P, Schoevaerds 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 SCCmec type IV variant. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2010;Aug;29(8):995-1002.
89. Leelaporn A, Firth N, Paulsen IT, Skurray RA. IS257-mediated cointegration in the evolution of a family of staphylococcal trimethoprim resistance plasmids. *J Bacteriol.* 1996;Oct;178(20):6070-3.
90. Li H, Zhao C, Chen H, Zhang F, He W, Wang X, Wang Q, Yang R, Zhou D, Wang H. Identification of Gene Clusters Associated with Host Adaptation and Antibiotic Resistance in Chinese *Staphylococcus aureus* Isolates by Microarray-Based Comparative Genomics. *PLoS One.* 2013;8(1): e53341.
91. Lindsay J. A. Genomic variation and evolution of *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol.* 2010;300:98–103.
92. 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.
93. Lo WT, Wang CC. Panton-Valentine leukocidin in the pathogenesis of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Pediatr Neonatol.* 2011;Apr;52(2):59-65.
94. 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.
95. Luca A, Angermayr B, Bertolini G, Koenig F, Vizzini G, Ploner M, et al. An integrated MELD model including serum sodium and age improves the prediction of early mortality in patients with cirrhosis. *Liver Transpl.* 2007;Aug;13(8):1174-80.

96. 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.
97. Makris G, Wright JD, Ingham E, Holland KT. The hyaluronate lyase of *Staphylococcus aureus* - a virulence factor? *Microbiology.* 2004;150:2005-13.
98. Malachowa N, Deleo FR. Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. *Cell. Mol Life Sci.* 2010;67:3057–3071.
99. Marques MB, Weller PF, Parsonnet J, Ransil BJ, Nicholson-Weller A. Phosphatidylinositol-specific phospholipase C, a possible virulence factor of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 1989;Nov;27(11):2451-4.
100. Marroni C, Fleck Junior A, Brandão A. Indicações e Contra indicações de Transplante Hepático. In: Mattos AA, Dantas-Correa EB, editors. Tratado de Hepatologia. Rio de Janeiro: Rubio; 2010;p.877-89.
101. McCarthy AJ, Lindsay JA. Genetic variation in *Staphylococcus aureus* surface and immune evasion genes is lineage associated: implications for vaccine design and host-pathogen interactions. *BMC Microbiol.* 2010; Jun15;10:173.
102. 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;41:5113-20.
103. McNicholas S, Shore AC, Coleman DC, Humphreys H, Hughes DF. DNA microarray genotyping and virulence and antimicrobial resistance gene profiling of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bloodstream isolates from renal patients. *J Clin Microbiol.* 2011;Dec;49(12):4349-51.
104. Mellmann A, Harmsen D, Cummings CA, Zentz EB, Leopold SR, Rico A, Prior K, Szczepanowski R, Ji Y, Zhang W, McLaughlin SF, Henkhaus JK, Leopold B, Bielaszewska M, Prager R, Brzoska PM, Moore RL, Guenther S, Rothberg JM, Karch H. Prospective genomic characterization of the

- German enterohemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 outbreak by rapid next generation sequencing technology. *PLoS One*. 2011; 6(7): e22751.
105. Melter O, Sousa M A, Urbášková, P., Jakubů, V., Žemličková, H., Lencastre, H. Update on the major clonal types of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the Czech republic. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41(11):4998-5005.
106. Mendes RE, Kiyota KA, Monteiro J, Castanheira M, Andrade SS, Gales AC, Pignatari AC, Tufik S. Rapid detection and identification of metallo-beta-lactamase-encoding genes by multiplex real-time PCR assay and melt curve analysis. *J Clin Microbiol.* 2007;Feb;45(2):544-7.
107. Milheirico C, Oliveira DC, De Lencastre H. Update to the multiplex PCR strategy for assignment of mec element types in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 2007;51: 3374–3377.
108. Mir N, Sánchez M, Baquero F, López B, Calderón C, Cantón R. 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;Apr;36(4):986-9.
109. Morell EA, Balkin DM Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a pervasive pathogen highlights the need for new antimicrobial development. *Yale J Biol Med.* 2010;83(4):223-33.
110. Mulvey MR, Chui 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;Oct; 39(10): 3481-5.
111. Nouwen J, Boelens H, van Belkum A, Verbrugh H. Human factor in *Staphylococcus aureus* nasal carriage. *Infect Immun.* 2004; Nov;72(11):6685-8.
112. Novick, R. Pathogenicity factors and their regulation. In: Fischetti, V. A. et al. Gram-positive pathogens. ASM. Washington, D.C. 2000.
113. O'Brien FG, Coombs GW, Pearson JC, Christiansen KJ, Grubb WB. Type V staphylococcal cassette chromosome mec in community staphylococci from Australia. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 2005. 49: 5129–5132.

114. Obed A, Schnitzbauer AA, Bein T, Lehn N, Linde HJ, Schlitt HJ. Fatal pneumonia caused by Panton-Valentine Leucocidine-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (PVL-MRSA) transmitted from a healthy donor in living-donor liver transplantation. *Transplantation*. 2006;Jan 15;81(1):121-4.
115. Ohkura T, Yamada K, Okamoto A, Baba H, Ike Y, Arakawa Y, Hasegawa T, Ohta M. Nationwide epidemiological study revealed the dissemination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying a specific set of virulence-associated genes in Japanese hospitals. *J Med Microbiol*. 2009;58 (10):1329-36.
116. 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;Nov;40(11):4289-94.
117. 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*. 2002a; 46:2155-61.
118. Oliveira DC, Milheirico C, De Lencastre H. Redefining a structural variant of staphylococcal cassette chromosome mec, SCCmec type VI. *Antimicrob. Agents. Chemother*. 2006a;50:3457–3459.
119. Oliveira DC, Milheirico C, Vinga S, De Lencastre H. Assessment of allelic variation in the ccrAB locus in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones. *J. Antimicrob. Chemother*. 2006b;58:23–30.
120. Oliveira DC, Tomasz A, De Lancastre 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;7:349-61.
121. Oliveira DC, Tomasz A, De Lencastre H. Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet Infect D*. 2002b; 2:180-9.

122. Oliveira GA, Faria JB, Levy CE, Mamizuka EM. Characterization of the Brazilian endemic clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from hospitals throughout Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2001 Aug;5(4):163-70.
123. 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.
124. Oliveira LM, van der Heijden IM, Abdala E, Levin ASS, Costa SF. Molecular characterization of MRSA isolates in pre- and post-liver transplanted patients. In European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID), 2013, April 27-30, Berlin, Germany.
125. 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 (Sao Paulo)*. 2011; 66(12): 2071-7.
126. Parras F, Guerrero MC, Bouza E, Blázquez MJ, Moreno S, Menarguez MC, Cercenado E. Comparative study of mupirocin and oral cotrimoxazole plus topical fusidic acid in eradication of nasal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995;Jan;39(1):175-9.
127. Patel R. Association between nasal methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage and infection in liver transplant recipients. *Liver Transpl*. 2001;(8):752-3.
128. 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.
129. 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*, 50 (2008), pp. 135–137.

130. Pérez-Roth E, Lorenzo-Díaz F, Batista N, Moreno A, Méndez-Alvarez S. Tracking methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones during a 5-year period (1998 to 2002) in a Spanish hospital. *J Clin Microbiol.* 2004;Oct;42(10):4649-56.
131. Perkins JD, Halldorson JB, Bakthavatsalam R, Fix OK, Carithers RL, Jr., Reyes JD. Should liver transplantation in patients with model for end-stage liver disease scores ≤ 14 be avoided? A decision analysis approach. *Liver Transpl.* 2009;Feb;15(2):242-54.
132. Petinaki E, Kontos F, Maniatis AN, Spiliopoulou I, Liakos P. Emergence of *Enterococcus faecalis* susceptible to quinupristin/dalfopristin in Greece. *Int J Antimicrob Agents.* 2006;28(2):153-6.
133. Pfaller, M.A. Chromosomal restriction fragment analysis by pulsed-field gel electrophoresis. In: Iseberg HD, ed. *Clinical microbiology procedures handbook*. Washington: American Society for Microbiology, 1993.
134. 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.
135. 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.
136. Pujol M, Pena C, Pallares R, Ariza J, Ayats J, Dominguez MA, Gudiol F. Nosocomial *Staphylococcus aureus* bacteremia among nasal carriers of methicillin-resistant and methicillin-susceptible strains. *Am. J. Med.* 1996; 100: 509-16.
137. 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.
138. Romanelli RM, Clemente WT, Lima SS, Rezende EM, Martinho GH, Paiva LF, Neves FA, Madeira JG, Amâncio GC, Lima AS, Faria LC, Coutinho RI.

- MRSA outbreak at a transplantation unit. *Braz J Infect Dis*. 2010;14(1):54-9.
139. Rosenstein R, Götz F. Staphylococcal lipases: biochemical and molecular characterization. *Biochimie*. 2000 Nov;82(11):1005-14.
140. Rossi F, Diaz L, Wollam A, Panesso D, Zhou Y, Rincon S, Narechania A, Xing G, Di Gioia TS, Doi A, Tran TT, Reyes J, Munita JM, Carvajal LP, Hernandez-Roldan A, Brandão D, van der Heijden IM, Murray BE, Planet PJ, Weinstock GM, Arias CA. Transferable vancomycin resistance in a community-associated MRSA lineage. *N Engl J Med*. 2014;17;370(16):1524-31.
141. Rozpończyk E, Szemraj J, Malinowski M, Rozpończyk J. Staphylokinase--a specific plasminogen activator. *Postepy Biochem*. 2006; 52(1):80-6.
142. Ruffing U, Akulenko R, Bischoff M, Helms V, Herrmann M, von Müller L. Matched-cohort DNA microarray diversity analysis of methicillin sensitive and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolates from hospital admission patients. *PLoS One*. 2012; 7(12): e52487.
143. 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.
144. Sader HS, Pignatari AC, Hollis RJ, Leme I, Jones RN. Oxacillin and quinoloneresitant *Staphylococcus aureus* in São Paulo, Brazil: a multicenter molecular epidemiology study. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 1993; 14: 260-4.
145. Saiman L, O'Keefe M, Graham PL 3rd, Wu F, Saïd-Salim B, Kreiswirth B, LaSala A, Schlievert PM, Della-Latta P. Hospital transmission of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among postpartum women. *Clin Infect Dis*. 2003. Nov15;37(10):1313-9.
146. Scheu PM, Berghof K and Stahl U. Detection of pathogenic spoilage micro-organisms in food with the polymerase chain reaction. *Food Microbiol*. 1998.15, 13–31.
147. Schneider CR, Buell JF, Gearhart M, Thomas M, Hanaway MJ, Rudich SM, Woodle ES. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in

- liver transplantation: a matched controlled study. *Transplant Proc.* 2005;(2):1243-4.
148. Sharma-Kuinkel BK, Ahn SH, Rude TH, Zhang Y, Tong SY, Ruffin F, Genter FC, Braughton KR, Deleo FR, Barriere SL, Fowler VG Jr. Presence of genes encoding panton-valentine leukocidin is not the primary determinant of outcome in patients with hospital-acquired pneumonia due to *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 2012;Mar;50(3):848-56.
149. Sherry NL, Porter JL, Seemann T, Watkins A, Stinear TP, Howden BP. Outbreak investigation using high-throughput genome sequencing within a diagnostic microbiology laboratory. *J Clin Microbiol.* 2013;May;51(5):1396-401.
150. Shore A, Rossney AS, Keane CT, Enright MC, Coleman DC. Seven novel variants of the staphylococcal chromosomal cassette mec in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Ireland. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;May;49(5):2070-83.
151. Shore AC, Brennan OM, Deasy EC, Rossney AS, Kinnevey PM, Ehricht R, Monecke S, Coleman DC. DNA microarray profiling of a diverse collection of nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates assigns the majority to the correct sequence type and staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) type and results in the subsequent identification and characterization of novel SCCmec-SCCM1 composite islands. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;Oct; 56(10): 5340-55.
152. Singh N, Gayowski T, Wagener MM, Marino IR. Bloodstream infections in liver transplant recipients receiving tacrolimus. *Clin Transplant.* 1997a;(4):275-81.
153. Singh N, Gayowski T, Wagener MM, Marino IR. Predictors and outcome of early-versus late-onset major bacterial infections in liver transplant recipients receiving tacrolimus (FK506) as primary immunosuppression. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1997b;(11):821-6.
154. Singh N, Squier C, Wannstedt C, Keyes L, Wagener MM, Cacciarelli TV. Impact of an aggressive infection control strategy on endemic *Staphylococcus aureus* infection in liver transplant recipients. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2006;(2):122-6.

155. Sousa MA, De Lencastre H. Evolution of isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in hospitals and their similarities to isolates of community-acquired MRSA. *J Clin Microbiol.* 2003; 41(8):3806-15.
156. Souza MV, Barth AL, Álvares-da-Silva MR, Machado AR. Infections after liver transplantation in adults: data from a university hospital in southern Brazil (1996-2000). *Arq Gastroenterol* 2007; 44(2):128-32.
157. Squier C, Rihs JD, Risa KJ et al. *Staphylococcus aureus* rectal carriage and its association with infections in patients in a surgical intensive care unit and a liver transplant unit. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2002; 23(9):495-501.
158. Stephens AJ, Huygens F, Giffard PM. Systematic derivation of marker sets for staphylococcal cassette chromosome mec typing. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007;51:2954–2964.
159. 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;16:797–803.
160. 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.
161. Stürenburg E. Rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from clinical samples: methods, effectiveness and cost considerations. *Ger Med Sci.* 2009;6;7:Doc06.
162. Sung JM, Lloyd DH, Lindsay JA. *Staphylococcus aureus* host specificity: comparative genomics of human versus animal isolates by multi-strain microarray. *Microbiology.* 2008;154:1949–1959.
163. Takano T, Higuchi W, Zaraket H, Otsuka T, Baranovich T, Enany S, Saito K, Isobe H, Dohmae S, Ozaki K, Takano M, Iwao Y, Shibuya M, Okubo T, Yabe S, Shi D, Reva I, Teng LJ, Yamamoto T. Novel characteristics of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains

- belonging to multilocus sequence type 59 in Taiwan. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;Mar;52(3):837-45.
164. Takatsuki M, Eguchi S, Yamanouchi K, Hidaka M, Soyama A, Miyazaki K, Tajima Y, Kanematsu T. The outcomes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection after living donor liver transplantation in a Japanese center. *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* 2010; 17(6): 839-43.
165. Teixeira L.A., Lourenco M.C., Figueiredo A.M. 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; pp.393–399.
166. Tomita T, Kamio Y. Molecular biology of the pore-forming cytolysins from *Staphylococcus aureus*, alpha- and gamma-hemolysins and leukocidin. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1997;61,pp.565–572.
167. Torre-Cisneros J, Herrero C, Canas E, Reguera JM, De La Mata M, Gomez-Bravo MA. High mortality related with *Staphylococcus aureus* bacteremia after liver transplantation. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2002;(5):385-8.
168. Trindade PA, Pacheco RL, Costa SF, Rossi F, Barone AA, Mamizuka EM, Levin AS. Prevalence of SCCmec type IV in nosocomial bloodstream isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 2005;43(7):3435-7.
169. van Hijum SA, Zomer AL, Kuipers OP, Kok J. Projector 2: contig mapping for efficient gap-closure of prokaryotic genome sequence assemblies. *Nucleic Acids Res.* 2005;Jul1;33.
170. van Leeuwen W, van Belkum A, Kreiswirth B, Verbrugh H. Genetic diversification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a function of prolonged geographic dissemination and as measured by binary typing and other genotyping methods. *Res. Microbiol.* 1998.149:497-507.
171. Vogel U, Szczepanowski R, Claus H, Jünemann S, Prior K, Harmsen D. Ion Torrent Personal Genome Machine Sequencing for Genomic Typing of *Neisseria meningitidis* for Rapid Determination of Multiple Layers of Typing Information. *J Clin Microbiol.* 2012; 50(6): 1889-94.

172. Winn W, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, Woods G. Estafilococos e Cocos Gram-positivos Relacionados. *Diagnóstico Microbiológico - Texto e Atlas Colorido*. 6a ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2008;Cap.12,p.617-665.
173. Woeste G, Zapletal C, Wullstein C, Golling M, Bechstein WO. Influence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrier status in liver transplant recipients. *Transplant Proc*. 2005;(4):1710-2.
174. Yamamoto T, Takano T, Higuchi W, Iwao Y, Singur O, et al. (2012) Comparative genomics and drug resistance of a geographic variant of ST239 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* emerged in Russia. *PLoS One*. 7:e29187.
175. Zetola N, Francis JS, Nuermberger EL, Bishai WR. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging threat. *Lancet Infect. Dis*. 2005; 5:275-86.
176. Zhang K, McClure J A, Elsayed S, and Conly J M. Novel staphylococcal cassette chromosome mec type, tentatively designated type VIII, harboring class A mec and type 4 ccr gene complexes in a Canadian epidemic strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2009;53:531–540.
177. 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):5026–5033.