UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

**Caracterização do cassete cromossômico estafilocócico *mec* (SCC*mec*) de
cepas endêmicas nosocomiais de *Staphylococcus aureus* resistentes a
oxacilina e vancomicina**

Cristina Reinert

**Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE**

Orientadora:

Profa. Dra. Elsa Masae Mamizuka

São Paulo, 2004

DEDALUS - Acervo - CQ

30100005983

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Reinert, Cristina
R367c Caracterização do cassete cromossômico estafilocócico *mec*
(*SCCmec*) de cepas endêmicas nosocomiais de *Staphylococcus*
aureus resistentes a oxacilina e vancomicina / Cristina
Reinert. -- São Paulo, 2004.
71p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Mamizuka, Elsa Masae

1. Infecção hospitalar 2. Microbiologia clínica I. T. II.
Mamizuka, Elsa Masae, orientador.

615.18h CDD

Cristina Reinert

**Caracterização do cassete cromossômico estafilocócico *mec* (SCC*mec*) de
cepas endêmicas nosocomiais de *Staphylococcus aureus* resistentes a
oxacilina e vancomicina**

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Elsa Masae Mamizuka
orientador/presidente

Prof. Adjunto substituto Ana Cristina Gales
1º examinador

Profa. Livre Docente Anna Sara Levin
2º examinador

São Paulo, 23 de junho de 2004.

Agradecimentos Especiais

Deus

Tu és a razão da minha existência. Em tudo te dou graças...

Meus pais

Nada do que eu possa escrever pode se comparar ao sentimento que tenho pelas pessoas que me deram a vida, me educaram, acompanharam todos os momentos da minha trajetória até aqui. Minhas conquistas, meus medos, minhas alegrias e minhas frustrações. Pessoas que eu tenho certeza que me amam mais que tudo em suas vidas, que abrem mão de ter para que eu tenha. Que com carinho e firmeza me conduziram, me ensinaram a ser o que sou. A vocês, meus pais, só posso dizer que essa etapa que conquisto é mais de vocês do que minha. Pelo apoio, esforço, compreensão, ternura, carinho e amor que jamais faltaram... Muito obrigada!

Rodolfo

Eu sei o quanto foi difícil conviver com tantas ausências, caras feias, esperas, impaciências, cansaços, frustrações pelo amor adiado. Foi importante compartilhar com você minhas conquistas, alegrias, expectativas por meus projetos, vivência... meu crescer.

Pelo fato de hoje eu ter alcançado o meu objetivo... obrigada. Você foi companheiro e amigo, esteio na minha exaustão, ânimo em minhas incertezas, impulso em minhas ansiedades.

A você cabe uma parcela deste grau que conquisto.

Por isso, meu carinho e amor.

Meu irmão, Christian

A vida está apenas começando. Há ainda muitos caminhos a serem trilhados. Jamais deixe de alimentar o espírito. É no coração que se encontra o verdadeiro tesouro.

Professora Elsa

Pessoas que acreditam em nosso potencial nos ajudam a crescer.

Obrigada pela atenção, compreensão e respeito.

Meu carinho e admiração.

Amigos e colegas

Uns me escutam, outros me ouvem...

Uns me olham, outros me vêem...

Uns me deixam alegres, outros me fazem felizes...

Uns são companheiros, outros irmãos...

*Porém todos, sem exceção, me ajudaram, cada um de sua forma, a vencer esta
etapa. Obrigada!*

AGRADECIMENTOS

A Beatriz Akemi Noma pela imensa ajuda prestada durante seu estágio de iniciação científica.

Ao meu grande amigo John Anthony McCulloch pela paciência, atenção e amizade.

A Antonio Fernandes Filho pela alegria contagiante que ajuda a enfrentar o dia-a-dia. Ainda que distante, sua amizade será eterna para mim.

Ao Dr. Keichi Hiramatsu e Dra. Teruyo Ito da Universidade de Juntendo (Japão) pela doação de materiais e conhecimentos importantes para a realização deste trabalho.

Aos colegas de laboratório Ana Carolina, Juliana, Carla, José Antônio, Diogo, Nilton e Marco. Pela amizade, companheirismo, por sempre estarem dispostos a ajudar e pela convivência harmoniosa.

A Marina Baquerizo Martinez pelos bons momentos de convívio e pelas oportunidades oferecidas. Meu carinho e admiração.

Às estagiárias que passaram pelo laboratório neste período: Gabriela, Ana Paula e Maria Fernanda. Obrigada pela ajuda.

Abreviaturas

AMC - amoxicilina - ácido clavulânico

AMP - ampicilina

ATCC – “American Type Culture Collection”

CA-ORSA - *Staphylococcus aureus* resistente a oxacilina adquirido na comunidade

CEB - Clone Endêmico Brasileiro

CHEF – “Clamped Homogeneous Electric Field”

CHL - cloranfenicol

CIP - ciprofloxacina

EDTA - Ácido Etileno Diamino Tetracético

ERY - eritromicina

GEN - gentamicina

MLST – “Multilocus Sequence Typing”

MM - Massa Molecular

MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina

OSSA - *Staphylococcus aureus* sensível a oxacilina

NAG - N - acetilglicosamina

NAM - Ácido N-acetilmurâmico

NCCLS – “National Committee for Clinical Laboratory Standards”

NCTC – “National Collection of Type Culture”

ORSA - *Staphylococcus aureus* resistente a oxacilina

OXA - oxacilina

PBP - Proteína de Ligação à Penicilina

PCR - Reação em cadeia da Polimerase

PFGE – “Pulsed Field Gel Eletrophoresis” (Eletroforese de Campo Pulsado)

RFLP-PCR – “Restriction Fragment Length Polymorphisms” (Reação em cadeia da Polimerase com Restrição dos Fragmentos Polimórficos Obtidos)

RTD – “Routine Test Dilution” (Diluição utilizada nos testes de Rotina)

SCC*mec* - Cassete Cromossômico Estafilocócico *mec*

SXT - sulfametoxazol - trimetoprim

TBE - Tampão Tris/Borato/EDTA

TET - tetraciclina

Tn - Transposon

TSN – “The Surveillance Network”

TOB - tobramicina

UFC - Unidade Formadora de Colônia

VAN - vancomicina

VISA - *Staphylococcus aureus* com resistência intermediária a vancomicina

Sumário

1 - INTRODUÇÃO	01
1.1 - Mecanismo de Resistência	02
1.1.1. Resistência a penicilina	02
1.1.2. Resistência a oxacilina	03
1.2 - O gene <i>mec A</i>	05
1.3 - Epidemiologia	11
1.4 - ORSA na comunidade	13
1.5 - Desenvolvimento de resistência a vancomicina	15
1.6 - Correlação genética do complexo SCC <i>mec</i> e a reclassificação epidemiológica de linhagens ORSA	17
 2 - OBJETIVOS	 18
2.1. Geral	18
2.2. Específicos	18

3 - MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1 - Amostras bacterianas	19
3.2 - Antibiograma	21
3.3 - Triagem para confirmação de resistência a oxacilina	22
3.4 - Fagotipagem	22
3.4.1 - Leitura e interpretação dos resultados da fagotipagem	23
3.5 - Obtenção do DNA genômico	24
3.6 - Reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação das estruturas gênicas pertencentes ao <i>SCCmec</i>	25
3.6.1. Reação em cadeia da polimerase para amplificação do gene <i>coa</i>	26
3.7 - Eletroforese em gel de agarose	27
3.8 - Estudo do polimorfismo de restrição do gene <i>coa</i> com enzima de restrição	27
3.8.1. Digestão do produto amplificado	27
3.9 - Determinação do tamanho dos fragmentos do DNA	28
3.10 - Análise do DNA cromossômico por eletroforese de campo pulsado	29
3.10.1. Eletroforese de campo pulsado	30
4 - RESULTADOS	32
4.1 - Triagem para verificação de resistência a oxacilina	32
4.2 - Resultado de PFGE das cepas estudadas	32

4.3 - Determinação da classe estrutural do	
complexo <i>SCCmec</i> das cepas ORSA	33
4.4 - Determinação da concentração	
inibitória mínima (CIM- $\mu\text{g/mL}$)	35
4.5 - Resultado de Fagotipagem de cepas ORSA	37
4.6 - Tipagem do gene da coagulase (<i>coa</i>) por RFLP.....	40
4.6.1. Amplificação do gene <i>coa</i>	40
4.6.2. Restrição pela enzima Alu-I.....	40
4.7 - Resumo dos resultados mais relevantes	39
 5 - DISCUSSÃO	 42
 6 - CONCLUSÕES	 55
 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 56
 8 - ANEXOS	 68
8.1 - Anexo 1: Relação dos hospitais e suas localizações	68
8.2 - Anexo 2: Tabela com os resultados das tipagens	
de todas as 50 cepas estudadas	70

Índice de tabelas e quadros

Tabela 1 - Procedência das cepas estudadas	20
Tabela 2 - Iniciadores utilizados na amplificação das estruturas do SCCmec	25
Tabela 3 - Critérios adotados para a interpretação do PFGE	31
Tabela 4 - Perfis de sensibilidade	35
Tabela 5 - Perfil de sensibilidade de 11 cepas representantes de cada clone ORSA e VISA provenientes de hospitais de diversas regiões brasileiras	36
Tabela 6 - Distribuição percentual dos diferentes grupos fágicos encontrados com as 50 cepas estudadas	37
Tabela 7 - Distribuição dos diferentes perfis de RFLP do gene da coagulase (<i>coa</i>) e a classificação estrutural do SCCmec e sensibilidade a antimicrobianos de acordo com os perfis de PFGE encontrado em linhagens de <i>S. aureus</i> provenientes de diversas regiões brasileiras	39
Quadro 1 - Estruturas dos tipos I, II e III de SCCmec	10

Índice de figuras

Figura 1 - Peptídeos das cadeias de peptidoglicanos interligados por cadeia pentaglicina lateral.....	04
Figura 2 - Mecanismos de resistência aos antibióticos beta-lactâmicos	05
Figura 3 - Regulação da produção de beta-lactamases e PBP2' em <i>S. aureus</i> . a. Regulação gene <i>blaZ</i> ; b. Regulação gene <i>mecA</i>	06
Figura 4 - Estrutura dos tipos de SCCmec I, II e III	09
Figura 5 - Estrutura do SCCmec tipo IV em comparação com tipo I	14
Figura 6 - Fragmentos obtidos com a amplificação dos genes <i>ccr</i>	34
Figura 7 - Fragmento amplificado da IS1272	34
Figura 8 - Perfil de restrição dos fragmentos do gene <i>coa</i> obtidos com a enzima Alu-I	38

Resumo

Os tipos de cassete cromossômico estafilocócico *mec* (SCC*mec*) encontrados em cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a oxacilina (ORSA) isoladas em ambiente hospitalar são denominados I, II e III. Um novo SCC*mec*, tipo IV, foi identificado em cepas isoladas de pacientes que não tinham conexão aparente com hospitais. Essas cepas, denominadas ORSA adquiridas na comunidade ou CA-ORSA, não costumam conter genes de resistência a antimicrobianos além do gene *mecA*, porém, são mais virulentas. Com a finalidade de conhecer a diversidade estrutural do SCC*mec* de cepas ORSA brasileiras, foram estudadas 50 cepas ORSA, entre elas algumas *S. aureus* com resistência intermediária a vancomicina (VISA) e *S. aureus* com resistência heterogênea intermediária a vancomicina (HVISA). As cepas foram isoladas entre 1995 e 2000, provenientes de hospitais de 13 Estados brasileiros, pertencentes a diversos clones de PFGE. As cepas foram analisadas quanto ao perfil de sensibilidade, RFLP do gene da coagulase, fagotipagem e tipagem do SCC*mec*. A maioria das cepas é pertencente ao clone endêmico brasileiro, que carrega o SCC*mec* tipo III, também presente em outros clones de PFGE. O SCC*mec* tipo IV, encontrado em 3 cepas (clones J, L e D), mostrou suscetibilidade a um maior número de antimicrobianos pertencentes a diferentes classes, em comparação aos outros tipos de SCC*mec*. O SCC*mec* tipo IV está presente entre os ORSA brasileiros e pode estar disseminando na comunidade e hospitais do país.

Abstract

The types of SCC*mec* found in nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains can be designated type I, II or III. A novel type of SCC*mec*, designated type IV, was identified in strains isolated in outpatients. These strains, called community-acquired MRSA or CA-MRSA, do not contain antimicrobial resistance genes other than *mecA*, however, they are more virulent. In order to characterise the structural diversity of SCC*mec* in Brazilian MRSA strains, 50 MRSA strains were studied, including some vancomycin intermediate resistant *S. aureus* (VISA) and heterogeneous vancomycin intermediate *S. aureus* (HVISA) strains. All strains were isolated between 1995-2000, in hospitals in 13 Brazilian States, and belonged to different PFGE clones. Strains were analysed as to their susceptibility profile, RFLP of the coagulase gene, phagetype and SCC*mec* type. The majority of strains belonged to the Brazilian Endemic Clone, which carries an type III SCC*mec*, which in turn, was also found in other PFGE clones. The type IV SCC*mec* was found in 3 strains (belonging to the J, L and D clones) and presented a susceptibility profile to a number of drugs of different antimicrobial classes. The type IV SCC*mec* is present among Brazilian MRSA strains and can be disseminated in the community and in hospitals throughout the country.

1 . Introdução

O gênero *Staphylococcus* pertence à família *Micrococcaceae*. É composto de 27 espécies amplamente distribuídas na natureza, dos quais a espécie *Staphylococcus aureus* é a mais importante (HOLT, *et al.*, 1994).

S. aureus é um coco Gram-positivo, anaeróbio facultativo, com cerca de 1 μ m de diâmetro, não-móvel, não-esporulado, catalase positivo e geralmente encapsulado. As células bacterianas se dispõem em cachos irregulares semelhantes a cachos de uva. Possuem a parede celular suscetível à ação da enzima lisostafina e resistente a lisozima. Conseguem crescer em concentrações salinas de até 7,5%. Expressam muitas proteínas de superfície e proteínas extracelulares, potentes fatores de virulência (BROOKS *et al.*, 1998).

A proteína A é um componente da parede celular de muitas cepas de *S. aureus*, que se liga à fração Fc das moléculas de IgG, o que neutraliza a ação do anticorpo contra a bactéria. O *S. aureus* produz ainda várias enzimas que contribuem para a sua virulência, como a coagulase livre e ligada ("clumping factor"), desoxirribonucleases, proteases, collagenases, fibrinolisinases, hialuronidases, beta-lactamases, lipases e fosfolipases. Estas bactérias também produzem quatro hemolisinas dos tipos α , β , γ e δ . As α -hemolisinas são as mais potentes e possuem efeito letal sobre uma ampla variedade de células do hospedeiro. Estes microrganismos produzem inúmeras toxinas como a leucocidina que tem efeito tóxico sobre a membrana de leucócitos polimorfonucleares, o que leva à morte da célula; hialuronidase, estafiloquinase, toxinas esfoliativas A e B, (síndrome da pele escaldada), enterotoxinas A, B, C, D, e E (responsáveis pelos sintomas clínicos produzidos pelas intoxicações alimentares e a toxina responsável pela síndrome do choque tóxico (KONEMAN *et al.*, 1999). Muitas das toxinas são codificadas em genes encontrados em plasmídeos e outras são encontradas no cromossomo da bactéria (BROOKS *et al.*, 1998).

Algumas toxinas funcionam como superantígenos, o que resulta na ativação da cascata de complemento e de coagulação, indução de febre, hipotensão, anorexia, aumento da frequência cardíaca e respiratória, acarretando hemorragias, choque séptico com colapso respiratório e falência de vários órgãos (JOHN & NEIL, 1996).

O *S. aureus* geralmente pertence a microbiota da pele e nariz de pessoas saudáveis. Podem causar uma ampla gama de doenças, incluindo endocardites, osteomielites, intoxicação alimentar, furúnculos e carbúnculos. Seja qual for a localização da infecção (pele, ossos ou válvulas cardíacas), as infecções estafilocócicas são piogênicas devido aos fatores de virulência mencionados e causam destruição local do tecido infectado. Se o indivíduo infectado estiver debilitado por doença crônica, trauma físico, queimadura ou se for imunodeficiente, uma infecção por *S. aureus* pode evoluir para infecções sistêmicas como septicemias, pneumonias e meningites (BOYCE, 1989).

1.1 Mecanismo de resistência

1.1.1. Resistência a penicilina

Quando a penicilina, representante do grupo de antibióticos beta-lactâmicos, começou a ser usada na década de 40, o problema das doenças infecciosas parecia estar solucionado. Porém, logo os microrganismos se adaptaram através da aquisição de resistência à droga. Tem início então uma batalha que perdura até os dias atuais e desafia a ciência no desenvolvimento de novas drogas e mecanismos para burlar a resistência bacteriana.

Com a aquisição de plasmídeos contendo genes que codificavam a produção de beta-lactamases os *S. aureus* se tornaram resistentes aos beta-lactâmicos. No final da década de 50 foram desenvolvidas penicilinas sintéticas resistentes às beta-lactamases, como a oxacilina e a meticilina. A batalha parecia estar sob controle. Todavia, na Inglaterra em 1961, JEVONS (citado por HIRAMATSU *et al.*, 2002) relatou a detecção de uma cepa de *S. aureus* resistente a oxacilina apenas um ano após a introdução da primeira penicilina sintética. Essas cepas são denominadas internacionalmente como MRSA ("methicillin resistant" *Staphylococcus aureus*) ou ORSA ("oxacillin resistant"

Staphylococcus aureus) e estão presentes em hospitais do mundo inteiro como uma das principais causas de infecção hospitalar, sendo um grande problema de ordem de saúde e econômica (DAUM *et al.*, 2002; OKUMA *et al.*, 2002; MA *et al.*, 2002).

1.1.2 Resistência a oxacilina

A meticilina/oxacilina é um antibiótico beta-lactâmico que não é hidrolizado por pequenas quantidades de penicilinase estafilocócica. Entretanto, clones produtoras de grandes quantidades de beta-lactamases tendem a ser resistentes aos efeitos da oxacilina através da hidrólise parcial do antibiótico, apresentando sensibilidade chamada limítrofe ou "borderline", com valores de concentração inibitória mínima (CIM) na categoria intermediária. Outro mecanismo de resistência limítrofe a beta-lactâmicos envolve alterações das proteínas ligadoras de penicilinas ou PBP ("penicillin-binding protein") (HIRAMATSU, 1995). *S. aureus* possuem no mínimo quatro diferentes PBPs, chamadas 1, 2, 3 e 4 (GIESBRECHT, *et al.*, 1988).

O alvo primário dos beta-lactâmicos são essas PBPs, enzimas que estão ancoradas na membrana citoplasmática e estão envolvidas nos últimos estágios da biossíntese da parede celular. Elas são responsáveis pela polimerização dos peptídeos das cadeias de peptidoglicanos, que em *S. aureus* são interligadas por uma cadeia pentaglicina lateral (figura 1). Os antibióticos beta-lactâmicos, por serem análogos estruturais de resíduos D-alanil-D-alanina, se ligam covalentemente ao receptor da PBP inibindo sua função de transpeptidase.

Figura 1 - Peptídeos das cadeias de peptidoglicanos interligados por cadeia pentaglicina lateral

Adaptado de FORBES *et al.* Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 1998.

A resistência aos antibióticos beta-lactâmicos é determinada pela função da PBP2a ou PBP2'. Essa PBP alterada é produzida em conjunto com as PBPs normais da célula (ITO, 2001). A PBP2' reconhece os resíduos de peptidoglicano, mas não liga os antibióticos beta-lactâmicos com alta afinidade como as PBPs normais (figura 2). Recentes estudos indicam que PBP2' requer o domínio glicosiltransferase da PBP2, uma das quatro PBPs nativas do *S. aureus*, para a expressão da resistência a oxacilina. Isto sugere que a síntese da parede celular é coordenada através de uma intrincada interação entre múltiplas moléculas de PBPs (HIRAMATSU *et al.*, 2002).

Figura 2 - Mecanismos de resistência aos antibióticos beta-lactâmicos

Adaptado de FORBES *et al.* Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 1998.

1.2. O gene *mecA*

As PBP2' são codificadas por um gene chamado *mecA*, presente no cromossomo do *S. aureus*. O gene *mecA* está localizado entre os genes *gyr* (codifica DNA girase) e *spa* (codifica proteína A).

Acompanham o gene *mecA* um conjunto de genes regulatórios. Os genes *mecR1* e *mecI* promovem, respectivamente, a indução e a inibição da expressão do *mecA* (WELLER *et al.*, 1999). Os produtos destes genes são similares aos produtos dos genes *blaR1* e *blaI* que regulam a expressão do gene responsável pela produção de beta-lactamases na resistência às penicilinas, o gene *blaZ* (DICKINSON *et al.*, 2000). Devido a essa similaridade pode haver a co-repressão do gene *mecA* pelos genes regulatórios do gene *blaZ* (ROSATO *et al.*, 2003). (Figura 3)

Figura 3 - Regulação da produção de beta-lactamases e PBP2' em *S. aureus*. a. Regulação gene *blaZ*; b. Regulação gene *mecA*

Adaptado de LOWY, F.D. *Journal of Clinical Investigation*. v.111, 2003

O gene *mecA* está inserido em um elemento genético que varia de 21 a 67 kb, chamado Cassete Cromossômico *mec*, o SCC*mec* (HIRAMATSU *et al.*, 2001). A aquisição desse elemento genético é condição necessária para que uma cepa de *S. aureus* seja considerada ORSA e, conseqüentemente, considerado clinicamente resistente a toda a classe de antibióticos beta-lactâmicos.

O estudo do cromossomo de cepas ORSA revelou que essa porção do segmento de DNA cromossômico (>30kb) que carregava o gene *mec* não tinha equivalência alélica em cepas de OSSA. Este segmento passou a ser chamado “DNA adicional” ou “*mec* DNA” e hoje é amplamente conhecido por Cassete cromossômico estafilocócico *mec* (SCC*mec*) (BECK *et al.*, 1986; CHIKRAMANE *et al.*, 1991; DUBIN *et al.*, 1991; SKINNER *et al.*, 1988; KATAYAMA *et al.*, 2000).

Uma cepa de *S. aureus* que possui um SCC*mec* completo, contém todos os genes reguladores *mecR1* e *mecI* intactos, é chamado de pré-ORSA. Estando intacto, o produto do gene *mecI* reprime fortemente a expressão da PBP2'. Portanto, o pré-ORSA é

aparentemente sensível a beta-lactâmicos. A partir do momento que houver uma deleção ou mutação no *mecI* que interfira em sua expressão, o pré-ORSA expressará sua resistência (KOBAYASHI *et al.*, 1998).

Em qualquer caso, a de - repressão da transcrição do gene *mecA* faz a célula do *S. aureus* expressar resistência a oxacilina. Entretanto, produção irrestrita de PBP2' não faz a cepa de ORSA ser totalmente resistente aos antibióticos beta-lactâmicos. Ao invés, apenas pequenas populações da cepa expressam uma alta resistência aos beta-lactâmicos. O padrão de resistência a oxacilina varia conforme as subpopulações. A cepa poderá conter células com vários níveis de resistência a oxacilina; daí ser considerada como tendo resistência heterogênea a oxacilina e ser designada Hetero-ORSA. Hetero-ORSA contém subpopulações altamente resistentes a oxacilina em uma frequência de 10^{-6} - 10^{-4} UFC/mL. Quando as subpopulações são isoladas por seleção com oxacilina e submetidas à análise populacional, mostram uma população menor com uma curva homogênea, o que significa que as cepas são compostas de uma população homogênea de células expressando alta resistência a oxacilina. Neste caso, são designadas de cepas Homo-ORSA.

A estrutura que rodeia o *mec* DNA sugere que a integração no cromossomo se dá através do processo de recombinação. Observou-se que o *mec* podia se movimentar do cromossomo para um plasmídeo (pI524) e sugeriu-se a possibilidade do *mec* poder fazer parte de um elemento genético móvel (transposon) (TREES & IANDOLO, 1988). Como um possível elemento genético móvel, por seu tamanho (aproximadamente 52kb), o *mec* DNA foi comparado apenas a alguns bacteriófagos, transposons conjugativos ou ilhas de patogenicidade (IPs) (CLEWELL, 1998; QUINTILIANI *et al.*, 1995).

Para efetuar a movimentação o SCC*mec* leva consigo dois genes específicos designados *ccrA* e *ccrB* ("Cassette chromosome recombinase" A e B), que codificam recombinases da família invertase/resolvase. Na presença do *ccrA* e *ccrB*, o SCC*mec* integra-se no cromossomo, na orientação correta, podendo também ser excisado do mesmo.

Os genes *ccrA* e o *ccrB*, junto com as chamadas fases abertas de leitura ou "open reading frame" (ORF), constituem o complexo de genes *ccr* que é conservado entre todos os tipos de elementos SCC*mec* identificados até o momento. Há três homólogos para cada um dos genes *ccr*; três dos quais correspondem aos elementos SCC*mec* que são identificados em cepas ORSA isoladas de pacientes hospitalizados. Cada SCC*mec*

transporta uma combinação característica de complexos *ccr* e *mec*. A isotipagem dos genes *ccr* é usada para classificar o tipo de SCC*mec* no qual o gene *mecA* está inserido. A classe do complexo gene *mec* é usada em combinação com a tipagem do complexo *ccr* para classificar o SCC*mec* (HIRAMATSU, 2002).

Entretanto, o tamanho, estrutura e propriedades biológicas do *mec* DNA permaneciam desconhecidas até que Ito *et al.* (1999) clonaram e seqüenciaram o *mec* DNA completo da cepa N315 (cepa ORSA isolada no Japão em 1982). Em 2001, Ito *et al.* estudaram o SCC*mec* de outras cepas e descreveram outros dois tipos diferentes de SCC*mec*. As cepas utilizadas foram a NCTC10442 (o primeiro isolado de ORSA na Inglaterra em 1961) e 85/2082, isolada em 1985 na Nova Zelândia. Os diferentes tipos estruturais de SCC*mec* são denominados por ordem cronológica como tipo I (NCTC10442), tipo II (N315) e tipo III (85/2082). (Figura 4)

Figura 4 - Estrutura dos tipos de *SCCmec* I, II e III Hiramatsu *et al.* Trends in Microbiology. v.9, n10, oct, 2001

No tipo III *SCCmec* há outra cópia truncada de um gene *ccr* em adição ao complexo 3 do gene *ccr* e uma repetição direta de 15 pb entre duas inserções *IS431*. Isto sugere que o *SCCmec* tipo III surgiu de dois *SCCmec* que se fundiram em algum momento do passado.

O tipo-I de *SCCmec*, representado pela mais antiga cepa ORSA (NCTC10442), não contém nenhum gene adicional de resistência além do gene *mecA*. O complexo *mec* é parcialmente deletado na região acima do gene *mecA*, deixando apenas a parte 5' do gene *mecR1*, e o resto dele recolocado por uma cópia truncada da *IS1272* que fica perto do ponto de deleção (designado complexo *mec* classe B) (HIRAMATSU, 2002).

Encontraram-se no *SCCmec* apenas genes de resistência a antibióticos conferindo à cepa uma vantagem seletiva à pressão do ambiente. É possível que o elemento primordial carresse genes essenciais ou "housekeeping" do precursor que foram deletados devido à redundância com genes cromossômicos. Essa observação se originou pela presença de 28

ORFs que, com exceção dos genes de resistência, estão parcialmente deletados. Essas regiões são chamadas de regiões J ou "Junkyards". Algumas partes das regiões J podem ter valor para a célula, por exemplo, contribuindo para a aquisição de resistência múltipla a drogas.

O tipo-II e o tipo-III de SCC*mec* transportam em comum o complexo gene *mec* classe A, com o tipo 2 e tipo 3 do complexo *ccr*, respectivamente, e são encontrados nas cepas mais recentes que prevalecem desde a década de 70. Estas cepas contêm múltiplos genes de resistência a drogas conferindo resistência aos aminoglicosídeos, macrolídeos, tetraciclina, cádmio, mercúrio, etc. Os genes de resistência às drogas são encontrados em transposons e plasmídeos integrados no elemento SCC*mec*, conseqüentemente, eles são maiores que o SCC*mec* tipo-I. Ambos os tipos II e III possuem os genes regulatórios *mecR1* e *mecI*, constituindo o complexo SCC classe A. Evidências indicam que a inativação mutacional do gene *mecI* é um passo necessário para o desenvolvimento de resistência (ITO, *et al.*, 2001). O quadro abaixo mostra as estruturas que compõem cada um dos tipos de SCC*mec*.

Quadro 1 - Estruturas dos tipos I, II e III de SCC*mec*

SCC <i>mec</i>	Estruturas gênicas		Classe estrutural	genes <i>ccr</i>
	<i>mecI-mecR1</i>	IS1272		
I	ausência	presença	B	1
II	presença	ausência	A	2
III	presença	ausência	A	3

O complexo SCC*mec* é amplamente distribuído entre as espécies de *S. aureus* bem como entre outras espécies estafilocócicas coletivamente chamadas estafilococos coagulase negativa (C-NS) (HURLIMANN-DALEI *et al.*, 1992; RYFFEL *et al.*, 1990; SUZUKI *et al.*, 1992, 1993). Duas hipóteses são usadas para tentar explicar a origem de cepas ORSA. A associação do gene *mec* com linhagens geneticamente diversas de *S. aureus*, em conjunto com dados indicativos, que o gene *mec* é transferido horizontalmente no laboratório, gera a hipótese que as cepas ORSA se desenvolveram em períodos diferentes

por transferência lateral de genes do elemento *mec* em cepas oxacilina-sensíveis filogeneticamente diferentes (FITZGERALD *et al.*, 2001). Em contrapartida, dados obtidos através do estudo de ORSA pela análise por RFLP com sondas para *mecA* e *Tn554* foram interpretados como se ORSA tivesse se desenvolvido a partir de um clone sensível que adquiriu o elemento *mec* e subsequente gerou diversidades cromossômicas (KREISWIRTH *et al.*, 1993). O número de vezes que essas peças de DNA estranho foram introduzidas entre as espécies de *S. aureus* e o mecanismo pelo qual essa aquisição ocorreu continuam desconhecidas até o momento (CRISOSTOMO *et al.*, 2001).

Em alguns estudos (ARCHER, *et al.*, 1996; SUZUKI *et al.*, 1992) sugeriu-se que o *mec* seria livremente transmitido entre as espécies estafilocócicas. Através de experimentos genéticos clássicos demonstrou-se que o *mec* não é transferido entre cepas de *S. aureus* por conjugação (LACEY *et al.*, 1972). Já outros estudos relatam a possibilidade do *mec* ser transferido mediante um bacteriófago (transdução) (COHEN & SWEENEY, 1970).

1.3 Epidemiologia

O uso de antibióticos criou um ambiente altamente seletivo fazendo com que as bactérias, entre elas o *S. aureus*, fossem selecionadas ao longo do tempo permitindo o surgimento de clones multi-resistentes.

Medidas de controle de infecções hospitalares pouco eficazes ou mal executadas permitiram que esses clones se disseminassem, através de carreadores, entre os pacientes de diferentes hospitais. Em contrapartida, a facilidade atual dos deslocamentos humanos colaborou para que os clones cruzassem rapidamente as barreiras geográficas e se espalhassem por todas as áreas do planeta.

Dados do TSN ("The Surveillance Network") (JONES *et al.*, 2003) relatam a taxa de incidência de ORSA em 2001 de 44,4; 34,7; 12,4; 41,8 e 32,4% respectivamente nos seguintes países: Estados Unidos (EUA), França, Alemanha, Itália e Espanha. A maior parte dos ORSA apresentaram resistência cruzada com outras classes de antibióticos, exceto a vancomicina (100% de sensibilidade). Resistência a sulfametoxazol-trimetoprim

com níveis de 1,7% (França) a 15,9% (Itália) e a gentamicina com níveis de 12,2% (França) a 87% (Itália).

No Brasil, em 1993 e 1994 cerca de 70% dos *S. aureus* isolados em ambientes hospitalares apresentaram resistência a oxacilina (SADER *et al.*, 1993; CAIAFFA *et al.*, 1994). Em estudos de incidência de ORSA em pacientes com bacteremia hospitalar os valores chegaram a 63% e 73% (CONTERNO *et al.*, 2002; MOREIRA *et al.*, 1998). Mais recentemente, de acordo com o programa SENTRY, o *S. aureus* foi o patógeno de maior ocorrência dentre os isolados entre 1997 e 1999 de 12 hospitais localizados em 4 Estados (São Paulo, Rio de Janeiro, Santa Catarina e Rio Grande do Sul). Em geral, 34% dos *S. aureus* isolados foram resistentes a oxacilina. Ainda, resistência cruzada a outras classes de antibióticos foi muito comum entre essas cepas (SADER *et al.*, 2001). Em hospitais que possuem unidades de queimados os índices de ORSA podem chegar a mais de 95% (OLIVEIRA, 2002).

Outro estudo mais abrangente do SENTRY, com dados coletados entre 1997 e 1998 em países da América Latina (Brasil, Argentina, Chile, Colômbia, México, Uruguai e Venezuela) também demonstrou a incidência de ORSA. Em 1.642 casos de septicemia, 21% foram atribuídos ao *S. aureus* dos quais 29% eram resistentes a oxacilina. Em casos de infecção do trato respiratório inferior em pacientes hospitalizados, 23% foram causados por *S. aureus*, dentre os quais 50% mostraram resistência a oxacilina (SOUSA *et al.*, 2001).

1.4. ORSA na comunidade

Infecções por ORSA começaram a ser relatadas entre grupos de pacientes que não tinham conexão aparente com hospitais (CHAMBERS, 2001). MA *et al.*, (2002) identificaram um novo tipo de SCC*mec*, desta vez em cepas isoladas da comunidade, chamadas CA-ORSA. O novo SCC*mec* foi denominado tipo IV e possui aproximadamente 24Kb. Daum *et al.* (2002) consideram que o tamanho pequeno do SCC*mec* tipo IV facilita o carreamento por plasmídeos e bacteriófagos.

Esse novo elemento SCC*mec* tem uma nova combinação de um tipo 2 de complexo *ccr* e uma classe B de complexo *mec* (figura 5). O SCC*mec* tipo IV não transporta consigo nenhum gene de resistência além do *mecA*, que é consistente com a maior característica do CA-ORSA: a susceptibilidade a muitos antibióticos não beta-lactâmicos. Em contrapartida, apresentam dezenove genes adicionais relacionados à virulência. Análises subsequentes de cepas CA-ORSA de muitos países confirmam a disseminação do tipo IV de SCC*mec*. Como as cepas CA-ORSA são geneticamente diversas, parece que a essência da questão não é o surto de um clone CA-ORSA, mas a grande disseminação de um tipo de SCC*mec* bem sucedido. Carreado pelas espécies de estafilococos, o SCC*mec* tipo IV pode ser amplamente disseminado entre pessoas saudáveis e substituir os estafilococos comensais por cepas ORSA (HIRAMATSU *et al.*, 2001).

Os três tipos principais de SCC*mec* foram encontrados em mais de 90% de cepas ORSA obtidas e analisadas por HIRAMATSU (2001) em mais de 20 países. Entretanto, este simples quadro vem mudando com relação às análises de cepas ORSA adquiridas na comunidade (CA-ORSA). Este novo tipo de SCC*mec* (tipo IV) é encontrado predominantemente em cepas CA-ORSA nos EUA, Austrália e Japão. (DAUM *et al.*, 2002). (Figura 5)

Figura 5 - Estrutura do SCCmec tipo IV em comparação com tipo I

Relatos recentes de cepas ORSA isoladas de crianças da comunidade levam a especulações de que a epidemiologia do *S. aureus* está mudando (HEROLD, *et al.*, 1998; BOYCE, 1998). O ORSA é reconhecido como um problema para os ambientes hospitalares há pelo menos 20 anos e acredita-se que ORSA tenha surgido na comunidade apenas nos últimos anos (CDC, 2003). É difícil determinar em que momento houve um aumento das infecções por ORSA na comunidade. Entretanto, é claro que alguns dos recentes casos de infecções por CA-ORSA estão associados a cepas que têm algumas propriedades únicas comparadas às cepas tradicionais relacionadas a hospitais, o que sugere que algumas propriedades biológicas (como fatores de virulência) permitam que as cepas CA-ORSA disseminem de forma mais eficiente ou sejam mais patogênicas.

Casos de infecções por ORSA na comunidade são associados com o uso recente de antibióticos, compartilhamento de objetos contaminados, portadores de doenças recorrentes de pele, e moradores de locais muito populosos. Nos relatos mais antigos

(GROSS-SCHULMAN *et al.*, 1998; L'HERITEAU *et al.*, 1999), isolados de ORSA na comunidade afetavam pessoas com fatores de risco conhecidos para colonização, enquanto em relatos mais recentes há casos de colonização e transmissão em populações sem esses fatores. Casos de infecções da pele causadas por ORSA são descritos entre usuários de drogas injetáveis (SARAVOLATZ *et al.*, 1982); aborígenes no Canadá (EMBIL *et al.*, 1994), Nova Zelândia (RINGS *et al.*, 1998) e Austrália (MAGUIRE *et al.*, 1996; COLLIGNON *et al.*, 1998); praticantes de esportes de contato direto (LINDENMAYER *et al.*, 1998; STACEY *et al.*, 1998); membros de clubes esportivos (CDC, 2003); homossexuais e outras populações (KALLEN *et al.*, 2000; FEDER, 2000). A maioria das transmissões nesses ambientes ocorreu a partir de pessoas com infecções de pele ativas por ORSA. Mas a atenção pública se voltou para a gravidade desses patógenos quando quatro crianças nos Estados Unidos foram a óbito devido a essas infecções (CDC, 1999).

Estes relatos de infecção e colonização em pessoas da comunidade evidenciam que cepas ORSA, como os *S. aureus* produtores de penicilinas há 30 anos atrás, vêm ganhando espaço na comunidade e surgem como patógenos importantes (CHAMBERS, 2001).

As cepas adquiridas na comunidade possivelmente emergiram como consequência de uma dessas raras transferências de *mec* de um doador nosocomial para um recipiente suscetível. Com apropriadas análises do SCC*mec* e do cromossomo recipiente é possível avaliar a evolução desses clones.

1.5 Desenvolvimento de resistência a vancomicina

Uma infecção prévia por ORSA é uma das condições que predis põem o desenvolvimento de infecções por VISA, além de condições de saúde precárias (diabetes e doenças renais), uso de cateteres, hospitalização recente e exposição recente a vancomicina e outros agentes antimicrobianos (CDC, 2003).

A vancomicina, disponível desde 1956, apresenta-se como um dos últimos recursos disponíveis para tratamento de ORSA. As cepas VISA são definidas pelo NCCLS (2003) como *S. aureus* que requer concentrações de 8 a 16 µg/mL de vancomicina para inibição do crescimento. Resistência a vancomicina é definida por CIM $\geq$ 32 µg/mL. A resistência a

vancomicina pode ser devido a dois mecanismos: engrossamento da parede celular, que confere níveis de resistência não muito elevados, e o gene *van*, que pode conferir altos níveis de resistência (OLIVEIRA, 2002).

Em 1996, Hiramatsu *et al.* isolaram duas cepas de ORSA, a Mu3 e a Mu50, de pacientes de um hospital no Japão que não respondiam ao tratamento com vancomicina. As cepas representam dois estágios evolucionários de resistência a vancomicina e foram designadas como hetero-VISA e VISA respectivamente. Cepas hetero-VISA são relatadas por muitos estudos em diversos países, o que indica que o problema é global (TRAKULSOMBOON *et al.*, 2001; SOARES *et al.*, 2000). No Brasil, o primeiro relato do isolamento de múltiplas cepas VISA em um hospital foi descrito por OLIVEIRA *et al.* (2001). O isolamento dessas cepas foi feito em um período de tempo relativamente curto o que caracterizou um surto. Numa era em que o surgimento de novos antibióticos não garante a eliminação deste agente, a emergência de tais cepas promete um futuro preocupante.

Assim como em hospitais, a transmissão internacional de ORSA parece ser mediada de pessoa para pessoa. Deslocamentos de seres-humanos e modelos de terapêutica utilizados em determinadas regiões podem estar relacionados à prevalência de certos clones em determinadas regiões.

1.6. Correlação genética do complexo SCC*mec* e a reclassificação epidemiológica de linhagens ORSA.

O ORSA tem vencido todos os antibióticos avaliados e estabeleceu-se como um dos mais importantes patógenos, dada a sua flexibilidade genética. Além disso, é possível prever a enorme chance de aquisição de resistência a qualquer antibiótico que possa ser desenvolvido no futuro (HIRAMATSU *et al.*, 2001).

As técnicas moleculares são usadas em estudos epidemiológicos de ORSA para melhorar a compreensão das relações evolutivas entre seus clones. Porém, após todos esses estudos percebe-se que a caracterização completa de ORSA requer não apenas tipagens genéticas, mas também conhecimento da estrutura do complexo SCC*mec* incorporado no genoma. Através da exploração de genomas de diferentes clones de *S. aureus* pode-se encontrar uma diversidade de tipos estruturais de SCC*mec*, que poderá nos auxiliar a compreender a pressão fisiológica seletiva exercida pelo ambiente e o modo pelo qual as espécies estafilocócicas trocam informações genéticas.

É provável que haja a presença de CA-ORSA entre cepas de ORSA disseminadas pelo país. A questão não é se a resistência ocorrerá, mas o quão prevalente ela se tornará com o passar do tempo. A falta de informações na literatura nacional referentes à caracterização da estrutura do complexo SCC*mec* de variadas linhagens ORSA isoladas de pacientes provenientes de hospitais brasileiros, nos incentivou a reexaminar a relação existente não só com o clone endêmico brasileiro, mas com os demais clones identificados em estudos epidemiológicos prévios realizados em nosso laboratório.

2 . *Objetivos*

2.1 GERAL

Conhecer as classes estruturais do gene *mecA* e sua relação com os diferentes fenótipos e genótipos de cepas endêmicas de *S. aureus* brasileiras de origem hospitalar, resistentes a oxacilina e a vancomicina.

2.2 ESPECÍFICOS

- Caracterizar o cassete estafilocócico cromossômico *mec* (SCC*mec*) através da técnica de Reação em cadeia da polimerase (PCR).
- Determinar perfis fenotípicos de cepas ORSA por meio de Fagotipagem e resistência qualitativa e quantitativa frente a diferentes antimicrobianos.
- Determinar os perfis genotípicos por meio de eletroforese em campo pulsado-PFGE, polimorfismo de tamanhos dos fragmentos de restrição - RFLP do gene *coa* e pela classificação estrutural do complexo SCC*mec*.

3 . *Materiais e métodos*

3.1 Amostras bacterianas

No presente estudo foram utilizadas 50 cepas de *Staphylococcus aureus* pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Referência Nacional de Fagotipagem de *S. aureus* da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. As cepas são provenientes de 21 laboratórios de microbiologia de hospitais públicos e privados, com mais de 250 leitos, localizados em 13 diferentes estados do Brasil (Anexo 1). Dentre as 50 cepas, 5 cepas são *S. aureus* resistente intermediário a vancomicina (VISA), 11 cepas *S. aureus* com resistência heterogênea a vancomicina (HVISA) e 34 *S. aureus* resistente a oxacilina (ORSA), sendo 2 toxigênicas, pertencentes a diversos clones identificados por PFGE em estudos anteriores (OLIVEIRA, 1998 e 2002). Tais cepas foram isoladas no período entre 1995 e 2000, de materiais clínicos humanos. A relação de hospitais que enviaram as cepas, as cidades e Estados onde se localizam estão descritos na tabela 1.

A escolha das amostras foi baseada na diversidade geográfica e clonal em relação a tipagem por PFGE, na tentativa de estudar a existência entre o tipo de SCC $_{mec}$ e a evolução dos clones da espécie com a finalidade de compreender a maneira pela qual a resistência foi sendo adquirida ao longo do tempo. As cepas VISA e HVISA, como representantes importantes da evolução da resistência em Gram positivos, foram também adicionadas ao estudo com o mesmo propósito.

Tabela 1 - Procedência das cepas estudadas

n	Cepa	Procedência	Material	Enfermaria
01	R35	3SP	Abscesso umbigo	Pediatria
02	R9	2SP	Medula óssea	NI
03	R161	1AM	Secreção abdominal	Pronto Socorro
04	R50	1RS	Aspirado traqueal	Geriatria
05	R5	2SP	Secreção de ferida cirúrgica	NI
06	R267	1ES	Secreção ocular	Berçário
07	BR5	5SP	biópsia de tecido queimado	Queimados
08	BR4	5SP	Exsudato de ferida cirúrgica	Queimados
09	BR3	5SP	biópsia de tecido queimado	Queimados
10	BR2	5SP	biópsia de tecido queimado	Queimados
11	BR1	5SP	biópsia de tecido queimado	Queimados
12	R157	1PR	Líquor	NI
13	R20	2RS	Escarro	Clínica Médica
14	R130	1PA	Lesão vulvar	NI
15	R93	1MG	Sangue	Clínica Médica
16	R153	1PR	Cateter subclavicular	Cirurgia Geral
17	R303	2MS	Secreção traqueal	CTI
18	R416	3DF	Líquor	Pediatria
19	R266	1ES	Secreção ocular	CTI
20	R277	2SC	Secreção peritoneal	Centro Cirúrgico
21	R79	1MS	Secreção de ferida cirúrgica	CTI
22	R106	1SC	Ponta cateter	Clínica Cirúrgica
23	R156	1PR	Sangue	CTI
24	R4	2SP	Secreção de ferida cirúrgica	CTI
25	R21	2RS	Secreção de cateter	Pediatria
26	R229	4SP	Ponta de cateter	Gastroenterologia
27	R16	2RS	Secreção subclavicular	Clínica Médica
28	R181	1AM	Secreção cotovelo	CTI
29	R253	1ES	Secreção parede abdominal	CTI
30	R128	1PA	Secreção dreno torácico	NI
31	R36	3SP	Abscesso	Ortopedia
32	R63	1PE	Secreção de ferida cirúrgica	Pediatria
33	R14	2SP	Abscesso	Ortopedia
34	R222	4SP	Líquido pleural	Cirurgia Torácica
35	R357	2MG	Sangue	Cirurgia Plástica
36	R401	1DF	Aspirado cânula traqueal	Clínica Médica

n	Cepa	Procedência	Material	Enfermaria
37	R257	IES	Cavidade abdominal	Clínica Cirúrgica
38	HV135	5SP	NI	Queimados
39	HV138	5SP	NI	Queimados
40	HV131	5SP	NI	Queimados
41	HV139	5SP	NI	Queimados
42	HV35	5SP	NI	Queimados
43	HV37	5SP	NI	Queimados
44	HV133	5SP	NI	Queimados
45	T482	1SP	NI	NI
46	HV21	5SP	NI	Queimados
47	HV23	5SP	NI	Queimados
48	T511	1SP	NI	NI
49	HV16	5SP	NI	Queimados
50	HV26	5SP	NI	Queimados

NI - Hospital não identificou a amostra quanto ao material; CTI: Centro de terapia intensiva; Procedência ver Anexo 1.

3.2. Antibiógrama

Para avaliação do perfil de sensibilidade das cepas em estudo, foi escolhida pelo menos uma droga de cada classe de antibióticos normalmente utilizados na determinação da sensibilidade de *S. aureus* aos agentes antimicrobianos. Utilizou-se o método de difusão em ágar pela técnica de discos descrita por Kirby-Bauer (1966), conforme padronizado pelo "National Committee for Clinical Laboratory Standards" - NCCLS (2003).

Os seguintes discos de antimicrobianos da marca Oxoid foram testados: oxacilina 1µg, vancomicina 30µg, sulfametoxazol-trimetoprim 25µg, cloranfenicol 30µg, eritromicina 15µg, ampicilina 20µg, tobramicina 10µg, tetraciclina 30µg, gentamicina 120µg e ciprofloxacina 5µg.

Como controle de qualidade da técnica e dos discos de antibióticos empregados foi utilizada uma cepa de *S. aureus* ATCC 25.923, conforme normas preconizadas pelo NCCLS (2003).

A leitura dos halos foi feita no equipamento BIOMIC "video" - Pfizer através do programa WHO NET 4 que converte os valores dos halos em concentração inibitória mínima (CIM).

Para a determinação da CIM dos antibióticos oxacilina e vancomicina o método utilizado foi diluição em ágar, conforme descrito pelo NCCLS (2003).

3.3. Triagem para confirmação de resistência a oxacilina

Todas as amostras foram submetidas a triagem para resistência a oxacilina através do método descrito pelo NCCLS (2003) que utiliza ágar Mueller-Hinton contendo 6µg/mL de oxacilina e 4% de cloreto de sódio (NaCl). O inóculo foi aplicado na placa com auxílio de um "swab" embebido em uma suspensão da bactéria na escala 0,5 de McFarland. A incubação foi realizada a 35°C por exatas 24 horas. A observação de uma ou mais colônias na área de aplicação do inóculo define o resultado como positivo, ou seja, a cepa é resistente a oxacilina.

3.4. Fagotipagem

As amostras foram testadas com os fagos diluídos na RTD ("Routine Test Dilution") e 100xRTD, conforme metodologia padronizada por BLAIR & WILLIAMS (1961). RTD (teste de diluição de rotina) é a diluição de cada fago que provoca lise semiconfluente na respectiva cepa propagadora, ou seja, uma escala abaixo da lise confluyente (lise total das células no local de aplicação dos fagos).

O meio de cultura utilizado na diluição e titulação dos fagos foi o caldo TSB adicionado de cloreto de cálcio na concentração de 400µg/mL. Para a fagotipagem foi utilizado o ágar Mueller-Hinton (DIFCO, Detroit, EUA) adicionado de cloreto de cálcio na mesma concentração citada anteriormente.

As amostras bacterianas a serem fagotipadas foram incubadas em caldo TSB e após o crescimento, diluídas na concentração correspondente à escala 0,5 de McFarland.

A semeadura foi feita por inundação na placa de Petri contendo o ágar Mueller-Hinton. O excesso foi retirado com auxílio de uma pipeta estéril e, após a absorção do inóculo e secagem das placas, os fagos foram depositados na superfície do ágar com o auxílio de um "multi-aplicador de fagos". As placas foram incubadas por 18 horas a 30°C (PARKER, 1983).

Foi utilizado o conjunto básico internacional composto de 23 fagos, adicionado de 6 fagos experimentais. Os bacteriófagos empregados são divididos nos seguintes grupos líticos:

- ❖ Grupo I - 29, 52, 52A, 79, 80
- ❖ Grupo II - 3A, 3C, 55, 71
- ❖ Grupo III - 06, 42E, 47, 53, 54, 75, 77, 83A, 84, 85
- ❖ Grupo V - 94, 96
- ❖ Não classificados - 81, 95
- ❖ Fagos experimentais - 89, 90, HK2, D11, 83C e 932

3.4.1. Leitura e interpretação dos resultados da fagotipagem

A leitura dos resultados foi realizada expondo as placas de Müeller-Hinton contra um fundo luminoso e com ajuda de uma lupa foi realizada a contagem dos plaques. Cada plaque é definido como um halo de inibição do crescimento bacteriano devido à atividade lítica do bacteriófago. Foram obedecidos os seguintes critérios para a interpretação dos resultados (PARKER, 1983):

Não tipável (NT) - quando não existem plaques

± - plaques contáveis de 1 a 20 (reação fraca)

+

++ - plaques contáveis com número maior que 50 (reação forte).

A apresentação dos resultados da fagotipagem pode ser designada de acordo com o elenco de fagos com os quais as amostras de *S. aureus* reagiram, exemplo: 29/52/79/80, ficando implícito que a não citação de determinados fagos implica que não houve reação significativa com os mesmos, ou apresentados conforme os resultados são

registrados no ato da leitura da placa de Müller-Hinton (exemplo 29++, 52+, 79+, 80+++).

Duas cepas para serem classificadas como distintas ou diferentes deverão apresentar diferenças de no mínimo duas reações fortes. Apesar de apenas as reações fortes serem consideradas significativas para determinar o fagotipo, duas amostras podem ser identificadas como provavelmente relacionadas quando o padrão de uma delas exibir reações fracas por fagos que produzem reações fortes na outra (exemplo: uma cepa apresenta o seguinte espectro lítico: 3A+, 3C++, 55++, 71++; e a outra: 3A+, 3C±, 55±, 71+. Estas cepas poderiam ser classificadas como provavelmente relacionadas) (PARKER, 1983).

Como controle de qualidade da técnica de fagotipagem, cepas controle de espectro lítico conhecido, obtidas do Laboratório de Referência Internacional de Fagotipagem, foram introduzidas em cada fagotipagem para garantir a reprodutibilidade da técnica.

3.5. Obtenção do DNA genômico

O DNA cromossômico foi extraído através da técnica de extração fenol-clorofórmio. As cepas foram cultivadas "overnight" em agar LB e ressuspensas em tampão de lise (50mM Tris, pH 8, 5mM EDTA pH 8, 50mM NaCl). A lisostafina (concentração final de 20mg/L) é utilizada para a fase de rompimento das células. Lisozima e proteinase K são utilizadas para lise das proteínas, que são removidas do meio através de separação de fases com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico. O DNA restante na fase aquosa é precipitado com etanol absoluto gelado e centrifugado no equipamento Sorvall RC2-B (rotor SS34), aderindo à parede do tubo. Posteriormente é solubilizado em tampão TE (10mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8) e armazenado a -20°C.

A quantificação do DNA e sua integridade foram verificadas através de eletroforese em gel de agarose 0,8% (item 3.7), comparando-se com um padrão de massa molecular conhecido (*High DNA MassTM Ladder* - InvitrogenTM). O gel foi corado com solução de brometo de etídio (InvitrogenTM) na concentração final de 0,5µg/mL e as bandas foram visualizadas sob luz ultravioleta (UV).

3.6. Reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação das estruturas gênicas pertencentes ao SCC*mec*.

Foram utilizados 6 pares de iniciadores para a amplificação de estruturas específicas para cada um dos 4 tipos de SCC*mec* conforme demonstrado na tabela 2. Como controle interno são utilizadas cepas padrões de cada um dos quatro tipos de SCC*mec*: tipo I - NCTC 10442; tipo II - N315; tipo III - NCTC 85/2082; tipo IVa - JSC1968; tipo IVb - JSC1978 e tipo IVc - MR108.

Tabela 2 - Iniciadores utilizados na amplificação das estruturas do SCC*mec*

Estrutura	Iniciador	Seqüência de nucleotídeos
<i>mecA</i>	mA1	5' – TGC TAT CCA CCC TCA AAC AGG - 3'
	mA2	5' – AAC GTT GTA ACC ACC CCA AGA - 3'
<i>Classe A</i>	mI4	5' – CAA GTG AAT TGA AAC CGC CT - 3'
<i>(mec I)</i>	McR5	5' – CAG GGA ATG AAA ATT ATT GGA - 3'
	Bc(B2)	5' - ATT GCC TTG ATA ATA GCC TCT - 3'
Complexo <i>ccr</i>	a1(a2)	5' – AAC CTA TAT CAT CAA TCA GTA CGT - 3'
	a2(a3)	5' – TAA AGG CAT CAA TGC ACA AAC ACT - 3'
	a3(a4)	5' - AGC TCA AAA GCA AGC AAT AGA AT - 3'
<i>Classe B</i>	IS5	5' - AAC GCC ACT CAT AAC ATA TGG AA - 3'
<i>(IS1272)</i>	MA6	5' - TAT ACC AAA CCC GAC AAC - 3'

Para amplificação das estruturas gênicas pertencentes ao SCC*mec* foi utilizado o seguinte protocolo descrito por Okuma *et al* (2002): um volume de 20µL de uma mistura para reação contendo 2µL de DNA, 0,5 unidades de Taq polimerase e uma concentração final dos seguintes componentes: 200µM de cada dNTP; 1.5mM de MgCl₂; 75mM Tris-HCl pH 9,0; 20mM (NH₄)₂SO₄; 0,01% Tween 20; 250nM dos iniciadores. As reações foram amplificadas no termociclador Perkin-Elmer Gene Amp 2400 e suas condições foram as seguintes: um ciclo de 5 minutos a 94°C seguido de trinta ciclos de

amplificação, cada um consistindo de 30s a 95°C, 1 minuto a 50°C e 2 minutos a 72°C. A reação foi concluída com um ciclo de 5 minutos a 72°C.

3.6.1. Reação em cadeia da polimerase para amplificação do gene *coa*.

O fragmento do gene *coa* de *S. aureus* foi amplificado por PCR de acordo com o protocolo desenvolvido por FIELDS *et al.* (1997), com algumas modificações. Os iniciadores empregados nesta reação foram os seguintes conforme descrito em HOOKEY *et al* (1998):

- Sense F- *coa*1, 5' ATA GAG ATG CTG GTA CAG G 3'
- Anti-sense R- *coa*2, 5' GCT TCC GAT TGT TCG ATG C 3'

Utilizou-se um volume final de reação de 100µL, contendo, a princípio:

- 84ng de DNA genômico
- 0,3µM de cada iniciador
- 50µM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- 5 unidades de Taq DNA polymerase
- 10µL de 10X-PCR Buffer
- 2mM de MgCl₂

Todos os reagentes utilizados na preparação da PCR foram da Invitrogen™. Foram utilizadas cepas controle positivo (*S. aureus* ATCC 25923) e negativo (*Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984) para a amplificação do gene *coa*.

As reações foram amplificadas no termociclador Perkin-Elmer Gene Amp 2400 e suas condições foram as seguintes: um ciclo de 5 minutos a 94°C seguido de 40 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 57°C, 1 minuto a 70°C. A reação foi concluída com um ciclo de 5 minutos a 72°C. O produto da reação foi armazenado a 4°C para a posterior análise de restrição.

3.7. Eletroforese em gel de agarose

Para a visualização e análise do fragmento de DNA amplificado na reação da PCR, um gel de agarose foi preparado a 0,8% em tampão 0,5 X TBE (Trizma base - 890mM, EDTA - 25mM, ac. Bórico - 89mM). Para a verificação dos tamanhos dos produtos da PCR, alíquotas destas amostras, assim como um padrão de massa molecular conhecido (1Kb *DNA Ladder* – Invitrogen™), misturados a uma solução tampão (azul de bromofenol 0,25%; xileno cianol FF 0,25%; glicerol 30%) foram submetidas à separação eletroforética por cerca de 45 minutos a 100 volts. O gel foi corado e visualizado como descrito no item 3.5. A obtenção da imagem do gel está descrita no item 3.9.

3.8. Estudo do polimorfismo de restrição do gene da coagulase (*coa*) com enzima de restrição

O estudo do polimorfismo do gene *coa* foi realizado por meio da técnica de RFLP-PCR ("Restriction Fragment Length Polymorphism – Polymerase Chain Reaction"), utilizando-se a enzima de restrição Alu-I (Invitrogen™), conforme instruções do fabricante.

3.8.1. Digestão do produto amplificado

Para a realização da digestão enzimática, o produto da PCR foi submetido à digestão com a enzima Alu-I, conforme o procedimento a seguir. Foram adicionados a 90µL do produto da PCR, 10µL de acetato de sódio 3M, pH 7,0 e 250µL de etanol absoluto gelado, seguido de uma incubação por 18 horas a -20°C. A amostra foi centrifugada no equipamento Eppendorf 5403 (rotor 16F24-11) a 15.000rpm por 20 minutos, seu sobrenadante desprezado e o DNA sedimentado ressuspenso em 100µL de etanol 70% gelado. Uma nova centrifugação foi realizada a 12.000rpm por 10 minutos, seu sobrenadante desprezado e o tubo contendo o DNA sedimentado foi deixado aberto para secar dentro do fluxo laminar. Após toda a evaporação do etanol, o DNA foi ressuspenso

em 50µL de tampão TE (10mM Tris-HCl, pH 8.0, 1mM EDTA) e conservado a -20°C até o momento da digestão com a enzima.

Após esses procedimentos, o DNA foi submetido à digestão única nas seguintes condições:

- H ₂ O <i>MilliQ</i> estéril	- 6,2µL
- tampão da enzima	- 3µL
- enzima AluI (Invitrogen®)	- 0,8µL
- DNA	- 20µL

A amostra foi incubada durante 18 horas em banho-maria a 37°C e posteriormente submetida a uma separação eletroforética em gel de agarose 3%, por cerca de 3 horas, juntamente com um marcador de massa molecular conhecido (100pb *DNA Ladder* - Invitrogen™). O gel foi corado e visualizado como descrito no item 3.2. A obtenção da imagem do gel está descrita no item 3.6.

3.9. Determinação do tamanho dos fragmentos do DNA

Para a obtenção da imagem do gel de agarose (corado previamente com brometo de etídio) tanto fotográfica quanto digital, foi utilizado o sistema *Photodocumentation System* Modelo: DP-001.FDC Versão 10 (*Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée Cedex 1 - França*). A imagem fotográfica foi impressa pelo sistema *Video Graphic Printer* UP-895CE (SONY).

Após obtenção da imagem digital, os tamanhos dos fragmentos de DNA foram analisados através do programa *PhotoCaptMw* Versão 10.01 para *Windows*.

3.10. Análise do DNA cromossômico por eletroforese de campo pulsado

A Análise do DNA cromossômico foi realizada através do método de eletroforese de campo pulsado ("Pulsed Field Gel Electrophoresis" - PFGE) conforme a técnica descrita por Pfaller *et al.* (1993). As cepas foram cultivadas em ágar sangue por 24 horas e após este período cerca de 10 colônias foram repicadas em 10 mL de caldo BHI. Após incubação por 18-24 horas a 35-37°C sob agitação, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante descartado. O sedimento foi lavado três vezes com solução salina (0,9%) e após a segunda lavagem, a suspensão foi transferida para um tubo de microcentrífuga previamente pesado. A suspensão foi novamente centrifugada a 6.500rpm por 60 segundos no equipamento Eppendorf 5403 (rotor 16F24-11) e todo o sobrenadante foi retirado com auxílio de uma pipeta. O sedimento foi pesado e ressuspendido em 50mM de EDTA (pH 8,0) na concentração final de 1 µg/µL. Desta suspensão, 30 µL foram transferidos para um tubo de microcentrífuga contendo 400 µL de tampão EC, previamente aquecido a 50°C, e adicionado de 450 µL de agarose ("Low melting") a 2 % e 20 µL de lisostafina (1mg/mL). Esta mistura foi rapidamente transferida para os moldes de preparação dos blocos de agarose e deixados na geladeira por 10 minutos. Os blocos foram transferidos para um recipiente semelhante a uma placa de cultura de células contendo 2mL de tampão EC e incubados por 7 horas a 37°C. Após a incubação, os blocos foram lavados duas vezes com tampão CHEF TE ($\pm$ 2mL), e a seguir incubados com 2mL de tampão ES adicionados de 100 µL de Proteinase K (20mg/mL) a 50°C por 16 horas. Depois, os blocos foram lavados 5 vezes com 2mL de tampão CHEF TE, com intervalos de 1 hora cada lavagem e armazenados nesta solução até serem submetidos à digestão enzimática e eletroforese.

Para o tratamento com a enzima de restrição, 2 blocos de agarose de cada amostra foram transferidos para um novo recipiente contendo 300µL de tampão DNS. O tampão foi substituído e os blocos incubados por um período de uma hora a temperatura ambiente. Esse processo foi repetido por 4 vezes. Após este período, o tampão DNS foi substituído por 200 µL do tampão da enzima de restrição, previamente diluído, adicionado de 2 µL da solução de uso de RNase e incubados por uma hora a temperatura ambiente. Em seguida, o tampão foi descartado e novamente adicionado 200 µL de tampão, contendo 2 µL da solução de RNase e 20U da enzima SmaI para cada 100 µL de volume final. Os blocos então foram incubados por 12 horas a 25°C. Quando os blocos não foram utilizados

imediatamente, foram conservados a 4°C após bloqueio da reação pela adição de 200 µL de tampão 1xTBE.

3.10.1. Eletroforese de campo pulsado

Os blocos de agarose contendo os fragmentos de DNA da bactéria foram fixados sobre o pente de preparação do gel com agarose previamente preparada e aquecida (1% de agarose em 120mL de 0,5xTBE). Em seguida, o gel foi preparado pela adição do restante da agarose fundida no suporte e a eletroforese foi programada e executada em um sistema de múltiplos estados, utilizando o equipamento CHEF DRIII *System* da BIO-RAD (Califórnia, EUA). A eletroforese foi realizada com intervalos de tempo de pulso de 1 a 30 segundos, na temperatura de 14°C, em um ângulo de 120° e na voltagem de 6,0 volts/cm que, em geral, permite a melhor separação dos fragmentos de DNA cromossômico de *S. aureus* quando este é clivado com *SmaI* (COOKSON *et al.*, 1986).

Após a separação, os géis foram corados com brometo de etídio 0,5 µg/mL em água por 30 minutos em temperatura ambiente e, após a descoloração por 3 horas em água destilada, foram fotografados com o auxílio de um transluminador de luz ultravioleta. Como padrão de massa molecular foi utilizado o concatâmero de λ DNA *Ladder* (Pharmacia), com extensão das bandas de 48,5 kb. Com a finalidade de controlar a qualidade da técnica e comparar os padrões eletroforéticos obtidos, foram incluídas 3 cepas ORSA com padrões de PFGE conhecidos pertencentes a CEB (OLIVEIRA *et al.*, 2001; SADER *et al.*, 1994; TEIXEIRA *et al.*, 1995). A análise das bandas obtidas após a eletroforese foi realizada de maneira visual, por dois indivíduos diferentes, de acordo com o guia de interpretação de PFGE proposto por TENOVER *et al.* (1995, 1997). (Tabela 3).

Tabela 3 - Critérios adotados para a interpretação do PFGE

categorias	nº de diferenças genéticas	nº de fragmentos diferentes	interpretação
Semelhantes	0	0	Cepas fazem parte do mesmo clone.
Relacionadas	1	2-3	Cepas são consideradas como subgrupos.
Possivelmente relacionadas	2	4-6	Cepas possivelmente seriam relacionadas com o clone com a qual foram comparadas.
Diferentes	≥3	≥7	Cepas são diferentes.

4 . *Resultados*

Visando facilitar a apresentação e o entendimento dos resultados, as cepas de *S. aureus* foram divididas em grupos de acordo com o perfil de PFGE.

4.1. Triagem para verificação de resistência a oxacilina

Todas as 50 amostras de ORSA foram submetidas à triagem através do método descrito no item 3.3. Em todos os casos as cepas apresentaram crescimento, com exceção da cepa controle ATCC 25.923, sensível a oxacilina.

4.2. Resultado de PFGE das cepas estudadas

Dentre as cepas utilizadas no estudo, 32 pertencem ao clone A. Pertencentes à sub- clones semelhantes ao A foram 5 cepas: A1, A2 (2 cepas), A4 e A5. Os demais clones foram B, D, E, H, I, I1 (1 cepa), J, K, L e M.

4.3. Determinação da classe estrutural do complexo *SCCmec* das cepas ORSA

As amplificações dos genes *mecA* e *mecRI* e da IS1272 resultaram em bandas de aproximadamente 280 pb, 1,3kb e 1,9kb respectivamente. A presença de bandas referente a essas estruturas confirma que essas estão presentes no DNA bacteriano. A ausência de bandas, ao contrário, demonstraria que não há tal estrutura no DNA da bactéria.

A tipagem do gene *ccr*, resultou em 3 possíveis bandas com tamanhos diferentes: a tipo 1, com aproximadamente 680 pb; tipo 2, com uma banda de aproximadamente 900 pb; o tipo 3 resultou em banda com aproximadamente 2kb.

Apenas 3 amostras das 50 estudadas foram classificadas como *SCCmec* tipo IV e as demais como *SCCmec* tipo III.

Empregando-se a técnica de PCR observou-se o mesmo perfil quanto à presença dos genes *mecA*, do gene *mecI*, ausência da IS1272 e complexo *ccr* tipo 3, para a maior parte dos *SCCmec* tipo III. Exceções ocorreram com as cepas BR5, R357 e HV21 que mostraram amplificação do gene IS1272.

As três cepas caracterizadas como *SCCmec* tipo IV foram a R35 (clone J), R63 (clone L) e R222 (clone D), as quais apresentaram o seguinte perfil: presença do gene *mecA*, ausência de *mecRI*, presença da IS1272 e complexo *ccr* tipo 2.

Figura 6 - Fragmentos obtidos com a amplificação dos genes *ccr*

MM: Massa Molecular; B: Branco; Os números 1, 2 e 3 correspondem aos tipos de gene *ccr* encontrados. A, B, C e D são cepas padrão para cada um dos genes *ccr*: A: 10442; B: N315; C: 85/2082; D: JS1968.

Figura 7 - Fragmento amplificado da IS1272

A presença de bandas com massa molecular de aproximadamente 1,9kb indicam que a cepa possui a IS1272. MM: Massa molecular; B: branco.

4.4. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM- $\mu\text{g/mL}$)

Os resultados encontrados no antibiograma das 50 amostras avaliadas permitiram a divisão das amostras em 5 perfis de sensibilidade frente aos antimicrobianos oxacilina, vancomicina, sulfametoxazol-trimetoprim, eritromicina e ciprofloxacina (tabela 4).

Tabela 4 - Perfis de sensibilidade

Principais drogas testadas					Perfil de	Número de
OXA	VAN	SXT	ERY	CIP	sensibilidade	
						Amostras (PFGE)
						BR1, BR2, BR3, BR4, BR5,
R	I	R	R	R	1	HV139, HV37 (A)
R	S	R	R	R	2	Demais cepas (A, H, K, E, M, B)
R	S	R	R	S	3	R266 (I), R267 (I), T511 (A)
R	S	S	R	R	4	R257 (II)
R	S	S	R	S	5	R35 (J), R63 (L), R222 (D)

R: resistente; S: sensível; I: intermediário

Os perfis de sensibilidade das cepas estão apresentados na tabela 5. Os resultados para as drogas mais importantes (OXA, VAN, SXT, ERY e CIP) foram apresentados em termos de CIM ($\mu\text{g/mL}$) e, os demais antimicrobianos testados, de forma qualitativa (Resistente, Sensível e Intermediário).

As cepas portadoras do SCCmec tipo IV, representadas pelas cepas R35, R63 e R222, apresentaram sensibilidade ao maior número de drogas. Os valores de CIM de oxacilina para R63 e R222 foram menos elevados em relação às outras cepas ORSA, 64 e 8 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente.

Baseando-se em todos os antibióticos testados, as cepas BR2 e HV139 (clone A) apresentaram resistência a todos as drogas.

A maior parte das cepas apresentaram valores de CIM de oxacilina elevados (512 $\mu\text{g/mL}$) enquanto o valor de 4 $\mu\text{g/mL}$ é considerado como resistente de acordo com o NCCLS (2003).

Os valores de CIM de vancomicina se apresentaram elevados apenas para as cepas VISA (BR1, BR2, BR3, BR4 e BR5) e duas cepas com resistência intermediária a

vancomicina, a HV139 e HV37. As demais cepas apresentaram valores iguais ou menores a 4 µg/mL, portanto sensíveis à droga.

As cepas VISA apresentaram baixas porcentagens de sensibilidade às drogas, porém, CIMs de oxacilina foram menos elevados em alguns casos: BR1 (64 µg/mL), BR2 (256 µg/mL) e BR3 (32 µg/mL).

A tabela 5 mostra alguns dos perfis de sensibilidade apresentados pelas cepas em estudo.

Tabela 5– Perfil de sensibilidade de 11 cepas representantes de cada clone ORSA e VISA provenientes de hospitais de diversas regiões brasileiras

Cepa	PFGE - SCCmec	CHL	AMP	TOB	GEN	TET	OXA	SXT	VAN	ERY	CIP	Procedência
R9	A - III	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	NI
BR5	A - III	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	5SP
R267	I - III	S	R	R	R	R	R	R	S	R	S	1ES
R4	H - III	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	2SP
R21	K - III	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	2RS
R229	E - III	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	4SP
R357	M - III	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	2MG
R401	B - III	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	1DF
R35	J - IV	R	R	R	R	S	R	S	S	R	S	3SP
R63	L - IV	S	R	S	S	R	R	S	S	R	S	1PE
R222	D - IV	R	S	R	S	S	R	S	S	R	S	4SP

R: Resistente; I: Intermediário; S: sensível. GEN: gentamicina; AMP: ampicilina; TOB: tobramicina; TET: tetraciclina; CHL: cloranfenicol; OXA: oxacilina; SXT: sulfametoxazol-trimetoprim; VAN: vancomicina; ERY: eritromicina; CIP: ciprofloxacina.

4.5. Resultado de Fagotipagem de cepas ORSA

Tabela 6 - Distribuição percentual dos diferentes grupos fágicos encontrados com as 50 cepas estudadas

Perfil PFGE	Grupos fágicos	Cepas	Porcentagem
J, A, A2, D	NT	25 cepas	50%
A, A4, E, M	III	R161, R5, R157, R20, R277, R229, R16, R128, R357	18%
A5, I, A2, K, A, B, I1	FE, III	R50, R267, R303, R266, R21, R253, R401, R257	16%
A	FE	R9, R106	4%
A	FE, NC	R130, R79	4%
A1	FE, III e V	R156	2%
H	FE, I, II, III, NC	R4	2%
A	II	R181	2%
L	FE, I	R63	2%

NT: cepa não tipável; FE: fagos experimentais; NC: fagos não-classificados

4.6. Tipagem do gene da coagulase (*coa*) por RFLP

4.6.1. Amplificação do gene *coa*

As amplificações do gene *coa* de todas as cepas resultaram em amplificados de 2 diferentes tamanhos de aproximadamente 545 pb e 620 pb.

4.6.2. Restrição pela enzima Alu-I

Obtiveram-se 3 fragmentos na restrição do gene *coa* pela enzima Alu-I. Quatro perfis diferentes de bandas foram obtidos: *coa1*, *coa2*, *coa3* e *coa4*.

Figura 8 – Perfil de restrição dos fragmentos do gene *coa* obtidos com a enzima Alu-I

MM: Massa molecular; *coa1*, *coa2*, *coa3* e *coa4* são perfis obtidos com a enzima Alu-I. Os números de 1 a 11 representam cepas: 1 – N315; 2 – MR108; 3 – R63; 4 – R266; 5 – R35; 6 – R106; 7 – R257; 8 – BR3; 9 – R222; 10 – HV26; 11 – R401.

O perfil mais abundante foi o *coa1* (47 cepas). O perfil *coa2*, *coa3* e *coa4* foram apresentados por apenas 1 cepa respectivamente R222 (SCC*mec* IV), R35 (SCC*mec* IV) e R106 (SCC*mec* III).

4.7. Resumo dos resultados mais relevantes

Tabela 7 – Distribuição dos diferentes perfis de RFLP do gene da coagulase (*coa*) e a classificação estrutural do SCCmec e, sensibilidades a antimicrobianos, de acordo com os perfis de PFGE encontrado em linhagens de *S.aureus* provenientes de diversas regiões brasileiras.

Perfil PFGE	Cepa	Procedência	cepas mesmo perfil	RFLP <i>coa</i>	PCR					CIM (µg/mL)			
					<i>mecA</i>	<i>mec-I</i>	IS1272	<i>ccr</i>	SCCmec	OXA	VAN	ERY	SXT CIP
A	BR5	5SP	1	coa1	+	+	+	3	III	<u>512</u>	<u>8,0</u>	<u>>40</u>	<u>>152</u> <u>>8,0</u>
A	R9	2SP e demais procedências	35	coa1	+	+	—	3	III	<u>512</u>	2,0	<u>>40</u>	<u>>152</u> <u>>8,0</u>
A	R106	1SC	0	coa4	+	+	—	3	III	<u>258</u>	4,0	<u>>40</u>	<u>>152</u> <u>>8,0</u>
B	R401	1DF	0	coa1	+	+	—	3	III	<u>258</u>	1,0	<u>>40</u>	<u>>152</u> <u>>8,0</u>
D	R222	4SP	0	coa2	+	—	+	2	IV	<u>8,0</u>	2,0	<u>>40</u>	<u><8,0</u> 0,8
E	R229	4SP	0	coa1	+	+	—	3	III	<u>512</u>	2,0	<u>>40</u>	<u>>152</u> <u>>8,0</u>
H	R4	2SP	0	coa1	+	+	—	3	III	<u>512</u>	2,0	<u>>40</u>	<u>>152</u> <u>>8,0</u>

Perfil PFGE	Cepa	Procedência	cepas mesmo perfil	RFLP coa	PCR					CIM (µg/mL)				
					<i>mecA</i>	<i>mec-I</i>	IS1272	<i>ccr</i>	SCCmec	OXA	VAN	ERY	SXT	CIP
I	R266	1ES	2	coa1	+	+	—	3	III	512	2,0	>40	120	<0,30
J	R35	3SP	0	coa3	+	—	+	2	IV	512	2,0	30	<8,0	<0,3
K	R21	2RS	0	coa1	+	+	—	3	III	512	2,0	>40	>152	>8,0
L	R63	1PE	0	coa1	+	—	+	2	IV	64	1,0	>40	<8,0	0,30
M	R357	2MG	0	coa1	+	+	+	3	III	256	2,0	>40	>152	>8,0

Valores em negrito e sublinhados representam CIM resistente; valores sublinhados e em itálico representam resistência intermediária. OXA: oxacilina; VAN: vancomicina; ERY: eritromicina; SXT: sulfametoxazol-trimetoprim; CIP: ciprofloxacina.

Pode-se observar que não houve relação direta entre fenótipos e genótipos, ou seja, amostras com idênticos genótipos apresentaram diferentes fenótipos, e a situação inversa também foi observada.

Os resultados completos de todas as tipagens das 50 amostras estudadas estão relacionados no anexo 8.2.

5. Discussão

Os sistemas de tipagem epidemiológica são baseados nas características que diferenciam cepas epidemiologicamente relacionadas (pertencentes a um mesmo clone) e cepas não relacionadas. Essas características têm de ser estáveis nas linhagens e apresentar diversidade dentro da espécie, reflexo do acúmulo de mutações aleatórias não letais, como substituições de simples pares de bases até aquisição de DNA de outras espécies bacterianas (ARBEIT, 1995). A associação de mais de um sistema de tipagem epidemiológica é necessário para a melhor diferenciação das amostras em estudo, uma vez que não existe um único sistema ideal (PFALLER, 1993; TENOVER *et al.*, 1994).

Estudos de populações bacterianas mostram elevada diversidade genética dentro das espécies e indicam que um grupo de amostras da mesma espécie pode conter várias linhagens geneticamente divergentes (ARBEIT, 1995). Contudo, amostras de ORSA de localizações geográficas distintas parecem ser derivadas de uma ou poucas cepas precursoras e são geneticamente restritas quando comparadas com amostras OSSA que apresentam elevada diversidade genética (KREISWIRTH *et al.*, 1993; SADER *et al.*, 1994; TEIXEIRA *et al.*, 1995).

A seleção de determinados clones em uma instituição de saúde estaria relacionada com as práticas terapêuticas habituais, que no decorrer de longos períodos de tempo promoveriam uma lenta e constante seleção de clones com maiores ou menores índices de resistência (LEMAITRE *et al.*, 1996). Como observado no presente estudo, todas as cepas pertencentes ao clone endêmico brasileiro mostraram resistência a ciprofloxacina, eritromicina, oxacilina e sulfametoxazol-trimetoprim. O uso destes antimicrobianos, assim como de cefalosporinas e outros antibióticos de largo espectro, está amplamente difundido entre os hospitais brasileiros, como também em tratamento de infecções comunitárias. O

uso destas drogas parece ter promovido a seleção lenta de clones ORSA multirresistentes no decorrer de vários anos, que agora tem como reflexo o isolamento de um único clone predominante. A disseminação deste clone também poderia ter sido facilitada por meio da transferência de pacientes previamente colonizados ou infectados entre os hospitais, e até mesmo por funcionários portadores que trabalham em diferentes instituições.

A extensa disseminação de um único clone denominado clone endêmico brasileiro limita o valor do método de PFGE para estudos epidemiológicos de surtos causados por cepas ORSA (BLANC *et al.*, 2002; SOARES *et al.*, 2001). Por esta razão, optou-se por cinco métodos de tipagem utilizados em conjunto, dos quais 2 fenotípicos (Antibiograma e Fagotipagem) e 3 genotípicos (PFGE, PCR e RFLP-PCR). A escolha dos métodos foi baseada no custo, disponibilidade, facilidade de execução, poder discriminatório, reprodutibilidade e no número reduzido de informações sobre algumas das técnicas propostas no presente estudo, na literatura nacional.

Com o surgimento de novas técnicas moleculares como a classificação do SCCmec que fornece interessantes subsídios para estudos epidemiológicos por revelar a diversidade estrutural do cassete cromossômico, surgiu o interesse em saber como os perfis fenotípicos e genotípicos das cepas ORSA nacionais estudadas com métodos epidemiológicos clássicos estariam relacionados a esta classificação do SCCmec e que novas informações poderiam ser obtidas a partir daí.

Enquanto método fenotípico, a fagotipagem não se mostrou eficiente no estudo das cepas ORSA, uma vez que 50% delas não puderam ser tipadas pelo conjunto de fagos utilizados. O baixo número de cepas ORSA tipáveis reduziu relativamente o poder discriminatório da fagotipagem para estas estirpes. Todas as cepas VISA e HVISA e algumas ORSA não foram tipáveis, dificultando a correlação com dados de outras tipagens ou procedência.

A presença de cepas não tipáveis pode ser explicada por dois mecanismos: o primeiro deles seria em consequência de mutações que teriam ocorrido no DNA bacteriano, e o segundo estaria relacionado com a lisogenização, que é um fenômeno resultante da incorporação de um fago temperado ao genoma bacteriano (profago). Quando isto ocorre, o profago bloqueia a replicação dos seus fagos homólogos e estes, mesmo adsorvidos, não conseguem se reproduzir e são rapidamente eliminados por diluição, pela divisão celular, e como consequência, a bactéria não mais consegue ser tipada pelo seu fagotipo prevalente, o que altera seu fagotipo básico e a cepa pode mesmo vir a se tornar

não tipável com os fagos disponíveis (PARKER, 1983; EASMON & GOODFELLOW, 1990). Contudo, a fagotipagem apresentou alto poder discriminatório entre as cepas que puderam ser tipadas pelo método.

Dentre as cepas tipáveis, o grupo fágico III foi o mais abundante (18%). Dentro desse grupo foram observados variados perfis de sensibilidade e de PFGE. De acordo com WENTWORTH (1963) a prevalência de qualquer grupo fágico depende da fonte clínica das culturas em estudo. Segundo o autor as cepas do grupo fágico III são predominantemente intra-hospitalares, geralmente multirresistentes, concordando com os dados encontrados. Havia até mesmo um consenso geral de que as cepas do grupo III são a causa principal de infecções estafilocócicas, principalmente adquiridas em hospitais (MYERS & LINNEMAN, 1982). Hoje se observa que as cepas adquiridas em hospitais sofreram alterações ao longo de sua evolução e novos grupos fágicos estão disseminando, como por exemplo o grupo Fe/III, segundo grupo fágico mais abundante dentre as cepas estudadas (16%).

O RFLP do gene *coa* classificou as cepas em quatro diferentes perfis, sendo o perfil *coa1* o mais abundante. A análise desses resultados confirma a existência de uma pequena variedade genética entre as linhagens ORSA brasileiras. Mesmo entre os diferentes perfis de PFGE, a classificação de acordo com o RFLP do gene *coa* foi homogênea.

As exceções foram os clones J e D, portadores do SCCmec tipo IV, que apresentaram diferentes perfis de RFLP, *coa3* e *coa2* respectivamente. Esse fato pode indicar que a origem de algumas dessas cepas portadoras de SCCmec tipo IV é diferente da origem dos demais clones, principalmente do CEB. Frente a esses dados, o indício é de que em algum momento da evolução, clones suscetíveis de *S. aureus* teriam recebido esse cassete cromossômico tipo IV e iniciado uma nova linhagem ORSA.

Por outro lado, as cepas R106 e R63 apresentaram comportamentos diferentes. A R106, pertencente ao CEB, mostrou perfil *coa 4*, diferente de todas as outras cepas pertencentes ao CEB que apresentaram perfil *coa1*. Por sua vez, a cepa R63, (clone L) portadora do SCCmec tipo IV, mostrou perfil *coa1*, comum ao CEB e outros clones. Isso poderia indicar que as cepas pertencentes ao clone predominante estariam sofrendo alterações em seu genoma através de mutações, recombinações e outros eventos genéticos, determinando o surgimento de subclones.

As tipagens do gene *coa* por RFLP comumente empregadas, costumam utilizar trinta e nove regiões codificadoras do gene da coagulase. Os iniciadores utilizados neste

estudo foram designados levando em consideração regiões variáveis dentro do gene da coagulase (HOOKEY, *et al.*, 1998). Outros trabalhos que utilizaram a mesma técnica de tipagem para coagulase empregaram iniciadores para diferentes regiões do gene (GOH *et al.*, 1992; KOBAYASHI *et al.*, 1995; TENOVER *et al.*, 1994). Por essa razão a comparação entre resultados de tipagem do presente estudo com outras tipagens do gene *coa* por RFLP não pode ser feita.

A finalidade da utilização do RFLP do gene *coa* foi a de obter uma maior discriminação entre as cepas do grupo estudado. Devido ao baixo poder discriminatório observado, o método não se apresentou como uma ferramenta adequada para avaliação epidemiológica para linhagens ORSA, ao menos em áreas geográficas restritas onde haja clones predominantes. A escolha do método foi baseada num estudo que avaliou cepas endêmicas européias e que foi bastante discriminatório neste caso (HOOKEY *et al.*, 1998). Porém, na aplicação em cepas endêmicas brasileiras, o método não obteve a mesma eficiência.

Analisando os padrões de sensibilidade obtidos para as amostras estudadas, observou-se que a maior parte das cepas é multirresistente. A definição de multirresistência é apresentar a CIM $>2\mu\text{g/mL}$ para oxacilina e resistência a outras 4 classes de antimicrobianos (DIEKEMA, *et al.*, 2000b). Dentre as cepas testadas, 72% apresentaram perfil de sensibilidade 2, ou seja, resistência a todas as principais drogas testadas (OXA, CIP, ERY), com exceção a vancomicina. As exceções foram verificadas nas cepas portadoras do SCCmec tipo IV que apresentaram perfil de sensibilidade 5, ou seja, resistência apenas a oxacilina e eritromicina (tabela 4). Essa característica confirma os dados da literatura onde SCCmec IV é reconhecido por não possuir outros genes de resistência além do gene *mecA* (MA *et al.*, 2002).

O perfil de multirresistência apresentado pelas cepas investigadas correspondeu aos resultados obtidos em outro estudo onde mais de 70% das cepas de ORSA, isoladas entre 1992 e 1994, apresentavam resistência à, pelo menos, 7 classes diferentes de drogas. No mesmo estudo, a classificação do SCCmec se mostrou semelhante para as cepas pertencentes ao clone A por PFGE (TEIXEIRA *et al.*, 1995).

As cepas R63 e R222, SCCmec tipo IV, apresentaram níveis relativamente mais baixos de resistência a oxacilina que as cepas HA-ORSA, ORSA adquiridos em ambiente hospitalar. Isso indica que as cepas CA-ORSA, adquiridos na comunidade, podem adquirir um fenótipo de resistência heterogêneo a oxacilina. Cepas HA-ORSA, por outro lado, tem

um padrão distinto de resistência chamada resistência homogênea. Isso implica que diferente das cepas HA-ORSA, as CA-ORSA não foram selecionadas por exposição aos potentes antibióticos utilizados nos hospitais (OKUMA *et al.*, 2002).

A cepa R35, também portadora de SCC*mec* tipo IV, apresentou um alto nível de resistência a oxacilina (512µg/mL) e resistência a um maior número de drogas do que as outras cepas SCC*mec* tipo IV. Esse fato pode ser devido a um maior tempo de permanência da cepa no ambiente hospitalar com conseqüente adaptação pela aquisição de genes de resistência ou pela inserção de um elemento SCC*mec* tipo IV em uma cepa que já trazia um "background" genético contendo alguns genes de resistência. Os CA-ORSA, apesar de sua natureza não multirresistente bem caracterizada, apresentam exceções. Algumas raras cepas, como isolados de um estudo realizado por OKUMA (OKUMA *et al.*, 2002) podem apresentar resistência a quatro antibióticos não beta-lactâmicos. Isso indica que as cepas CA-ORSA podem adquirir resistência, principalmente após uma exposição à droga.

As cepas tipo IV e algumas VISA apresentaram CIM relativamente mais baixos para oxacilina. É provável que essas cepas apresentem um padrão de resistência heterogênea. Expressão heterogênea de resistência a oxacilina caracteriza-se pela maioria das células com baixo nível de resistência, das quais uma pequena proporção de clones altamente resistentes se destacam. Tais sub- clones altamente resistentes são devidos a eventos mutacionais no genoma bacteriano, mas não no SCC*mec*. Com pequenas exceções, eles mantêm a resistência mesmo na ausência de pressão por antibióticos.

Diferenças qualitativas entre os sistemas regulatórios dos genes *mecA* e *blaZ* têm implicações na expressão da resistência. As cinéticas da indução do *mecRI-mecI* são muito mais lentas do que *blaRI-blaI*. O produto do gene *mecRI*, MecR1, tem uma função, acredita-se que semelhante à proteína BlaR1, ou seja, reconhecer a presença de moléculas de antibióticos beta-lactâmicos externamente a membrana citoplasmática e transmitir um sinal dentro do citoplasma e, dessa forma, induzir a de -repressão do gene *mecA* (HIRAMATSU, 1995). Embora MecR1 seja induzida por algumas cefalosporinas, não é, na verdade, eficiente para detectar a presença de oxacilina e meticilina, levando a uma indução muito lenta de PBP2'. Apesar de carrear o gene *mecA*, tais cepas podem apresentar-se como suscetíveis nos testes de susceptibilidade "in vitro" (BERGER-BACHI & ROHRER, 2002).

Cepas que têm um nível baixo de resistência a oxacilina, chamadas pré-ORSA, contêm um *mecRI-mecI* funcionalmente intacto e como resultado uma forte repressão do

gene *mecA*. Sob pressão antimicrobiana, tais cepas tendem a se tornar constitutivamente produtoras de PBP2', adquirindo resistência aumentada pela inativação ou deleção de *MecI*. Uma taxa de produção de PBP2' é necessária para resistência, mas uma alta produção de PBP2' não necessariamente corresponde a altos níveis de resistência.

Altos níveis de resistência a oxacilina indicam um padrão de resistência homogêneo e requerem suficiente expressão de PBP2', além de uma ótima taxa de precursor com uma estrutura muito específica para formação de peptidoglicanos. (BERGER-BACHI & ROHRER *et al.*, 2002). Outros fatores genéticos estão envolvidos na alta expressão de resistência.

A triagem experimental para perda de resistência a oxacilina por inativação do gene *mecA* tem levado a identificação de um grupo de genes chamados *fem* ("factors essential for methicillin resistance") ou *aux* ("auxiliary"). Sua atividade é crítica para a expressão da resistência. Nenhum deles, no entanto, parece afetar a expressão de PBP2'. No caso de alguns dos fatores *fem*, a resistência é reduzida porque eles catalizam passos cruciais na formação de precursores de parede celular.

Além do "background" genético, os níveis de resistência a oxacilina são fortemente dependentes de fatores externos como temperatura, osmolaridade, disponibilidade de cátions divalentes e composição do meio de cultura. Isso explica a necessidade da incorporação de NaCl ao meio de cultura e diminuição da temperatura de incubação dos testes de susceptibilidade com o intuito de incrementar a expressão da resistência.

Embora níveis de resistência a oxacilina terem sido mostrados dependentes de múltiplos fatores cromossômicos sua contribuição para o aumento dos níveis de resistência em isolados clínicos não foi ainda confirmado. (BERGER-BACHI & ROHRER, 2002). A regulação dos genes que determinam níveis de resistência também pode depender do controle de reguladores globais como o "*locus*" *agr*, cujo balanço pode variar de cepa para cepa.

O sistema genético regulatório (*mecI-mecR1*) não responde bem ao estímulo de muitos dos antibióticos beta-lactâmicos incluindo oxacilina e meticilina. Supõe-se que isto seja causado pela limitada especificidade do domínio da proteína *MecR1*. Nesta condição, a indução da produção de PBP2' e expressão de resistência aos beta-lactâmicos são estimulados somente por um limitado número de antibióticos, como a cefoxitina por exemplo, e as células se mantêm suscetíveis pela forte ação repressora do gene *mecI* (BERGER-BACHI & ROHRER, 2002).

O funcionamento do gene *mecA* faz as células do *S. aureus* expressarem resistência a oxacilina. Entretanto, produção irrestrita de PBP2' não faz a cepa ORSA totalmente resistente aos antibióticos beta-lactâmicos. Ao invés disso, somente pequenas subpopulações da cepa expressam alta resistência aos beta-lactâmicos. As cepas resistentes a oxacilina compreendem células com variados níveis de resistência, sendo caracterizada como portadora de resistência heterogênea a oxacilina e designada como hetero-ORSA (OKUMA *et al*, 2002).

No Japão, assim como no Brasil, cepas hetero-ORSA desapareceram com o passar do tempo e a expansão clonal das cepas homo-ORSA foi evidente. Segundo OKUMA (2002), essa mudança drástica na epidemiologia do ORSA pode ser interpretada da seguinte forma: o número de cepas ORSA que diferem no "background" genético aumentou abruptamente no início dos anos 80. Nestes casos, as cefalosporinas de terceira geração foram amplamente utilizadas. Subseqüentemente, estas drogas foram sendo gradualmente substituídas por outros beta-lactâmicos com baixos valores de CIM contra cepas hetero-ORSA como agentes terapêuticos para infecções por ORSA. Porém, os beta-lactâmicos imipenem, cefmetazol e flomoxefe, embora fossem efetivos contra alguns genótipos de ORSA, não foram potentes o suficiente contra um clone que foi convertido a homo-ORSA, permitindo disseminação clonal e o primeiro clone resistente a vancomicina surgiu deste clone homo-ORSA.

Os primeiros relatos de resistência a vancomicina foram descritos em duas cepas provenientes do Japão, a Mu50 3 a Mu3 (HIRAMATSU *et al.*, 1997). No caso da cepa Mu50, o primeiro passo de seleção foi converter VSSA a hetero-VRSA. Já a cepa Mu3 apresenta significativamente maior síntese de parede comparada com VSSA. HANAKI *et al.* (1998) observaram que as cepas HVISA produzem quantidades de 3 a 5 vezes maiores de PBP2 e PBP2' quando comparadas a *S. aureus* sensíveis a vancomicina. Com esta parede espessa, o mecanismo de resistência a vancomicina é prevenir a entrada das moléculas de antibióticos no citoplasma. As cepas VISA incluídas neste estudo, isoladas no Brasil, apresentam esse mesmo mecanismo de espessamento de parede celular (OLIVEIRA G.A., 2000) o que não permite que os níveis de resistência a vancomicina cheguem a valores elevados.

Sabe-se que há uma variedade de níveis de resistência em cepas portadoras de *mecA*, desde suscetíveis a altamente resistentes. Isso indica que apenas a aquisição do *mecA* não pode determinar que a célula seja totalmente resistente a oxacilina. O tipo de

SCCmec influencia no nível de resistência, como no caso das pré-ORSA (genes regulatórios intactos).

As cepas SCCmec tipo III, possuem o gene *mecl* e ausência da IS1272, conforme descrito por ITO *et al.* (2001). Em algumas poucas cepas SCCmec tipo III, pertencentes ao clone A e M, houve uma alteração nesse padrão, com a presença da inserção IS1272, sem qualquer alteração do perfil de multirresistência característico de cepas com SCCmec tipo III. As linhagens de ORSA bem sucedidas como é o caso do CEB, também conhecido internacionalmente como "Brazilian clone", e outros como o "Iberian clone" e "Pediatric clone", provavelmente possuem esses fatores associados e por essa razão tornaram-se predominantes sobre os demais clones. Porém, ao se tornar predominante, essas linhagens ao longo de sua evolução tendem a sofrer recombinações com outros clones e pode haver o surgimento de novas linhagens ou sub- clones.

Uma classificação de SCCmec foi descrita por OLIVEIRA & LENCASTRE (2002) baseada em PCR "Multiplex". Os iniciadores utilizados no estudo foram definidos de acordo com as descrições do gene fornecidas por ITO *et al.* (1999, 2001), as mesmas utilizadas no presente trabalho. Porém, para o PCR "Multiplex" foram escolhidos 8 "loci" para caracterização dos diferentes SCCmec.. Tal técnica se destaca pela especificidade, uma vez que detecta mais de uma estrutura que confirma o tipo de SCCmec, e pela praticidade uma vez que todos os iniciadores são adicionados à reação de uma só vez. Porém, devido ao grande número de bandas a serem observadas, as chances de erros durante a análise dos resultados é maior do que se realizada individualmente. A classificação obtida em tipos apresentou as variações IA, IIIA, IIIB e IVA caracterizadas pela presença ou ausência de bandas correspondentes a plasmídeos ou inserções. A cepa pertencente ao CEB adicionada ao estudo foi classificada como SCCmec tipo IIIA, ou seja, tipo III com ausência de uma banda correspondente a inserção chamada pT181. Pode-se dizer que a classificação de OLIVEIRA & LENCASTRE tem correspondência com a descrita no presente trabalho, uma vez que as estruturas nos quais as técnicas se basearam foram as mesmas. Porém, a técnica utilizada neste trabalho seguiu o protocolo descrito por ITO *et al* (1999) o qual se mostra menos subjetiva quanto à interpretação dos resultados uma vez que as bandas analisadas são individuais, facilitando a sua avaliação. Além disso, apresenta uma boa praticidade pelo menor número de iniciadores a serem utilizados e maior facilidade na padronização da reação.

As amostras OSSA apresentam uma elevada diversidade genética. Já amostras ORSA mesmo provenientes de localizações geográficas variadas, como foi o caso das cepas estudadas, parecem ser derivadas de uma ou poucas cepas precursoras e são geneticamente restritas (KREISWIRTH, 1993; MUSSER & KAPUR, 1992; SADER, 1994; TEIXEIRA, 1995).

Mesmo analisando clones variados de ORSA por PFGE, muitas cepas apresentaram parâmetros como sensibilidade a antimicrobianos, RFLP do gene *coa* e tipos de *SCCmec*, homogêneos quando comparado aos demais perfis estudados. Como a grande maioria é pertencente ao clone endêmico brasileiro (CEB), esse resultado já era esperado, uma vez que outros estudos internacionais que utilizaram cepas ORSA brasileiras obtiveram o mesmo resultado (SOUSA *et al.*, 2001; DIEKEMA *et al.* 2000a), inclusive para a tipagem do *SCCmec* (DUARTE *et al.*, 2002). Outros estudos epidemiológicos também têm mostrado a predominância de um único clone disseminado em hospitais de diversas regiões brasileiras (SENNA, *et al.*, 2002; SANTOS SOARES, *et al.*, 2000; SADER *et al.*, 1994).

Um fato preocupante é a predominância de um clone ORSA multirresistente, com altos níveis de resistência a oxacilina e ampla distribuição geográfica. Além disso, percebe-se que esse mesmo clone tem grande potencial para adquirir resistência a vancomicina como vem sendo observado em relatos de casos no Brasil (LUTZ, *et al.*, 2003; OLIVERA, *et al.*, 2001).

Como as cepas pertencentes ao clone endêmico brasileiro possuem *SCCmec* tipo III e, possivelmente, são provenientes de um único precursor clonal, imagina-se que em algum momento de sua evolução, esse clone deva ter adquirido o cassete cromossômico e de forma bem sucedida foi amplamente disseminado entre os hospitais de todo o país.

As poucas cepas com *SCCmec* tipo IV, aqui encontradas pertencem a outros clones diferentes do clone endêmico brasileiro. Este fato pode ter sido desvantajoso para as linhagens presentes em hospitais onde a pressão seletiva é alta, pois o *SCCmec* tipo IV possui um perfil mais sensível às drogas e, por essa razão, pode não ter sido tão bem sucedido em sua disseminação quanto o *SCCmec* tipo III.

A origem desse novo *SCCmec* ainda é desconhecida. Estes podem ter sido derivados dos tipos de *SCCmec* isolados em ambiente hospitalar, porém poderiam ter sofrido grandes alterações por pertencerem a clones diversos de PFGE e, terem perdido muitos genes de resistência. Outra possibilidade é ter originado de cepas sensíveis da comunidade que adquiriram o *SCCmec* a partir de transferência horizontal de cepas ORSA

(CHAMBERS, 2001). Esta última hipótese explicaria melhor a existência da grande diversidade clonal entre as OSSA com baixo nível de resistência a antimicrobianos. Elementos SCCmec tipo IV possuem genes *ccr* tipo 2 que são encontrados do SCCmec tipo II (quadro 1). Também possuem um complexo genético classe B compartilhado pelo SCCmec tipo I. A presença dessas estruturas *ccr* e complexo classe B no SCCmec tipo IV que também são encontrados em outros tipos de SCCmec é um forte indício de que eventos genéticos de recombinação devem ter ocorrido resultando no surgimento do tipo IV (OKUMA *et al.*, 2002). Os dados sugerem que isolados ORSA circulantes na comunidade não refletem a simples transferência destas linhagens para a comunidade. Mais do que isso, sugere que este novo tipo de SCCmec IV, cuja estrutura é menor do que os demais tipos, tem uma mobilidade maior, o que aumenta a propensão a uma transferência para as cepas detentoras de diversos "backgrounds" através de transposons, plasmídeos, bacteriófagos e outros meios (BERGER-BACHI & ROHRER, 2002).

Os clones ORSA portadores do SCCmec tipo IV multiplicam-se com maior rapidez do que os demais ORSA adquiridos em ambiente hospitalar e são resistentes a menor número de antibióticos não-beta-lactâmicos. As linhagens do SCCmec tipo IV parecem ser derivados de uma população mais diversa de *S. aureus* do que os ORSA de ambiente hospitalar (OKUMA *et al.*, 2002). Por outro lado, as cepas epidêmicas possivelmente tiveram maior chance de adquirir resistência devido às altas taxas de multiplicação. Além disso, a grande habilidade para ser transmitida de um hospedeiro para outro faz com que essas cepas sejam amplamente disseminadas (MARTINEZ & BAQUERO, 2002). Na ausência de pressão seletiva por antibióticos, a alta taxa de crescimento apresentada pelos CA-ORSA pode ser um pré-requisito para que as cepas alcancem sucesso na colonização de humanos através de competição com as numerosas espécies bacterianas do ambiente.

Um marcador genético bastante estável que tem se observado nas cepas SCCmec tipo IV é um fator de virulência, uma leucocidina chamada Panton-Valentine (PVL) (VANDENESCH, *et al.* 2003). Estudos mostram que o envolvimento dessa PVL está relacionado, principalmente, com infecções de pele e pneumonia necrotizante (LINA, *et al.*, 1999; GILLET *et al.*, 2002). Observamos que as cepas pertencentes ao SCCmec tipo IV foram provenientes de cidades dos Estados de São Paulo e Pernambuco isolados dos seguintes materiais: abscesso de umbigo, na unidade de pediatria em Ribeirão Preto-SP; secreção de ferida cirúrgica, também na pediatria em Recife-PE e líquido pleural, na unidade de cirurgia torácica em Sorocaba-SP. É provável que esses clones possuam

também esse fator PVL característico de CA-ORSA, uma vez que foram isoladas de pele e pulmão. Porém, mais estudos precisam ser realizados quanto aos fatores de virulência que esses clones apresentam.

Todas as cepas SCCmec tipo IV apresentaram sensibilidade a sulfametoxazol-trimetoprim e ciprofloxacina. Essa característica de sensibilidade a sulfametoxazol-trimetoprim vem sendo observada em outros isolados portadores de SCCmec tipo IV (TRINDADE *et al.*, 2003; FEY, *et al.*, 2003; DAUM, *et al.*, 2002; SOUSA, *et al.*, 2003). Mais estudos precisam ser realizados para avaliar a possibilidade da utilização desse fator como um marcador para ORSA SCCmec tipo IV, ou seja, se resistência a oxacilina e sensibilidade a sulfametoxazol-trimetoprim poderia ser um indício da presença de um ORSA SCCmec tipo IV. Como a resistência a essa droga é mediada principalmente por plasmídeos é preciso saber se a inserção do SCCmec tipo IV se deu até o momento em cepas cujo "background" é de um perfil sensível ou se existe algum outro fator que influencie esta característica.

Dados da literatura mostram que o SCCmec tipo IV ou CA-ORSA tem sido encontrado entre as diversas linhagens de *S. aureus* pesquisados. Essas cepas são altamente virulentas, possuem uma alta taxa de multiplicação e não apresentam outros genes de resistência além do gene *mecA* (OKUMA *et al.* 2002). O isolamento deste tipo de cepa no Brasil isoladas já entre 1995 e 2000 reflete a existência e disseminação do SCCmec IV em nosso país, fato confirmado pelos recentes resultados de TRINDADE *et al.* (2003) que descrevem o isolamento de cepas de ORSA portadoras do SCCmec tipo IV em pacientes hospitalizados.

A definição de aquisição de ORSA na comunidade é que a infecção seja obtida em tempo menor ou igual a 3 dias de hospitalização (DAUM *et al.*, 2002). O isolamento de ORSA SCCmec tipo IV em pacientes hospitalizados compromete a aplicação dessa definição. Em muitos casos há dificuldade de se certificar se o paciente não teve contato nenhum com ambiente hospitalar ou qualquer outro tipo de atendimento ambulatorial ou até mesmo contato direto com pessoas que estiveram hospitalizadas recentemente. As linhagens denominadas NORSA (ORSA não-multirresistente) isoladas em hospitais são considerados descendentes de CA-ORSA (OKUMA *et al.*, 2002). Os 3 isolados SCCmec tipo IV parecem ser originados de diversos "backgrounds" genéticos conforme definidos pelo PFGE e padrão de RFLP do gene *coa*. Essa observação indica que há múltiplos "backgrounds" genéticos associados às linhagens CA-ORSA.

Há ainda a possibilidade de uma adaptação das cepas CA-ORSA devido à pressão seletiva por parte dos antimicrobianos mais potentes, ou por algum evento genético a cepa pode ter se tornado menos virulenta. Para esse clone ser bem sucedido dentro do hospital, teria de adquirir elementos genéticos de resistência de outras cepas, e isso acarretaria um custo adicional para a bactéria. Para sobreviver em ambiente sob forte pressão seletiva, a bactéria precisaria optar em desativar a expressão de outros genes menos importantes e preservar aqueles que lhe garanta a perpetuação, naquele momento. Trata-se de uma questão de equilíbrio, pois em geral o que se observa é uma baixa da expressão dos fatores de virulência nas cepas multirresistentes. O que tem se notado com a evolução da linhagem, é a transformação ou o surgimento de uma linhagem menos virulenta e com maior número de determinantes de resistência como tem acontecido com o CEB.

Durante uma disseminação de ORSA na comunidade é possível que a linhagem acabe perdendo o fator de resistência por falta de exposição aos antimicrobianos. Isso se observa em experimentos onde culturas sucessivas de ORSA em meios livres de antibióticos acabam levando a perda do fator de resistência (KATAYAMA *et al*, 2000). Se houver uma pressão seletiva pelo uso indiscriminado de antimicrobianos na comunidade, então haverá a possibilidade da bactéria não responder aos tratamentos comumente utilizados. O que se nota em nosso país é que o gerenciamento terapêutico de antimicrobianos nem sempre adequado, aliado a auto-medicação amplamente difundida poderiam estar favorecendo a seleção de microrganismos multirresistentes.

As cepas altamente virulentas são menos propensas a adquirir resistência uma vez que o hospedeiro é rapidamente eliminado e, portanto, ficam menos expostas ao tratamento com antibióticos. Em contrapartida, cepas pouco virulentas também são menos propensas a se tornar resistentes. Com poucos sinais clínicos, as infecções por essas cepas dificilmente são tratadas (MARTINEZ & BAQUERO, 2002). Assim, as cepas com níveis intermediários de resistência têm maiores chances de se tornar resistentes, uma vez que estas permanecem tempo suficiente no hospedeiro e oferecem sinais clínicos para que a infecção seja tratada tendo, dessa forma, tempo suficiente para adquirir resistência às drogas utilizadas. O *Staphylococcus aureus* tem uma grande habilidade para, rapidamente, adaptar-se a pressão seletiva por antibióticos (BERGER-BÄCHI & ROHRER, 2002). Em particular, o ORSA possui um agravante que, além da resistência intrínseca a virtualmente todos os antibióticos beta-lactâmicos, tem a tendência de acumular e desenvolver resistência a outras classes de antibióticos.

A compreensão do mecanismo de como as linhagens adquirem os genes de virulência ou resistência e como estes interagem frente à pressão externa é um constante desafio para clínicos, epidemiologistas e pesquisadores que desenvolvem novos fármacos.

6 . *Conclusões*

- 6.1. Os perfis de sensibilidade demonstrados pelas cepas com SCC*mec* tipos III e IV foram bem distintos, com sensibilidade a SXT e CIP podendo servir como marcadores epidemiológicos para cepas CA-ORSA.
- 6.2. A fagotipagem apresentou alto poder discriminatório, porém, baixa tipabilidade para cepas ORSA, HVISA e VISA.
- 6.3. As amostras ORSA isoladas em hospitais brasileiros apresentam elevada similaridade genética, o que justifica a homogeneidade encontrada nos resultados de antibiograma, fagotipagem e RFLP-PCR do gene *coa*.
- 6.4. O SCC*mec* tipo III está amplamente distribuído entre cepas ORSA e VISA brasileiras, inclusive em outros clones diferentes do CEB.
- 6.5. As cepas CA-ORSA portadoras do SCC*mec* tipo IV foram encontradas entre os isolados de hospitais brasileiros. É possível que essas cepas estejam sendo disseminadas na comunidade e nos hospitais do país.

7 . Referências Bibliográficas

ARBEIT, R.D. Laboratory procedures for the epidemiologic analysis of microorganisms. IN: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALLER, M.A.; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R.H. eds. **Manual of Clinical Microbiology**. 6 ed. Washington: American Society for Microbiology. cap. 17, 1995. p. 190-208.

ARCHER, G. L.; THANASSI, J.A.; NIEMEYER, D.M.; PUCCI, M.J. Characterization of *IS1272*, an insertion sequence-like element from *Staphylococcus haemolyticus*. **Antimicrob Agents Chemother**. v.40, p. 924-929, 1996.

BECK, W.D.; BERGER-BACHI, B.; KAYSER, F.H. Additional DNA in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and molecular cloning of *mec*-specific DNA. **J Bacteriol**. v. 165, p. 373-378, 1986.

BLAIR, J.E.; WILLIAMS, R.E.O. Phage Typing of Staphilococci. **Bull WHO**, Geneva, v.24, p.771-784, (1961) apud OLIVEIRA, G. A. Caracterização de cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de diferentes regiões do Brasil baseada em métodos fenotípicos e genotípicos. 1998.

BLANC, D.S.; FRANCIOLI, P.; HAUSER, P.M. Poor value of pulsed-field gel electrophoresis to investigate long-term scale epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Infect Genet Evol**. v. 2, p. 145-148, 2002.

- BOYCE, J.M. Are the epidemiology and microbiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* changing? **J Am Med Assoc.** v. 279, p. 623-624, 1998.
- BOYCE J.M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: detection, epidemiology, and control measures. **Infect Dis Clin North Am.** v. 3, p. 901-913, 1989.
- BROOKS, G.F.; BUTEL, J.S.; ORNSTON, L.N. **Microbiol Med.** 20 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.
- CAIAFFA FILHO, H.H.; LIMA, M.P.; SINTO, S.I.; ANDRIOLO, A.; MENDES, C.M.F. Avaliação da sensibilidade a teicoplanina e vancomicina em *Staphylococcus aureus* e estafilococos coagulase negativa. **Rev Assoc Med Bras.** v. 40, p. 77-80, 1994.
- CDC [on line] Disponível em: <http://www.cdc.gov/ncidod/hip/ARESIST/visa.htm>. Acesso em: 20 de outubro de 2003.
- CHAMBERS, H.F. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? **Emerg Infect Dis.** v.7, n.2, 2001.
- CHAMBERS, H. F. Methicillin resistance in Staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. **Clin Microbiol Rev.** v. 10, p. 781-791, 1997.
- CHIKRAMANE, S.G.; MATTHEWS, P.R.; NOBLE, W.C.; STEWART, P.R.; DUBIN, D.T. *Tn554* inserts in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from Australia and England. **J Gen Microbiol.** v. 137, p. 1301-1311, 1991.
- CLEWELL, D.B. Conjugative transposons, p. 130-139. In F. J. de Bruijn, J.R. Lupski, and G. M. Weinstock. **Bact genom.** Chapman & Hall, New York, 1998.
- COHEN, S.; SWEENEY, H.M. Transduction of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* dependent on an unusual specificity of the recipient strain. **J Bacteriol.** v. 104, p.1158-1167, 1970.
- COLLIGNON, P.; GOSBELL, I.; VICKERY, A.; NIMMO, G.; STYLIANOPOULOS, T.; GOTTLIEB, T. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Australia. Australian Group on Antimicrobial Resistance. **Lancet.** v. 352, p. 145-146, 1998.

CONTERNO, L.O.; WEY, S.B.; CASTELO, A. *Staphylococcus aureus* bacteremia: comparison of two periods and a predictive model of mortality. **Braz J Infect Dis.** v. 6, p. 288-297. 2002.

CONTERNO, L.O.; WEY, S.B.; CASTELO, A. Risk factors for mortality in *Staphylococcus aureus* bacteremia. **Infect Control Hosp Epidemiol.** v. 19, p. 32-37, 1998.

COOKSON, B. D.; APARICIO, P.; DEPLANO, A.; STRUELENS, M.; GOERING, R.; MARPLES, R. Inter-centre comparison of pulsed-field gel eletrophoresis for the typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **J Med Microbiol.** Essex, v. 44, p. 179-184, 1986.

CRISÓSTOMO, M. I.; WESTH, H.; TOMASZ, A.; CHUNG, M.; OLIVEIRA, D.C.; LENCASTRE, H. The evolution of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: similarity of genetic backgrounds in historically early methicillin-susceptible and -resistant isolates and contemporary epidemic clones. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.98, n. 17. p. 9865-9870, 2001.

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

DICKINSON, T. M.; ARCHER, G. L. Phenotypic expression of oxacillin resistance in *Staphylococcus epidermidis*: roles of *mecA* transcriptional regulation and resistant-supbopulation selection. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 44, p. 1616-1623, 2000.

DIEKEMA, D.J.; PFALLER, M.A.; TURNIDGE, J.; VERHOEF, J.; BELL, J.; FLUIT, A.C.; DOERN, G.V.; JONES, R.N.; SENTRY Participants Group. Genetic relatedness of multidrug-resistant, methicillin (oxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* bloodstream isolates from SENTRY Antimicrobial Resistance Surveillance Centers Worlwide. **Microb Drug Resist.** v. 6, p. 213-221, 2000a.

DIEKEMA, D.J.; PFALLER, M.A.; JONES, R.N.; DOERN, G.V.; KLUGER, K.C.; BEACH, M. L.; SADER, H.S.; And the SENTRY participants group. Trends in antimicrobial susceptibility of bacterial pathogens isolated from patients with bloodstream infections in the USA, Canada and Latin America. **Int J Antimicrob Agents.** v. 13, p. 257-271, 2000b.

DUBIN, D. T.; MATTHEWS, P. R.; CHIKRAMANE, S.G.; STEWART, P. R. Physical mapping of the *mec* region of an American methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 35, p. 1661-1665, 1991.

EASMON, C.F.S; GOODFELLOW, M. *Staphylococcus* and *Micrococcus* . In: PARKER, M.T.; COLLIER, L.H. eds. **Topley and Wilson's principles of bacteriology, virology and immunity**. 8. ed. London: Edward Arnold, p. 161-186, 1990.

EMBIL, J.; RAMOTAR, K.; ROMANCE L.; ALFA M.; CONLY, J.; CRONK, S.; TAYLOR, G.; SUTHERLAND, B.; LOUIE, T.; HENDERSON, E. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in tertiary care institutions on the Canadian prairies 1990-1992. **Infect Control Hosp Epidemiol.** v. 15, p. 646-51, 1994.

FEDER, H.M.Jr. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in 2 pediatric outpatients. **Arch Fam Med.** v. 9, p. 560-562, 2000.

FIELDS, P.I.; BLOM, K.; HUGHES, H.J.; HELSEL, L.O.; FENG, P.; SWAMINATHAN, B. Molecular characterization of the gene encoding H antigen in *Escherichia coli* and a development of a PCR restriction fragment length polymorphism test for identification of *E. coli* O157-H7 and O157:NM. **J Clin Microbiol.** v.35, p.1066-1070, 1997.

FITZGERALD, J.R.; STURDEVANT, D.R.; MACKIE, S.M.; GILL, S.S; MUSSER, J.M. Evolutionary genomics of *Staphylococcus aureus*: insights into the origin of methicillin-resistant strains and the toxic shock syndrome epidemic. **Proc Natl Acad Sci USA.** v. 98, p. 8821-8826, 2001.

FORBES, B.A.; SAHM, D.F.; WEISSFELD, A.S. Bailey & Scott's **Diagn Microbiol**. 10 ed. St Louis: Mosby, 1998.

GIESBRECHT, P.; KERSTEN, T.; MAIDHOF, H.; WECKE, J. Staphylococcal cell wall: morphogenesis and fatal variations in the presence of penicillin. **Microbiol Mol Biol Rev.** v.62, p. 1371-1414, 1988.

GILLET, Y.; ISSARTEL, B. Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for PVL and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. **Lancet.** v. 359, p. 753-759, 2002.

GROSS-SCHULMAN, S.; DASSEY, D.; MASCOLA, L.; ANAYA, C. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **J Am Med Assoc.** v. 280, p. 421-422, 1998.

HANAKI, H., K. KUWAHARA-ARAI, S. BOYLE-VAVRA, R. DAUM, H. LABISCHINKI, K. HIRAMATSU. Activated cell-wall synthesis is associated with vancomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strains Mu3 and Mu50. **J Antimicrob Chemother.** v. 42, p. 199-209, 1998.

HEROLD, B.C.; IMMERGLUCK, L.C.; MARANAN, M.C.; LAUDERDALE, D.S.; GASKIN, R.E.; BOYLE-VAVRA, S., *et al.* Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children with no identified predisposing risk. **J Am Med Assoc.** v. 279, p. 593-598, 1998.

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

HIRAMATSU, K.; CUI, L.; KURODA, M.; ITO, T. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Trends Microbiol.** v. 9, n. 10, p.486-493, 2001.

HIRAMATSU, K.; KONDO, N.; ITO, T. Genetic basis for molecular epidemiology of MRSA. **J Infect Chemother.** v. 2, p. 117-129, 1996.

HIRAMATSU, K. Molecular evolution of ORSA. **Microbiol Immunol.** v. 39, n. 8, p. 531-543, 1995.

HOLT, J.G. *et al.* **BERGEY'S Manual of Determinative Bacteriology.** 9 ed, Williams & Wilkins, 1994.

HOOKEY, J.V., RICHARDSON, J.F., COOKSON, B.D. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* based on PCR restriction fragment length polymorphism and DNA sequence analysis of the coagulase gene. **J Clin Microbiol.** v.36, p. 1083-1089. 1998.

HURLIMANN-DALEI, R. L; RYFFEL C.; KAYSER F. H.; BERGER-BACHI, B. Survey of the methicillin resistance –associated genes *mecA*, *mecR1-mecI*, and *femA-femB* in clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob Agents Chemother.** v.36, p. 2617-2621, 1992.

ITO, T. *et al.* Structural comparison of three types of Staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 45, p. 1323-1336, 2001.

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.** v. 43, p. 1449-1458, 1999.

JEVONS, M. P. "Celbenin"-resistant staphylococci. *Brazilian Medical Journal.* v.1. p. 124-125 (1961) apud HIRAMATSU, K.; KATAYAMA, Y.; YUZAWA, H.; ITO, T. Molecular genetics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Int J Med Microbiol.** v. 292, p. 67-74, 2002.

JOHN, J.F.J.; NEIL, L.B. Epidemiology and prevention of nosocomial infections caused by specific pathogens. In: MAYHALL, C.G. **Infect Control Hosp Epidemiol.** Baltimore: Williams & Wilkins, p. 271-290, 1996.

JONES, M.E.; KARLOWSKY, J.A.; DRAGHI, D.C.; THORNSBERRY, C.; SAHM, D.F.; NATHWANI, D. Epidemiology and antibiotic susceptibility of bacteria causing skin and soft tissue infections in the USA and Europe: a guide to appropriate antimicrobial therapy. **Int J Antimicrob Agents.** v.22, p. 406-419, 2003.

KALLEN, A.J.; DRISCOLL, T.J.; THOMTON, S.; OLSON, P.E.; WALLACE, M.R. increase in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at a Naval Medical Center. **Infect Control Hosp Epidemiol.** v. 21, p. 223-226, 2000.

KATAYAMA, Y.; ITO, T.; HIRAMATSU, K. A new class of genetic element, *Staphylococcus* Cassette Chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 44, 2000.

KERNODLE, D.S. Mechanisms of Resistance to beta-lactam Antibiotics. In: FISCHETTI, V.A. *et al.* **Gram-positive Pathogens.** cap. 62, American Society for Microbiology, Washington, 2000.

KIRBY, W.M.M.; BAUER, A.W., SHERRIS, J.C., TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by standartized single disk method. **Am J Clin Pathol,** Philadelphia, v. 45, p. 493-496, 1966.

- KOBAYASHI, N. *et al.* Analysis of diversity of mutations in the *mecI* gene and *mecA* promoter/operator region of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 42, p. 717-720, 1998.
- KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN JUNIOR, W.C. **Diagnóstico microbiológico - texto e atlas colorido.** 5 ed., Rio de Janeiro: Médica e Científica. p. 1465, 1999.
- KREISWIRTH, B.; KORNBLUM, J.; ARBEIT, R. D.; EISNER, W.; MASLOW, J. N.; McGEER, A.; LOW, D.E.; NOVICK, R. P. Evidence for a clonal origin of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Science.** v. 259, p. 227-230, 1993.
- KUWAHARA-ARAI, K.; KONDO, N.; HORI, S.; TATEDA-SUZUKI, E.; HIRAMATSU, K. Suppression of methicillin resistance in a *mecA*-containing pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain is caused by the *mecI*-mediated repression of PBP2' production. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 40, p. 2680-2685, 1996.
- LACEY R. W. Genetic control in methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. **J Med Microbiol.** v. 5, p. 497-508, 1972.
- L'HERITEAU, F.; LUCET, J.C.; SCANVIC, A.; BOUVET, E. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and familial transmission. **J Am Med Assoc.** v. 282, p. 1038-1039. 1999.
- LINA, G.; PIEMONT, Y.; GODAIL-GAMOT, F.; BES, M.; PETER, M.O.; GAUDUCHON, V.; VANDENESCH, F.; ETIENNE, J. Involvement of Pantone Valentine leukocidin producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. **Clin Infect Dis.** v. 29, p. 1128-1132, 1999.
- LINDENMAYER, J.M.; SCHOENFELD, S.; O'GRADY, R.; CARNEY, J.K. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a high school wrestling team and the surrounding community. **Arch Int Med.** v. 158. p. 895-899, 1998.
- LOWY, F.D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. **J Clin Invest.** v. 111, p. 1265-1273. 2003.

LUTZ, L.; MACHADO, A.; KUPLICH, N.; BARTH, A.L. Clinical failure of vancomycin treatment of *Staphylococcus aureus* infection in a tertiary care hospital in Southern Brazil. **Braz J Infect Dis.** v. 7, p. 224-228, 2003.

MA, X.X.; ITO, T.; TIENSASITORN, C.; JAMKLONG, M.; CHONGTRAKOOL, P.; BOYLE-VAVRA, S.; DAUM, R.S.; HIRAMATSU, K. Novel type of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* identified in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 46, p.1147-1152, 2002.

MAGUIRE, G.P.; ARTHUR, A.D.; BOUSTEAD, P.J.; DWYER, B.; CURRIE, B.J. Emerging epidemic of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in the Northern territory. **Med J Australia.** v. 164, p. 721-723, 1996.

MARTINEZ, J.J.; BAQUERO, F. Interactions among strategies associated with bacterial infection: pathogenecity, epidemicity and antibiotic resistance. **Clin Microbiol Rev.** v. 15, p. 647-679, 2002.

MOREIRA, M.; MEDEIROS, E.A.; PIGNATARI, A.C.; WEY, S.B.; CARDO, D.M. Effect of nosocomial bacteremia caused by oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* on mortality and lenght of hospitalization. **Rev Assoc Med Bras.** v.44, p. 263- 268, 1998.

MUSSER, J. M.; KAPUR, V. Clonal analisys of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from inter-continental sources: association of the *mec* gene with divergent phylogenetic lineages implies dissemination by horizontal transfer and recombination. **J Clin Microbiol.** v.30, p. 2058-2063, 1992.

MYERS, J.P.; LINNERNMAN, Jr.C.C. Bacteremia due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **J Infect Dis.** v. 145, p. 532-535, 1982.

NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. M100-S11, v 21, n 1. January, 2003.

OKUMA, K.; KOZUE, I.;TURNIDGE, J. D.; *et al.* Dissemination of new Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in the community. **J Clin Microbiol.** v. 40, n. 11, p. 4289-4294, 2002.

OLIVEIRA, D.C.; LENCASTRE, H. Multiplex PCR Strategy for Rapid identification os structural types and variants of the *mec* element in Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 46, n. 7, p. 2155-2161, 2002.

- OLIVEIRA, G.A. Caracterização de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a vancomicina isoladas no Brasil. São Paulo, 2002. p. [Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo].
- OLIVEIRA G.A., DELLI'AQUILA A.M., MASIERO R.L., LEVY C.E., GOMES M.S., CUI L., HIRAMATSU K., MAMIZUKA E.M. Isolation in Brazil of nosocomial *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin. **Infect Control Hosp Epidemiol.** v.22, p.443-448, 2001.
- OLIVEIRA, G.A.. Caracterização de cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de diferentes regiões do Brasil baseada em métodos fenotípicos e genotípicos. São Paulo, 1998. p. [Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo].
- PARKER, M. T. The significance of phage-typing patterns in *Staphylococcus aureus* . In: EASMON, C. S. F.; ADLAM, C. eds. **Staphylococci and Staphylococcal Infections**. London: Academic Press. v. 1, p. 33-62, 1983.
- PFALLER, M.A. Typing methods for epidemiologic investigation. In: BALLOWS, A.; HAUSLER, W.J.; HERRMANN, K.L.; ISEMBERG, H.D.; SHADOMY, H.J., eds. **Manual of Clinical Microbiology**. 5 ed. Washington, cap.23, 1993. p.171-182.
- QUINTILIANI, R. Jr.; COURVALIN, P. Mechanism of resistance to antimicrobial agents. In P.R. Murray; E.J. Baron; M.A. Pfaller; F.C. Tenover, and R.H. Tenover, **Manual of Clinical Microbiology**. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1995.
- RINGS, T.; FINDLAY, R.; LANG, S. Ethnicity and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in South Auckland. **N Z Med J.** v. 111, p.151, 1998.
- ROSATO, A.E.; KREISWIRTH, B.N.; CRAIG, W.A.; EISNER, W.; CLIMO, M.W.; ARCHER, G.L. *mecA-blaZ* co repressors in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 47, p. 1460-1463, 2003.
- RYFFEL, C.; TESCH, W. BIRCH-MACHIN, I.; REYNOLDS, P.E.; BARBERIS-MAKINO, L.; KAYSER, F.H.; BERGER-BACHI, B. Sequence comparison of *mecA* genes isolated from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. **Gene.** v.94, p. 137-138, 1990.

SADER, H.S.; GALES, A.C.; PFALLER, M.A.; MENDES, R. E.; ZOCCOLI, C.; BARTH, A.; JONES, R.N. Pathogen Frequency and resistance patterns in brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY antimicrobial surveillance program. **Braz J Infect Dis.** v. 5, p. 200-214, 2001.

SADER, H.S.; PIGNATARI, A.C.; HOLLIS, R.J.; JONES, R.N. Evaluation of interhospital spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in São Paulo, Brazil, using pulsed-field gel electrophoresis of chromosomal DNA. **Infect Control Hosp Epidemiol.** v. 15, p. 320-323, 1994.

SADER, H.S.; PIGNATARI, A.C.; HOLLIS, R.J.; LEME, I. JONES, R.N. Oxacillin and quinolone-resistant *Staphylococcus aureus* in São Paulo, Brazil: a multicenter molecular epidemiology study. **Infect Control Hosp Epidemiol.** v. 14, p. 260-264, 1993.

SARAVOLATZ, L.D.; MARKOWITZ, N.; ARKING, L.; POHLOH, D.; FISHER, E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Epidemiologic observations during a community-acquired outbreak. **Ann Int Med.** v. 96, p. 11-16, 1982.

SANTOS SOARES, M.J.; SILVA-CARVALHO, M.C.; FERREIRA-CARVALHO, B.T.; FIGUEIREDO, A.M. Spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* belonging to the Brazilian epidemic clone in a general hospital and emergence of heterogeneous resistance to glycopeptide antibiotics among these isolates. **J Hosp Infect.** v. 44, p. 301-308, 2000.

SENNA, J.P.M.; PINTO, C.A.; MATEOS, S.; QUINTANA, A. SANTOS, D.S. Spread of a dominant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clone between Uruguayan and South of Brazil Hospitals. **J Hosp Infect.** v.53, p. 156-157, 2003.

SKINNER, S.; INGLI, B.; MATTHEWS, P.R.; STEWART, P.R. Mercury and tetracycline resistance genes and flanking repeats associated with methicillin resistance on the chromosome of *Staphylococcus aureus*. **Mol Microbiol.** v.2, p. 289-298, 1988.

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

SOARES, M. J. S. *et al.* Spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* belonging to the Brazilian epidemic clone in a general hospital and emergence of heterogeneous resistance to glycopeptide antibiotics among these isolates. **J Hosp Infect.** v.44, p. 301-308, 2000.

SOUSA, M.A.; LENCASTRE, H. Bridges from hospitals to the laboratory: genetic portraits of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones. **FEMS Immunol Med Microbiol.** v. 8, p. 101-111, 2004.

SOUZA, M.A.; MIRAGAIA, M.; SANCHES, H.S.; AVILA, S.; ADAMSON, I.; CASAGRANDE, S.T.; BRANDILEONE, M.C.C.; PALACIO, R.; DELL'ACQUA, L.; HORTAL, M.; CAMOU, T.; ROSSI, A.; VELAZQUEZ-MEZA, M.E.; ECHANIZ-AVILES, G.; SOLORZANO-SANTOS, F.; HEITMANN, I.; LENCASTRE, H. Three-year assessment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America from 1996 to 1998. **J Clin Microbiol.** v. 39, p. 2197-2205, 2001.

STACEY, A.; BURDEN, P.; CROTON, G.; JONES, E. Contamination of television sets by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **J Hosp Infect.** v. 39, p. 243-244, 1998.

SUZUKI, E.; KUWAHARA-ARAI, K.; RICHARDSON, J. F.; HIRAMATSU, K. Distribution of *mec* regulator genes in methicillin-resistant *Staphylococcus* clinical strains. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 37, p. 1219-1226, 1993.

SUZUKI, E.; HIRAMATSU, K.; YOKOTA, T. Survey of methicillin-resistant clinical strains of coagulase-negative staphylococci for *mecA* gene distribution. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 36, p. 429-434, 1992.

TEIXEIRA, L.A.; RESENDE, C.A.; ORMONDE, L.R.; ROSENBAUM, R.; FIGUEIREDO, A.M.S.; DE LENCASTRE, H.; TOMASZ, A.. Geographic spread of multiresistant *Staphylococcus aureus* clones in Brazil. **J Clin Microbiol.** v. 33, p. 2400-2404, 1995.

TENOVER, F.C.; ARBEIT, R.D.; GOERING, R.V. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. **Infect Control Hosp Epidemiol.** v. 18, p. 426-439, 1997.

TENOVER, F.C.; ARBEIT, R.D.; GOERING, R.V.; MICKELSEN, P.A.; MURRAY, B.E.; PERSING, D. H.; SWAMINATHAN, B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strains typing. **J Clin Microbiol.** v. 33, p. 2233-2239, 1995.

TENOVER, F.C.; ARBEIT, R.; ARCHER, G.; BIDDLE, J.; BYRNE, S.; GOERING, R.; MILLER, J.M.; MULLIGAN, M.; PFALLER, M.A. Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. **J Clin Microbiol.** v. 32, p. 407-415, 1994.

TRAKULSOMBONN, S. *et al.* The first report on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin in Thailand. **J Clin Microbiol.** v.39, p.591-595, 2001.

TREES, D. L.; IANDOLO, J.J. Identification of a *Staphylococcus aureus* transposon (*Tn4291*) that carries the methicillin resistance gene(s). **J Bacteriol.** v. 170, p. 149-154, 1988.

TRINDADE, P.A.; PACHECO, R.L.; COSTA, S.F.; VAN DER HEIDJEN, I.M.; ROSSI, F.; ALMEIDA, G.M.D.; ITO, T.; HIRAMATSU, K.; MAMIZUKA, E.M.; LEVIN, A.S. A high prevalence of SCCmec type IV in nosocomial bloodstream isolates of MRSA. **43rd ICAAC Abstracts**, American Society for Microbiology, September. p. 151. Chicago, 2003.

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

WELLER, T.M.A. The distribution of *mecA*, *mecR* e *mecI* and sequence analysis of *mecI* and the *mec* promoter region in staphylococci expressing resistance to methicillin. **J Antimicrob Chemother.** v. 43, p. 15-22, 1999.

WENTWORTH, R.P.; NETTLEMAN, M.D.; JONES, R.N.; PFALLER, M.A. Bacteriophage typing of the Staphylococci. **Bacteriology.** v. 27, p. 253-271, 1963.

8. Anexos

Anexo 8.1 - Relação dos hospitais e suas localizações

Sigla	Hospital	Cidade
1PR	Hospital de Clínicas UFPR	Curitiba - PR
1RS	Hospital São Lucas	Porto Alegre - RS
2RS	Hospital Universitário Santa Maria	Santa Maria - RS
1SP	Hospital Universitário USP	São Paulo - SP
2SP	Hospital de Clínicas FMUSP	São Paulo - SP
3SP	Hospital de Clínicas de Ribeirão Preto	Ribeirão Preto - SP
4SP	Hospital Faculdade de Medicina PUC-SP	Sorocaba - SP
5SP	Hospital Geral de Vila Penteado	São Paulo - SP
1MS	Santa casa de Campo Grande	Campo Grande - MS
2MS	Hospital UFMS	Campo Grande - MS
1ES	Hospital HUCAM	Vitória - ES
1AM	Hospital Universitário de Manaus	Manaus - AM
1DF	Hospital Regional de Taguatinga	Brasília - DF
3DF	Hospital Base de Brasília	Brasília - DF
1MG	Hospital Triângulo Mineiro	Uberaba - MG
2MG	Hospital Universitário de Uberlândia	Uberlândia - MG

Sigla	Hospital	Cidade
1BA	Hospital São Rafael	Salvador - BA
1AL	Hospital Universitário de Maceió	Maceió - AL
1PA	Hospital Universitário JBB	Belém - PA
1SC	Hospital Universitário UFSC	Florianópolis - SC
2SC	Hospital Santa Luzia	Florianópolis - SC
1PE	Hospital das Clínicas	Recife - PE

Anexo 8.2 - Tabela com os resultados das tipagens de todas as 50 cepas estudadas.

Cepa	PFGE	PCR				Grupo fágico	CIMs								RFLP		
		mecA	mec-I	IS1272	ccr	SCCmec	OXA	VAN	SXT	CHL	ERY	AMP	TOB	TET	GEN	CIP	coa
R35	J	+	-	+	2	IV	512	2	<8	40	30	40	>18	1	>18	<0,2	coa3
R9	A	+	+	-	3	III	512	2	>152	>40	>40	>46	>18	8	>18	>8,0	coa1
R161	A	+	+	-	3	III	512	2	>152	>40	>40	>46	>18	>16	>18	>8,0	coa1
R50	A5	+	+	-	3	III	256	2	>152	>40	>40	24	>18	8	>18	>8,0	coa1
R5	A4	+	+	-	3	III	512	2	>152	>40	>40	>46	>18	>16	>18	>8,0	coa1
R267	I	+	+	-	3	III	512	2	120	8	>40	>46	>18	>16	>18	<0,2	coa1
BR5	A	+	+	+	3	III	512	8	>152	>40	>40	>46	>18	10	>18	>8,0	coa1
BR4	A	+	+	-	3	III	512	16	>152	>40	>40	>46	>18	3	>18	>8,0	coa1
BR3	A	+	+	-	3	III	32	16	>152	>40	>40	8	>18	2	>18	>8,0	coa1
BR2	A	+	+	-	3	III	256	8	>152	>40	>40	>46	>18	>16	>18	>8,0	coa1
BR1	A	+	+	-	3	III	64	16	>152	>40	>40	40	>18	10	>18	>8,0	coa1
R157	A	+	+	-	3	III	512	2	>152	>40	>40	>46	>18	>16	>18	>8,0	coa1
R20	A	+	+	-	3	III	>512	2	>152	7	>40	>46	>18	>16	>18	>8,0	coa1
R130	A	+	+	-	3	III	512	2	>152	>40	>40	>46	>18	>16	>18	>8,0	coa1
R93	A	+	+	-	3	III	512	2	>152	10	>40	>46	>18	>16	>18	>8,0	coa1
R153	A	+	+	-	3	III	512	2	>152	>40	>40	>46	>18	>16	>18	>8,0	coa1
R303	A2	+	+	-	3	III	512	2	120	9	>40	>46	>18	>16	>18	>8,0	coa1
R416	A	+	+	-	3	III	512	2	>152	>40	>40	9	>18	>16	>18	>8,0	coa1
R266	I	+	+	-	3	III	512	2	120	>40	>40	>46	>18	>16	>18	>0,2	coa1
R277	A	+	+	-	3	III	256	2	>152	4	>40	>46	>18	6,0	>18	>8,0	coa1
R79	A	+	+	-	3	III	256	2	80	>40	2	12	>18	2	1	4	coa1
R106	A	+	+	-	3	III	256	4	>152	>40	>40	>46	>18	1	>18	>8,0	coa4
R156	A1	+	+	-	3	III	256	2	>152	>40	>40	40	>18	>16	>18	>8,0	coa1
R4	H	+	+	-	3	III	512	2	>152	6	>40	>46	>18	>16	>18	>8,0	coa1
R21	K	+	+	-	3	III	512	2	>152	7	>40	24	>18	>16	>18	>8,0	coa1

Cepa	PFGE	PCR				Grupo fágico	CIMs										RFLP coa
		mecA	mec-I	IS1272	ccr	SCCmec	OXA	VAN	SXT	CHL	ERY	AMP	TOB	TET	GEN	CIP	
R229	E	+	+	-	3	III	512	2	>152	>40	>40	>46	>18	>16	14	>8	coa I
R16	A	+	+	-	3	III	512	2	>152	>40	>40	>46	>18	>16	>18	>8	coa I
R181	A	+	+	-	3	III	512	2	>152	>40	>40	>46	>18	>16	>18	>8	coa I
R253	A	+	+	-	3	III	512	2	>152	>40	>40	>46	>18	>16	>18	>8	coa I
R128	A	+	+	-	3	III	512	2	>152	>40	>40	>46	>18	>16	>18	>8	coa I
R36	A2	+	+	-	3	III	512	2	>152	6	>40	>46	>18	>16	>18	>8	coa I
R63	L	+	-	+	2	IV	64	1	<8	6	>40	8	<0,8	>16	<0,5	0,3	coa I
R14	A	+	+	-	3	III	>512	1	>152	>40	>40	>46	>18	>16	>18	>8	coa I
R222	D	+	-	+	2	IV	8	2	<8	12	>40	0,4	>18	1	<0,5	0,8	coa2
R357	M	+	+	+	3	III	256	2	>152	>40	>40	24	>18	>16	>18	>8	coa I
R401	B	+	+	-	3	III	256	1	>152	8	>40	>46	>18	14	>18	>8	coa I
R257	I1	+	+	-	3	III	512	4	4	6	>40	30	>18	14	>18	>8	coa I
HV135	A	+	+	-	3	III	>512	2	>152	>40	>40	>46	>18	>16	>18	>8	coa I
HV138	A	+	+	-	3	III	512	2	>152	>40	>40	>46	>18	>16	>18	>8	coa I
HV131	A	+	+	-	3	III	512	4	>152	>40	>40	>46	>18	>16	>18	>8	coa I
HV139	A	+	+	-	3	III	512	8	>152	>40	>40	>46	>18	14	>18	>8	coa I
HV35	A	+	+	-	3	III	512	4	>152	>40	>40	>46	>18	>16	14	>8	coa I
HV37	A	+	+	-	3	III	512	8	>152	>40	>40	>46	>18	4	10	>8	coa I
HV133	A	+	+	-	3	III	512	2	>152	>40	>40	>46	>18	>16	>18	>8	coa I
T482	A	+	+	-	3	III	256	2	>152	6	>40	8	>18	>16	>18	>8	coa I
HV21	A	+	+	+	3	III	512	4	>152	>40	>40	>46	>18	>16	10	>8	coa I
HV23	A	+	+	-	3	III	512	4	>152	>40	>40	>46	>18	>16	>18	>8	coa I
T511	A	+	+	-	3	III	256	4	>152	4	16	40	>18	2	>18	<0,3	coa I
HV16	A	+	+	-	3	III	512	4	>152	>40	>40	>46	>18	>16	>18	>8	coa I
HV26	A	+	+	-	3	III	512	4	>152	>40	>40	>46	>18	>16	>18	>8	coa I

Valores em negrito e sublinhados representam CIM resistente; valores sublinhados e em itálico representam resistência intermediária. OXA: oxacilina; VAN: vancomicina; SXT: sulfametoxazol-trimetoprim; GEN: gentamicina; ERY: eritromicina; AMP: ampicilina; TOB: tobramicina; TET: tetraciclina; CHL: cloranfenicol; CIP: ciprofloxacina