

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

FABIANA DE CÁSSIA ROMANHA STURMER

**CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DO ELEMENTO *CCR* EM
Staphylococcus aureus RESISTENTES À METICILINA ISOLADOS
NO SUL DO BRASIL**

Porto Alegre – RS

2008

FABIANA DE CÁSSIA ROMANHA STURMER

**CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DO ELEMENTO *CCR* EM
Staphylococcus aureus RESISTENTES À METICILINA ISOLADOS
NO SUL DO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Biologia Celular e Molecular – Mestrado, da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – PUCRS, requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Orientador : Prof. Dr. Carlos Alexandre Sanchez Ferreira

Porto Alegre, RS

2008

A comissão abaixo assinada aprova a presente dissertação:

**CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DO ELEMENTO *CCR* EM *Staphylococcus aureus*
RESISTENTES À METICILINA ISOLADOS NO SUL DO BRASIL**

elaborada pela mestranda

FABIANA DE CÁSSIA ROMANHA STURMER

como requisito para obtenção do título de
MESTRE EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Professor Doutor Carlos Alexandre Sanchez Ferreira (Orientador)

COMISSÃO EXAMINADORA:

Ao meu esposo Giovanni, que sempre acreditou em mim e me incentivou;

Ao anjo da minha vida, Rafaela;

Aos meus pais, Rui Rodolfo Romanha (*in memoriam*) e
Leonir Dal Forno Romanha, que estiveram sempre do meu lado;

Aos meus “pais” de coração, Marino e Terezinha, e vó Rosalina,
pelo carinho, incentivo e força.

A todos os demais que torceram e acreditaram neste sonho.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, em primeiro lugar.

Aos **meus orientadores**, Professor Doutor Carlos Alexandre Sanchez Ferreira e Professora Doutora Sílvia Dias de Oliveira, pela paciência, dinamismo e dedicação. Sem dúvida nenhuma são os melhores profissionais com quem já trabalhei, meu muito obrigado.

Aos **colegas de laboratório** que não mediram esforços para que este trabalho fosse realizado, em especial à Stéphanie Wagner Gallo e ao Otávio Nunes Hallal Raro.

Ao **Laboratório LABMED**, em especial à Doutora Marta Maria Medeiros F. Duarte.

Ao **meu esposo** Giovani, que sempre me incentivou e acreditou em mim, e à **nossa filha** Rafaela.

Aos demais **colegas e professores do PPGBCM** e a todas as pessoas que de alguma forma me apoiaram e contribuíram para que eu pudesse trilhar meu caminho.

A todos, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

Os *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) encontram-se entre os principais agentes de infecção hospitalar, para os quais há grande dificuldade em se obter antimicrobianos para o seu controle. A resistência à meticilina é codificada pelo gene *mecA*, que está localizado em um elemento genético móvel denominado “staphylococcal cassette chromosome *mec*” (SCC*mec*). O SCC*mec* também possui o complexo gênico *ccr* (*ccrA* e *ccrB* ou *ccrC*) e a região J, que contém genes que conferem resistência a drogas não beta-lactâmicas. São conhecidos cinco tipos de SCC*mec*, os tipos I, II e III predominantes em infecções nosocomiais, enquanto os tipos IV e V são, mais comumente, associados a infecções adquiridas na comunidade. Neste contexto, este estudo se propôs a realizar a caracterização fenotípica e genotípica da resistência à meticilina de isolados de *S. aureus* e fenotípica da resistência à vancomicina, bem como a determinação dos subtipos de *ccr* associados. Para tanto, foram avaliadas 40 amostras de *S. aureus* obtidas no Serviço de Microbiologia do Laboratório de Análises Clínicas (LABIMED/Hospital de Caridade Astrogildo de Azevedo – Santa Maria/RS). A concentração inibitória mínima às drogas oxacilina e vancomicina foi determinada pelo método de diluição em agar. A detecção de *mecA* e dos alótipos de *ccr* foi realizada através da reação em cadeia da polimerase (PCR). Todos os isolados testados foram considerados resistentes à oxacilina. Nenhum dos isolados foi classificado como resistente à vancomicina; no entanto, 25% (10/40) dos isolados apresentaram resistência intermediária à vancomicina. O gene *mecA* foi detectado em todos os isolados. O *ccrAB1* foi detectado em nove isolados (22,5%) e o *ccrAB3* em 23 (57,5%). Oito isolados foram caracterizados como não *ccrAB1* e não *ccrAB3*. A proporção de alótipos *ccrAB3*, associado a SCC*mec* tipo III, sugere que o clone epidêmico brasileiro (BEC) também possa estar presente nos hospitais do Estado do Rio Grande do Sul (Brasil). Considerando que a caracterização do *ccr* nunca havia sido relatada a partir de isolados desta região do Brasil, este trabalho pode contribuir para o estudo da dinâmica do MRSA na América do Sul.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*. Infecção hospitalar. Antimicrobianos.

ABSTRACT

Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) are important agents of nosocomial infection, to which considerable difficulty has been faced in order to obtain efficient antimicrobials. Methicillin resistance is codified by the gene *mecA*, which is located in a mobile genetic element named staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*). SCC*mec* also contains the *ccr* gene complex (*ccrA* and *ccrB* or *ccrC*), and the region J, which contains the genes responsible by the resistance against non beta-lactamic drugs. Five types of SCC*mec* have been described, being types I, II, and III the most common in nosocomial infections, while types IV and V are, usually, associated to community-acquired infections. In this sense, this study had the aim to characterize phenotypically and genotypically the methicillin resistance and phenotypically the vancomycin resistance of *S. aureus* isolates, as well as the associated *ccr* subtypes. Forty isolates from the “Serviço de Microbiologia do Laboratório de Análises Clínicas (LABIMED/Hospital de Caridade Astrogildo de Azevedo – Santa Maria/RS)” were evaluated. The minimum inhibitory concentrations to oxacillin and vancomycin were determined by agar dilution method. The detection of *mecA* and the *ccr* alotypes were performed by polymerase chain reaction (PCR). All isolates tested were considered resistant to oxacillin. No isolate were considered resistant to vancomycin, but 25% (10/40) presented intermediary resistance to vancomycin. The gene *mecA* was detected in all isolates. *ccrAB1* was detected in nine isolates (22.5%) and *ccrAB3* in 23 (57.5%). Eight isolates were characterized as non-*ccrAB1* and non-*ccrAB3*. The proportion of *ccrAB3*, which is associated to SCC*mec* type III, suggests that the Brazilian epidemic clone (BEC) may also be present in the hospitals of Rio Grande do Sul State (Brazil). Considering that no *ccr* characterization was reported with in *S. aureus* isolates from this region of Brazil, this study may significantly contribute to the understanding of the MRSA dynamics in South America.

Key words: *Staphylococcus aureus*. Nosocomial infection. Antimicrobials.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Elementos SCC*mec* tipos I-V descritos em *S. aureus*..... 16

Figuras do artigo científico

Figure 1 - Electrophoresis of amplification products from *mecA* gene (lanes 1 to 4) on 0.8% agarose gel stained with ethidium bromide and 100 bp molecular mass marker (lane 5) 27

Figure 2 - Detection of *ccrAB1* and *ccrAB3*. λ /*HindIII* (lane 1), positive control for *ccrAB3* (lane 2), strains positive for *ccrAB3* (lanes 3 to 5), negative control for *ccrAB3* reaction (lane 6), positive control for *ccrAB1* (lane 7), strains positive for *ccrAB1* (lanes 8 to 10), and negative control for *ccrAB1* reaction (lane 11). 27

LISTA DE TABELAS

Tabelas do artigo científico

Table 1 -	Primers used to amplify <i>mecA</i> and <i>ccr</i> (<i>ccrAB1</i> and <i>ccrAB3</i>)	24
Table 2 -	Genotyping and Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of the Meticillin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i> strains.....	26

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	12
2.2 VIRULÊNCIA.....	12
2.3 ANTIMICROBIANOS E RESISTÊNCIA.....	13
2.4 MRSA E O <i>Staphylococcal chromossome cassette MEC (SCCMEC)</i>	15
3 OBJETIVOS	20
3.1 OBJETIVO GERAL	20
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
4 ARTIGO CIENTÍFICO – Full Title: Partial Characterization of <i>Ccr</i> Element in Methicillin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i> Isolates from Southern Brazil	21
ABSTRACT	22
INTRODUCTION.....	23
MATERIALS AND METHODS.....	23
RESULTS.....	26
DISCUSSION.....	28
REFERENCES.....	30
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	33
6 CONCLUSÕES	36
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

LISTA DE ABREVIATURAS

BEC	Clone epidêmico Brasileiro
BORSA	<i>Borderline Oxacillin Resistant Staphylococcus aureus</i>
CA-MRSA	Community Associated Methicillin Resistant Staphylococcus aureus
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNAse	Desoxirribonuclease
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> (ácido etilenodiamino tetra-acético)
HA-MRSA	<i>Healthcare-Associated Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus</i>
KCl	Cloreto de potássio
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> Resistente à Meticilina
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
<i>Orf</i>	<i>Open reading frame</i>
PCR	Reação da Cadeia pela Polimerase
PBP	<i>Penicillin Binding Protein</i>
PBP2a	<i>Penicillin Binding Protein 2a</i>
PFGE	Eletroforese em campo elétrico pulsado
SCC _{mec}	<i>Staphylococcal Cassette Chromosome mec</i>
SES	Enterotoxinas estafilococócicas
Tris HCl	<i>Tris (hydroxymethyl) Amiomethane Hydrochloride</i>
TSST-1	Síndrome do Choque Tóxico
USA	<i>United States of America</i>
VISA	<i>Staphylococcus aureus</i> com resistência intermediária à vancomicina
VSSA	<i>Staphylococcus aureus</i> sensível à vancomicina.
VRE	<i>Enterococcus</i> resistente à vancomicina
VRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à vancomicina

1 INTRODUÇÃO

O *Staphylococcus aureus* encontra-se entre os principais agentes de infecção hospitalar, para o qual há grande dificuldade em se obter antimicrobianos ativos para o seu controle ^{1,2}.

A resistência a um grande número de drogas antimicrobianas apresentada por linhagens de *S. aureus* torna difícil o controle de infecções causadas por esse microrganismo³. Os achados epidemiológicos de *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina (MRSA) vêm sofrendo mudanças no decorrer dos anos ^{4,5}. No Brasil e em outros países, as técnicas moleculares são importantes para a elucidação epidemiológica da infecção *Staphylococcus*, especialmente por MRSA, as quais têm sido adquiridas por caráter endêmico ao longo de várias décadas ^{6,7,8,2}.

O aumento crescente da frequência desses microrganismos e a possibilidade do aparecimento de amostras resistentes à vancomicina tornam importante a investigação epidemiológica e controle da disseminação deste patógeno. No Brasil, apesar dos estudos descrevendo a disseminação de um clone predominante em diversos hospitais e diferentes regiões do país, ainda não existe dados em relação aos tipos de *ccr* na região. A tipificação molecular desses isolados podem tornar uma ferramenta essencial para uma melhor compreensão epidemiológica desse microrganismo.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Staphylococcus aureus*

As bactérias do gênero *Staphylococcus* são cocos Gram-positivos que pertencem à família *Micrococcaceae*⁹, sendo composto de 35 espécies, entre as quais, 17 subespécies podem ser isoladas de amostras biológicas humanas^{10, 11}. São anaeróbios facultativos, não apresentam motilidade, não formam esporos e incluem-se entre os microrganismos produtores de catalase^{12, 13}. Até a década de 80, o *Staphylococcus aureus* era considerado a única espécie coagulase positiva, sendo o resultado do teste da coagulase definitivo para a identificação dessa espécie. Posteriormente, foram isoladas, a partir de infecções humanas e animais, as espécies *S. schleiferi*¹⁴, *S. hyicus*¹⁵ e *S. intermedius*¹⁶, que também são produtoras de coagulase. A diferenciação destes estafilococos baseia-se em outras propriedades fisiológicas e bioquímicas, como fermentação do manitol, endonuclease termoestável e teste da desoxirribonuclease, que são provas confirmatórias adicionais utilizadas para a caracterização do patógeno¹⁷. Comparativamente, são microrganismos que se multiplicam sob condições de alta pressão osmótica e pouca umidade, o que explica a sua sobrevivência nas secreções nasais e na pele¹.

Em torno de 30 a 50% da população humana é portadora desta bactéria, sendo que o seu principal habitat é a membrana mucosa da nasofaringe. Neste local, estas cepas podem persistir como membro transitório ou persistente da microbiota normal, sem causar nenhuma sintomatologia¹⁸.

2.2 VIRULÊNCIA

Os *S. aureus* apresentam uma variedade de fatores de virulência que incluem moléculas de adesão e peptidoglicano¹⁹. Alguns isolados de *S. aureus* produzem cápsula, que pode impedir a sua fagocitose pelos leucócitos polimorfonucleares, auxiliando sua perpetuação em espécimes clínicos²⁰. Estas bactérias também produzem várias enzimas como coagulase, proteína A estafilocócica, desoxirribonuclease (DNase), adesinas, fibrinolisinases, hialuronidases, hemolisinas e lipases, bem como uma variedade de produtos extracelulares tóxicos, como a toxina da síndrome

do choque tóxico (TSST-1) e as enterotoxinas estafilocócicas (SES)^{21,22}. A importância desses patógenos reside na combinação da virulência mediada por suas toxinas, seu caráter invasivo e seu perfil de resistência aos antimicrobianos²³.

2.3 ANTIMICROBIANOS E RESISTÊNCIA

O início do uso clínico dos antimicrobianos, nas décadas de 1940 a 1950, trouxe para todo o mundo a equivocada ilusão de que os antibióticos seriam substâncias capazes de controlar todas as doenças infecciosas até então responsáveis por milhares de mortes²⁴. Antes da descoberta dos antibióticos, a mortalidade por sepse por *S. aureus* alcançava mais de 80% dos indivíduos infectados²⁵ e o antibiótico capaz de controlar esse microrganismo foi a sulfonamida, que, entretanto, foi usada sem muito sucesso nos casos de osteomielite causada por *S. aureus* entre 1937 e 1942²⁶.

O advento do uso clínico das sulfonamidas, em 1933, e em seguida da penicilina, em 1941, levou à constatação da ocorrência de resistência aos agentes antimicrobianos, podendo ser uma característica natural das espécies, ou ser adquirida por cepas individuais dentro de uma população sensível²⁷. A aquisição de resistência em *S. aureus* pode ocorrer por mutação de gene cromossômico e/ou por transferência gênica horizontal (transdução, transformação ou, mais comumente, conjugação)²⁸. No caso de resistência adquirida, genes exógenos de resistência a drogas antimicrobianas são encontrados em alguns elementos genéticos móveis (plasmídeos, seqüências de inserção/transposons e ilhas genômicas) de bactérias resistentes²⁹.

A partir de 1942, a penicilina passou a ser utilizada para o tratamento de infecções em seres humanos e, rapidamente, reduziu a mortalidade por sepse de 80% para 35%³⁰, tendo sido um dos primeiros antibióticos a ter sucesso no tratamento das infecções causadas por este microrganismo. O mecanismo de ação da penicilina se deve à ligação desse fármaco à proteína de ligação a penicilina (PBP – *Penicilin Binding Protein*), as quais atuam nas etapas finais da formação da parede celular das bactérias. Essas proteínas promovem a formação das pontes transversais de pentaglicinas do peptidoglicano, através da ligação da D-alanina de uma cadeia peptídica com a L-lisina da cadeia subsequente. O *S. aureus* produz quatro tipos de PBPs (PBP1, PBP2, PBP3, PBP4)^{31,32}.

As penicilinas são antibióticos beta-lactâmicos e um dos mecanismos de resistência a estas drogas é mediado por um plasmídeo, o qual codifica uma beta-lactamase capaz de hidrolisar o anel beta-lactâmico destas drogas^{33, 31}. A introdução da benzilpenicilina, em 1944, foi acompanhada pelo aparecimento de cepas de estafilococos produtoras de β -lactamase, com frequência de 5% em 1946, passando para 50% em 1950³⁴. Com o objetivo de minimizar o problema causado pelo aumento da prevalência de *S. aureus* produtores dessas enzimas³⁵, em 1959, foi produzida a primeira penicilina semi-sintética resistente às β -lactamases (metecilina), que possui radicais químicos que as protegem da ação das β -lactamases^{36, 31}.

Um dos marcos na terapia anti-estafilocócica foi o surgimento de *Staphylococcus aureus* resistentes a metecilina (MRSA)³⁵, e 25 a 30 anos depois, 25% das linhagens hospitalares eram resistentes a esta droga^{37, 38}. Algum tempo depois do surgimento das isoxazolipenicilinas (oxacilina, dicloxacilina, cloxacilina e flucloxacilina), que são estáveis em pH ácido e apresentam alta capacidade de ligação às proteínas plasmáticas (80%), a metecilina deixou de ser comercializada em muitos locais, inclusive no Brasil^{39, 40}. Apesar da oxacilina ser usada no Brasil, e não a metecilina, continua sendo empregada a expressão “metecilina resistente” ou a sigla MRSA (do inglês Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*) para designar as linhagens de *S. aureus* que não respondem ao tratamento com metecilina e, por extensão, às demais isoxazolipenicilinas³⁹.

Atualmente, quase a totalidade dos estafilococos são produtores de β -lactamases^{41, 16, 42}. A taxa de resistência à metecilina dos *S. aureus* varia consideravelmente de um país para outro. Nos Estados Unidos houve um aumento de MRSA de 4% em 1980 para 50% no final da década de 90⁴³, enquanto no Norte da Europa, a prevalência fica abaixo de 5%⁴⁴.

Algumas linhagens de *S. aureus* apresentam baixos níveis de suscetibilidade às penicilinas resistentes a penicilinases, caracterizadas por apresentar uma concentração inibitória mínima (CIM) de oxacilina de 2 a 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ⁴⁵. Estas linhagens também são denominadas como BORSA (*Borderline Oxacillin Resistant Staphylococcus aureus*). Mecanismos bastante diferentes foram descritos para elucidar esse fenótipo, sendo primeiramente explicado pela hiperprodução de beta-lactamases, uma vez que as linhagens que apresentavam essa baixa sensibilidade tornaram-se sensíveis a penicilinas resistentes a penicilinases na presença de inibidores de beta-lactamases^{46, 47}. Porém, este fenótipo não pode ser atribuído

somente à hiperprodução de beta-lactamase, pois linhagens transformadas com um plasmídeo contendo o gene para beta-lactamase de uma linhagem *borderline* hiperprodutora desta enzima permaneceram sensíveis à meticilina e à oxacilina^{48, 49}. Além disso, Massidda et al.⁵⁰ e Gal et al.⁵¹ sugeriram que as linhagens que apresentaram o fenótipo *borderline* possuíam uma metililase ligada à membrana, o que foi caracterizado, posteriormente, por Keserü et al.⁵².

Além das penicilinas resistentes às beta-lactamases, os glicopeptídeos constituem uma alternativa para o tratamento das infecções estafilocócicas. Os glicopeptídeos, como a vancomicina e a teicoplanina, inibem a síntese de peptideoglicano ligando-se à porção terminal D-alanina-D-alanina do pentapeptídeo, impedindo que ocorram as reações de transpeptidação e transglicosilação, e são as drogas de escolha para o tratamento de infecções causadas por MRSA^{53, 54}.

O surgimento da resistência aos glicopeptídeos entre os *S. aureus* se tornou uma preocupação constante^{55, 56, 57}. O CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) estabeleceu como sensível (VSSA), intermediário (VISA) e resistente (VRSA) aqueles estafilococos cujo crescimento é inibido por concentrações de vancomicina <2 µg/mL, 4 – 8 µg/mL e ≥16 µg/mL, respectivamente⁵⁸. Linhagens de VISA foram observadas pela primeira vez no Japão em 1996⁵⁹ e, posteriormente, houve relatos de VISA nos Estados Unidos^{60, 61, 62}. Sugere-se que o mecanismo de resistência que resulta nas CIMs intermediárias seja derivado de aumento da espessura da parede celular⁶³. Mais recentemente, linhagens VRSA foram isoladas de três pacientes nos Estados Unidos^{64, 65, 66}. O fenótipo VRSA é conferido através de um transposon que contém o gene *vanA*, além de outros genes associados ao VRE (*Vancomycin Resistant Enterococcus*)⁶⁷. O gene *vanA* codifica uma ligase de D-alanina-D-lactato, que catalisa a síntese de precursores de peptideoglicano com baixa afinidade por glicopeptídeos⁶⁸.

2.4 MRSA E O *Staphylococcal Chromosome Cassete MEC* (SCCMEC)

Os MRSA são resistentes a todas as drogas beta-lactâmicas, pois expressam uma PBP de baixa afinidade a estes antibióticos, denominada PBP2a ou 2'⁶⁹.

A resistência à meticilina é determinada pela aquisição de um cassete estafilocócico cromossomal-*mec* (*staphylococcal chromosome cassette mec* – SSC*mec*), um elemento genético móvel de 20-60 kb (Figura 1)^{70, 41, 71, 72}.

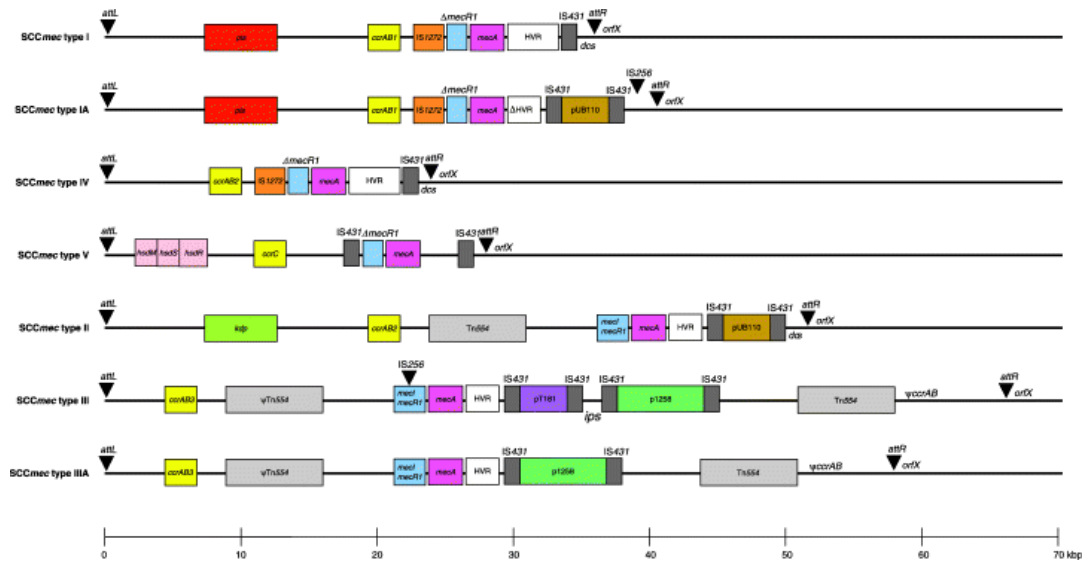


Figura 1- Elementos SCCmec tipos I-V descritos em *S. aureus*.
Fonte: Hanssen e Solliid ⁷³.

O SCCmec é uma ilha genômica que está inserida na porção final 3' de uma região de fase aberta de leitura (*orf*, *open reading frame*) de função desconhecida, denominada *orfX*, que está localizada próxima à origem de replicação de *S. aureus*. Desde o descobrimento do primeiro elemento SCCmec ⁷⁰, vários tipos de elementos foram identificados através de seqüenciamento de nucleotídeos. O elemento SCCmec é composto por dois componentes genéticos essenciais, o complexo gênico *mec* e o complexo gênico *ccr*. O complexo gênico *mec* é composto pelos seguintes elementos estruturais:

- a) IS431 e IS1272: seqüências de inserção responsáveis pela codificação de genes adicionais determinantes de resistência ⁷⁴.
- b) *mecR1* e *mecI*: genes reguladores da expressão de PBP2a que codificam um receptor de membrana (*mecRI*) e um gene repressor (*mecI*) ⁷⁵.
- c) *mecA*: gene que codifica a resistência a beta-lactâmicos através da expressão da PBP2a ⁵³.

Quatro classes do complexo *mec* foram identificadas de acordo com os agrupamentos estruturais (Figura 1) ⁷⁶:

- Classe A: IS431-*mecA*-*mecR1*-*mecI*;
- Classe B: IS431-*mecA*-*mecR1*-IS1272;
- Classe C: IS431-*mecA*-*mecR1*- IS431;
- Classe D: IS431-*mecA*-*mecR1*.

A regulação da expressão do gene *mecA* e a quantidade de PBP2a produzida dependem de ao menos dois genes reguladores agindo ao nível da transcrição, *mecI* e *mecR1*^{77, 59, 78}. O gene *mecI* codifica a proteína MecI, que se liga ao promotor do gene *mecA* reprimindo a sua transcrição. O gene *mecR1* codifica a proteína transdutora de sinal MecR1. Quando o *S. aureus* é exposto a drogas beta-lactâmicas, o domínio C-terminal da proteína MecR1 sofre uma acilação em uma serina. Essa modificação na proteína leva a uma mudança conformacional, que está, provavelmente, envolvida na transdução de sinal através da membrana^{79, 80}. O domínio citoplasmático sofre uma autoclivagem, que se acredita ativar o domínio protease para a hidrólise da proteína repressora MecI, levando ao término da repressão da transcrição de *mecA*^{81, 82, 75}.

O complexo gênico *ccr* contém os genes *ccrA* e *ccrB* (genes *ccrA* e *ccrB* aparecem juntos) ou *ccrC*, que codificam as recombinases A, B e C da família invertase/resolvase, que são responsáveis pela motilidade do SCC*mec*^{70, 41, 76, 83}. Quatro alótipos de *ccrAB* foram identificados (*ccrAB1*, *ccrAB2*, *ccrAB3* e *ccrAB4*) e, recentemente, foi relatado um novo complexo gênico *ccr*, que contém somente o gene *ccrC*⁷⁶.

O restante do DNA presente no SCC*mec* é designado como região J (J de *junkyard*, em inglês), que contém vários genes e/ou pseudogenes, incluindo genes que codificam resistência para antibióticos não beta-lactâmicos e metais pesados, alguns dos quais são oriundos de plasmídeos ou transposons^{29, 84}.

O SSC*mec* é classificado em cinco tipos diferentes que variam de acordo com as combinações de diferentes classes do complexo gênico *mec* e do alótipo de *ccr*, como segue abaixo e esquematizado na Figura 1^{41, 76, 72}:

- Tipo I: classe B (IS1272 - Δ *mecR1-mecA* - IS431) e *ccrAB1*;
- Tipo II: classe A (*mecI* - *mecR1* - *mecA*- IS431) e *ccrAB2*;
- Tipo III: classe A e *ccrAB3*;
- Tipo IV: classe B e *ccrAB2*, e
- Tipo V: classe C2 (IS431 - Δ *mecR1-mecA* - IS431) e *ccrC*.

O tipo I (34Kb) não apresenta genes de resistência a antimicrobianos em sua região J, enquanto o tipo II (52Kb) apresenta uma cópia integrada do plasmídeo pUB110, que codifica resistência para tobramicina e bleomicina. O tipo III (66Kb) apresenta uma cópia integrada do plasmídeo pT181 e do transposon Tn554, que codificam resistência para tetraciclina e mercúrio, eritromicina e espectinomicina,

respectivamente ⁴¹. O *SCCmec* tipo IIIa difere do *SCCmec* tipo III pela ausência do pT181 e seus elementos IS431. O *SCCmec* tipo IIIb não apresenta as cópias integradas de Tn554, pT181 e do operon *mer* com suas seqüências de inserção associadas ⁸⁵. O tipo IV é subdividido em IVa, IVb, IVc e IVd devido a diferenças na região J ^{29, 86, 87}. Alguns tipos de *SCCmec* estruturalmente relacionados ao tipo IV apresentam o alótipo *ccrAB4* ⁸⁸. Boyle-Vavra et al. ⁸⁹ descreveram um novo subtipo para o *SCCmec* tipo V designado como *SCCmec* V_T, contendo uma nova variante de *ccrC* (*ccrC2*). Os mesmos autores detectaram um novo *SCCmec* que contém todas as características do *SCCmec* IV e também o *ccrC*.

As infecções causadas por MRSA eram exclusivamente documentadas em hospitais. Entretanto, nos últimos anos, as infecções causadas por MRSA oriundos da comunidade, conhecidos como CA-MRSA, têm sido documentadas de modo crescente em indivíduos saudáveis ^{90, 91}. No Uruguai, por exemplo, os primeiros casos foram identificados em 2002 e o Ministério de Saúde Pública reportou, entre janeiro e outubro de 2004, 3.836 novos casos de infecções por CA-MRSA ⁹². Diferentemente dos MRSA oriundos de ambiente hospitalar, conhecidos como HA-MRSA, que é multiresistente, CA-MRSA é sensível à maioria de classes de antimicrobianos, exceto a beta-lactâmicos ⁹³.

Os CA-MRSA têm sido descritos predominantemente como portadores do alótipo *SCCmec* tipo IV e V, enquanto os HA-MRSA são mais comumente portadores dos alótipos *SCCmec* tipo I, II e III. Os alótipos *SCCmec* tipo IV são subdivididos, atualmente em IVa, IVb, IVc e IVd ^{93, 41, 29, 71, 86}. É provável que a origem do *SCCmec* IV em *S. aureus* tenha surgido a partir de *S. epidermidis* coagulase negativa ⁹⁴. Além disso, os tipos IV e V possuem resistência predominantemente aos antibióticos beta-lactâmicos, não apresentando genes de resistência a antimicrobianos na região J ^{29, 76}.

Com o auxílio de técnicas moleculares, foi verificada a existência de cinco clones de MRSA disseminados internacionalmente, designados como ibérico, brasileiro, húngaro, Nova Iorque/japonês e pediátrico ⁸⁵. No Brasil, o clone epidêmico brasileiro (BEC) de MRSA, que apresenta o *SCCmec* IIIa, foi relatado primeiramente em 1992 ⁹⁵, e é encontrado de Norte a Sul ^{96, 97, 98}. Isolados deste mesmo clone têm sido também detectados em outros países, incluindo Argentina, Uruguai, Paraguai, Chile, Portugal, Itália e República Tcheca ^{99, 100, 101, 102, 103, 12}.

O clone ibérico foi relatado pela primeira vez em 1989 na Espanha e, posteriormente, em Portugal, Reino Unido, Alemanha, Bélgica, Suíça, França, República Tcheca, Polônia e Estados Unidos ¹⁰⁴. O clone pediátrico foi inicialmente relatado em Portugal, em 1992, e, posteriormente, na Polônia ¹⁰⁵, Estados Unidos ¹⁰⁶, Argentina ⁹⁹ e Colômbia ¹⁰⁷ e Brasil ¹⁰⁸. Trindade et al. ¹⁰⁹ demonstraram que 85% das cepas de MRSA isoladas de sangue de pacientes atendidos em um hospital de São Paulo apresentaram o SCC*mec* tipo IIIa, tendo sido também encontrados isolados de SCC*mec* tipo IV.

A correta identificação de cepas MRSA é de extrema importância para o tratamento do paciente, para uma correta vigilância epidemiológica e para o controle das infecções causadas por este patógeno ⁶⁶. As técnicas clássicas para diferenciação de linhagens bacterianas (sorotipagem, biotipagem, antibiograma e fagotipagem) são baseadas na caracterização dos produtos de expressão gênica bacteriana. Tais sistemas são limitados pela capacidade da bactéria alterar a expressão dos produtos em função das condições de crescimento (temperatura, composição do meio de cultura e inóculo), fase de crescimento e mutações espontâneas ⁶⁶. Os testes para detecção do gene *mecA* ou da proteína PBP2a são os métodos mais acurados para determinar resistência à oxacilina ⁸⁵. Desta forma, os isolados não portadores de *mecA* ou que não produzem PBP2a devem ser reportados como sensíveis à oxacilina, se a CIM para oxacilina for igual ou menor que 2 µg/mL (CCLS, 2006).

A detecção fenotípica da resistência de *S. aureus* à meticilina pode apresentar algumas limitações, devido à expressão irregular do gene *mecA*. Um método de escolha para a tipificação dos isolados microbianos, citado por Pfaller et al. ¹¹⁰ é a eletroforese em campo elétrico pulsado (PFGE) por proporcionar boa reprodutibilidade. Porém, a detecção do gene *mecA* pela técnica de PCR é atualmente considerada padrão ouro para linhagens de MRSA ¹¹¹.

A utilização de técnicas moleculares é importante não só para a detecção do gene *mecA*, mas também para a análise epidemiológica de linhagens isoladas ao longo de um período em um determinado local. Análises moleculares de linhagens resistentes à oxacilina de diversas partes do mundo sugerem que houve disseminação destas linhagens a partir de poucos clones iniciais ¹¹².

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Realizar a caracterização fenotípica e genotípica da resistência à metilina de isolados de *S. aureus* e fenotípica da resistência à vancomicina.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar a concentração inibitória mínima das drogas antimicrobianas metilina e vancomicina em isolados de *S. aureus*;
2. Detectar o gene *mecA* e os subtipos do gene *ccrAB1* e *ccrAB3* através da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) em isolados de MRSA.

4 ARTIGO CIENTÍFICO

Full Title: **Partial Characterization of *Ccr* Element in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from Southern Brazil**

Short title: **Characterization of *ccr* in MRSA**

Authors:

Fabiana de Cássia Romanha Sturmer^{1,2}, Stéphanie Wagner Gallo¹, Otávio Nunes Hallal Raro¹, Sílvia Dias de Oliveira¹, Carlos Alexandre Sanchez Ferreira¹

¹Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brazil.

²Universidade de Cruz Alta – UNICRUZ, Cruz Alta, RS, Brazil.

Corresponding author:

Prof. Carlos Alexandre Sanchez Ferreira, PhD

Faculdade de Biociências - PUCRS

Laboratório de Biologia Molecular

90610-000 - Porto Alegre - Brazil

TITLE: Partial Characterization of *ccr* Element in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Southern Brazil

ABSTRACT

Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) are important agents of nosocomial infection, to which considerable difficulty has been faced in order to obtain efficient antimicrobials. Methicillin resistance is codified by the gene *mecA*, which is located in a mobile genetic element named staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*). SCC*mec* also contains the *ccr* gene complex (*ccrA* and *ccrB* or *ccrC*), and the region J, which contains the genes responsible by the resistance against non beta-lactamic drugs. Five types of SCC*mec* have been described, being types I, II, and III the most common in nosocomial infections, while types IV and V are, usually, associated to community-acquired infections. In this sense, this study had the aim to characterize phenotypically and genotypically the methicillin resistance and phenotypically the vancomycin resistance of *S. aureus* isolates, as well as the associated *ccr* subtypes. Forty isolates from the “Serviço de Microbiologia do Laboratório de Análises Clínicas (LABIMED/Hospital de Caridade Astrogildo de Azevedo – Santa Maria/RS)” were evaluated. The minimum inhibitory concentrations to oxacillin and vancomycin were determined by agar dilution method. The detection of *mecA* and the *ccr* alotypes were performed by polymerase chain reaction (PCR). All isolates tested were considered resistant to oxacillin. No isolate were considered resistant to vancomycin, but 25% (10/40) presented intermediary resistance to vancomycin. The gene *mecA* was detected in all isolates. *ccrAB1* was detected in nine isolates (22.5%) and *ccrAB3* in 23 (57.5%). Eight isolates were characterized as non-*ccrAB1* and non-*ccrAB3*. The proportion of *ccrAB3*, which is associated to SCC*mec* type III, suggests that the Brazilian epidemic clone (BEC) may also be present in the hospitals of Rio Grande do Sul State (Brazil). Considering that no *ccr* characterization was reported with in *S. aureus* isolates from this region of Brazil, this study may significantly contribute to the understanding of the MRSA dynamics in South America.

INTRODUCTION

Staphylococcus aureus is an important human pathogen that causes a wide variety of community- and healthcare-associated infections (1). The first report of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) was from the UK in 1961 (2), soon after the introduction of methicillin as a therapeutic agent in medical practice. Methicillin resistance in *S. aureus* is facilitated by the acquisition of the staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*), which integrates site specifically into the staphylococcal genome and carries the *mecA* gene, encoding an altered penicillin-binding protein (PBP2a) that is responsible for this resistance (3,4,5,6). The precise excision and site as well as orientation-specific integration of this element depend on the action of *cassette chromosome recombinase* genes (*ccr*'s) located within the element (5). The *ccr* complex consists of the *ccr* genes, *ccrA* and *ccrB*, in combination (*ccrAB*) in SCC*mec* I–IV, or *ccrC* alone in SCC*mec* V (7,8). Their key roles in resistance and mobility make the *mecA* gene complex and *ccrAB* genes ideal targets for SCC*mec* typing strategies. The *mecA* gene itself is highly conserved among different lineages, even among methicillin-resistant strains of other staphylococcal species (9,10,11). SCC*mec* may be classified into four major types by combining the class of the *mec* gene complex with the *ccrAB* alotype: type I, class B and *ccrAB1*; type II, class A and *ccrAB2*; type III, class A and *ccrAB3*; and type IV, class B and *ccrAB2* (9,12). Some sporadic SCC*mec* types structurally related to type IV are characterized by *ccrAB4* alotype (8, 9,13).

The purpose of the present study was the characterization of MRSA isolates, including the determination of minimum inhibitory concentration for oxacillin and vancomycin, and detection of *mecA* gene and *ccr* alotypes by PCR.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial Strains

The study was carried out using 40 clinical *Staphylococcus aureus* strains isolated in the Service of Microbiology from the Laboratory Hospital Astrogildo de Azevedo – Santa Maria - RS/Brazil over the period August 2005 to August 2006. Antimicrobial resistance was previously determined according to the guidelines of the

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (14) for the disk diffusion technique. *S. aureus* ATCC 29213 and *S. aureus* ATCC 43300 were used as a reference strain for antibiotic disk control. Strains were kept at -20°C in trypticase soy broth (TSB-Oxoid) with 20% glycerol and were re-inoculated in TSB and incubated for 18–24 h at 37°C prior to PCR and MIC test.

Antimicrobial Susceptibility Testing

Minimum inhibitory concentrations (MICs) for oxacillin and vancomycin were determined by the agar dilution method according to Clinical Laboratory and Standards Institute (CLSI) methods (14). Briefly, plates were inoculated with 10⁴ cfu and then incubated at 35 °C for 16 to 20 h. The isolate was considered sensitive to oxacillin with MIC ≤ 2 µg/mL and resistant with MIC ≥ 4 µg/mL. For vancomycin, isolates were considered sensitive with MIC ≤ 2 µg/mL and resistant with MIC ≥ 16 µg/mL (VRSA).

Polymerase Chain Reaction (PCR)

Oligonucleotide Primers

The presence of *mecA* was tested using primers described by Murackami et al (15). The characterization of *ccr* complex was performed with three sets of primers pairs previously described by Ito et al (9). These primers amplify fragments of *ccrAB1* (β2α1) and *ccrAB3* (β2α3) (Table 1).

Table 1
Primers used to amplify *mecA* and *ccr* (*ccrAB1* and *ccrAB3*)

Target genes	Primer sequence (5' → 3')	Amplification product (bp)
<i>mecA</i>	5' AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC 3' 5' AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC 3'	533
<i>ccrAB1</i> β2 α1(α2)	5'ATTGCCTTGATAATAGCCITCT 3' 5' AACCTATATCATCAATCAGTACGT 3'	700
<i>ccrAB3</i> β2 α3(α4)	5'ATTGCCTTGATAATAGCCITCT 3' 5' AGCTCAAAGCAAGCAATAGAAT 3'	1600

DNA Extraction

A 1 mL aliquot of pure cultures grown in TSB was centrifuged at 12000 g for 5 min. Cells were washed twice in 1 mL of 1 M NaCl and pelleted by centrifugation at 12000 g for 3 min. Cells were resuspended in 100 μ L of TE (10 mM Tris HCl pH 8.0, 1 mM EDTA). Total DNA was prepared according to the method of Rademaker and de Bruijn (15). Briefly, bacterial cells were lysed with 500 μ L of 5 M guanidine thiocyanate, 0.03 M N-lauryl sarkosine, 0.1 M EDTA, for 5 min at 4°C. After, 250 μ L cold 7.5 M ammonium acetate were added, tubes were gently shaken and incubated for 5 min at 4°C. An aliquot of 500 μ L of chloroform/isoamyl-alcohol (24:1) was added and the mixture was vortexed vigorously. After centrifugation at 12000 g for 10 min, the DNA-containing pellet was further washed with isopropyl alcohol, homogenized until a white cloud of precipitated DNA became visible and incubated at -20°C overnight. The DNA was centrifuged at 12000 g for 10 min, following which the supernatant was removed and the pellet washed with 150 μ L of ethanol 70%. The DNA pellet was resuspended in 100 μ L the TE and incubated overnight at 4°C. After this period, the samples of DNA were stored - 20°C. The DNA was analyzed in gel of agarose (0.6%) containing 0.5 μ g/mL ethidium bromide and visualized under ultraviolet radiation.

DNA Amplification

PCR reactions used BMB 9393 and US 100 strains as positive controls for *ccrAB3* and *ccrAB1*, respectively. Negative control reactions that contained every component except the target DNA were included in each experimental set. PCR amplifications for detection of *mecA* were performed in a final volume of 25 μ L containing 1 μ L of DNA template, 2.5 mM MgCl₂, 10 mM Tris HCl (pH 8.0), 50 mM KCl, 1 mM of each nucleotide (Amersham), 20 pmol of each primer (Integrated DNA Technologies, Inc.) and 0.2 U of *Taq* DNA polymerase PHT (Photoneutria Biotecnologia e Serviços).

PCR for *mecA* consisted of initial denaturation at 94°C for 5 min, followed by 40 cycles of denaturation at 94°C for 45 s, annealing at 54°C for 45 s and extension at 72°C for 1 min, with a final extension at 72°C for 10 min. For *ccrAB1* and *ccrAB3* were used 35 cycles in the same conditions used to *mecA* except for the 52°C and

49°C annealing temperature, respectively. Amplification products were analyzed by electrophoreses on 0.8% agarose gels containing 5 µg/mL ethidium bromide.

RESULTS

All *S. aureus* strains tested were considered resistant to oxacillin. None of the strains was resistant to vancomycin, however, 25% (10/40) of strains showed intermediate resistance to vancomycin (VISA - MIC = 4 µg/mL) (Table 2).

Table 2
Genotypes and Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of the Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* strains

Strain	MIC		<i>mecA</i>	<i>Ccr</i>	Strain origin
	Oxacillin	Vancomycin			
2	R ¹	S ²	+	<i>ccrAB3</i>	HA-MRSA ³
3	R	S	+	<i>ccrAB3</i>	HA-MRSA
5	R	S	+	<i>ccrAB3</i>	CA-MRSA ⁴
6	R	S	+	non- <i>ccrAB1</i> and non- <i>ccrAB3</i>	CA-MRSA
7	R	S	+	<i>ccrAB1</i>	HA-MRSA
9	R	I ⁵	+	<i>ccrAB3</i>	HA-MRSA
10	R	S	+	<i>ccrAB3</i>	HA-MRSA
12	R	S	+	non- <i>ccrAB1</i> and non- <i>ccrAB3</i>	HA-MRSA
13	R	I	+	<i>ccrAB3</i>	HA-MRSA
14	R	S	+	<i>ccrAB1</i>	HA-MRSA
16	R	S	+	<i>ccrAB3</i>	HA-MRSA
17	R	S	+	<i>ccrAB3</i>	HA-MRSA
21	R	S	+	<i>ccrAB1</i>	HA-MRSA
23	R	I	+	<i>ccrAB3</i>	CA-MRSA
24	R	S	+	<i>ccrAB1</i>	HA-MRSA
25	R	I	+	<i>ccrAB3</i>	HA-MRSA
26	R	S	+	<i>ccrAB3</i>	HA-MRSA
27	R	S	+	<i>ccrAB1</i>	HA-MRSA
30	R	S	+	<i>ccrAB1</i>	CA-MRSA
31	R	I	+	non- <i>ccrAB1</i> and non- <i>ccrAB3</i>	CA-MRSA
33	R	I	+	<i>ccrAB3</i>	HA-MRSA
34	R	S	+	non- <i>ccrAB1</i> and non- <i>ccrAB3</i>	CA-MRSA
34 A	R	S	+	non- <i>ccrAB1</i> and non- <i>ccrAB3</i>	CA-MRSA
35	R	S	+	<i>ccrAB3</i>	HA-MRSA
38	R	S	+	<i>ccrAB3</i>	HA-MRSA
39	R	I	+	non- <i>ccrAB1</i> and non- <i>ccrAB3</i>	HA-MRSA
40	R	S	+	non- <i>ccrAB1</i> and non- <i>ccrAB3</i>	HA-MRSA
42	R	S	+	<i>ccrAB3</i>	HA-MRSA
43	R	S	+	<i>ccrAB3</i>	HA-MRSA
44	R	S	+	non- <i>ccrAB1</i> and non- <i>ccrAB3</i>	CA-MRSA
47	R	S	+	<i>ccrAB1</i>	HA-MRSA
48	R	I	+	<i>ccrAB3</i>	HA-MRSA
49	R	S	+	<i>ccrAB3</i>	HA-MRSA
50	R	I	+	<i>ccrAB1</i>	HA-MRSA
53	R	I	+	<i>ccrAB3</i>	CA-MRSA
54	R	S	+	<i>ccrAB1</i>	CA-MRSA
56	R	S	+	<i>ccrAB3</i>	HA-MRSA
57	R	S	+	<i>ccrAB3</i>	HA-MRSA
58	R	S	+	<i>ccrAB3</i>	HA-MRSA
60	R	S	+	<i>ccrAB3</i>	HA-MRSA

¹R = resistant; ²S = sensitive; ³HA-MRSA = Healthcare-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*; ⁴CA-MRSA = Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*; ⁵I = intermediate.

The *mecA* gene was detected in all strains (Figure 1 and Table 2). The *ccrAB1* was detected in nine isolates (22.5%) and *ccrAB3* in 23 (57.5%). Eight isolates were characterized as non-*ccrAB1* and non-*ccrAB3* (Figure 2 and Table 2).

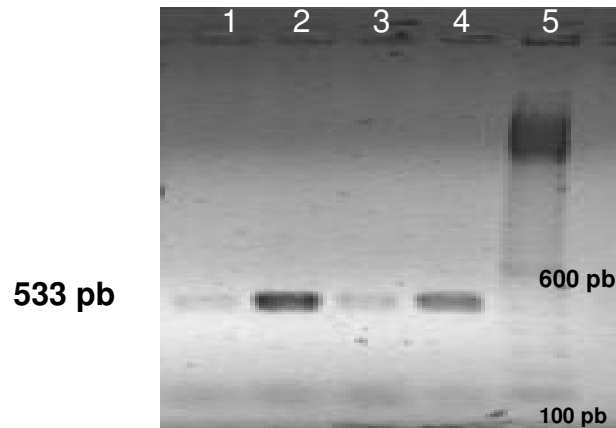


Figure 1: Electrophoresis of amplification products from *mecA* gene on 0.8% agarose gel stained with ethidium bromide (lanes 1 to 4) and 100 bp molecular mass marker (lane 5).

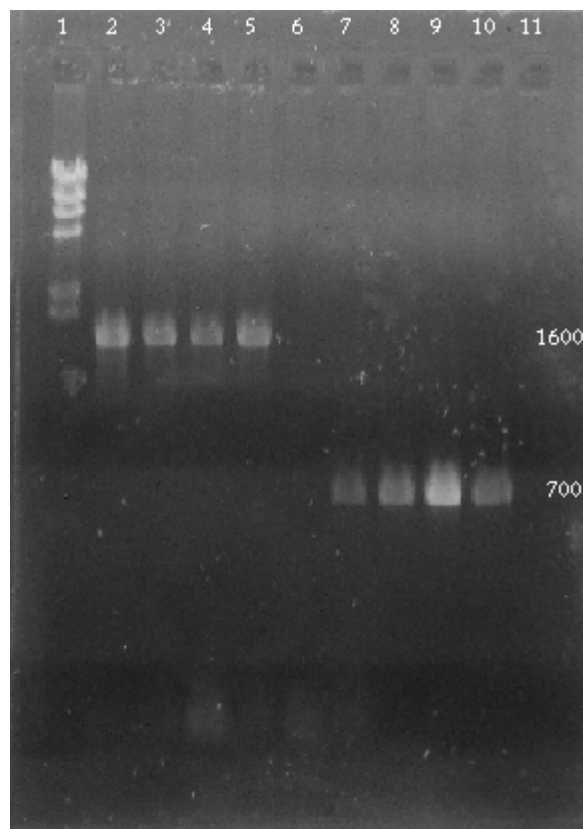


Figure 2: Detection of *ccrAB1* and *ccrAB3*. λ /*Hind*III (lane 1), positive control for *ccrAB3* (lane 2), strains positive for *ccrAB3* (lanes 3 to 5), negative control for *ccrAB3* reaction (lane 6), positive control for *ccrAB1* (lane 7), strains positive for *ccrAB1* (lanes 8 to 10), and negative control for *ccrAB1* reaction (lane 11).

Among the 10 isolates classified phenotypically as VISA, seven showed to be positive for *ccrAB3* and one positive for *ccrAB1*, while the remaining two do not show either *ccr* subtypes (Table 2).

Among the putative CA-MRSA isolates, 50% (5) were genotyped as *ccrAB1* (1) or *ccrAB3* (3), while 20 (67%) of putative HA-MRSA were positive for *ccrAB3* and seven (23%) were positive for *ccrAB1*, the remaining three do not show either *ccr* subtypes (Table 2).

DISCUSSION

The characterization of *S. aureus* isolates concerning the antimicrobial resistance and associated genetic profiles is a fundamental tool in epidemiologic analyses and surveillance, especially in relation to nosocomial infections. In this sense, the present manuscript presents the first analysis of Brazilian isolates from the Central region of Rio Grande do Sul State.

Full characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) requires definition of not only the bacterial genetic background but also the structure of the complex and heterologous *mec* element that these bacteria carry, which is associated with the drug resistance determinant *mecA* (8).

The detection of methicillin resistance within *S. aureus* isolates or strains is normally determined by tests that evaluate the expression of this character. However, phenotypic expression of methicillin resistance is usually heterogeneous, being influenced by culture conditions such as temperature, medium pH, and NaCl content in the medium (17). In this study, the resistance to oxacillin observed phenotypically by the minimum inhibitory concentration test was confirmed by detection of *mecA* gene in all strains analyzed.

The growing number of MRSA strains has left few alternatives for the treatment of infections caused by these pathogens. One of the drugs of choice has been vancomycin. However, cases of reduced susceptibility and resistance to this drug have already been reported (18). The first VISA strain was reported at USA in 1997 (19), and many additional VISA strains has been isolated worldwide ever since. Among the isolates analyzed in this study, 25% showed a VISA phenotype, but none VRSA strain was detected. The importance of vancomycin resistance determination

relies especially in the fact that treatment failure has been described against VISA isolates from hospitalized patients receiving vancomycin (20, 21).

The heterogeneous MRSA profiles found in Brazilian isolates strengthens the dynamic genetic populational structure of this pathogen and the importance of methods of molecular typing in order to uncover the relations between nosocomial and community-related isolates (22).

The presence of *ccrAB3* alotype is indicative of a *SCCmec* type III isolate, as well as *ccrAB1* indicates a *SCCmec* type I (9). So, 57.5% of the isolates analyzed can be associated to *SCCmec* type III (positive for *ccrAB3*), and 22.5% can be associated to *SCCmec* type I (positive for *ccrAB1*). The MRSA Brazilian epidemic clone (BEC) presents *SCCmec* IIIA, and, according to the literature, it is spread from north to southern Brazil, what is corroborated by the results from this analysis, as it also showed the predominance of this type of *SCCmec*, suggesting that BEC may also be highly disseminated in the hospitals of Rio Grande do Sul State (Brazilian southernmost State).

Among the nosocomial isolates, 67% belong to *SCCmec* type III. This predominance was expected, but it is lower than the results described by Vivoni et al. (23), which analyzed HA-MRSA strains isolated from patients at a public University Hospital at Rio de Janeiro, Brazil, and showed that 94% of isolates were *SCCmec* type III. In Germany, a HA-MRSA investigation showed that the prevalence of *SCCmec* type III dropped from 96% within the 1984-1988 intercourse to 8% within 1989-1993. On the other hand, *SCCmec* type I prevalence raised from 4% within 1984-1988 to 97% within 1989-1993, but then diminished to 62% within 1994-1998 (23). The data shown in this study allows, therefore, the speculation that a similar variation in subtype *SCCmec* prevalence may be occurring in the hospital analyzed. An alternative explanation would be that BEC, or at least *SCCmec* type III MRSA, is not as prevalent as in other Brazilian hospitals of different regions, considering that a *ccr* characterization was never performed in hospitals of this region of Brazil (24).

Many articles describe the predominance of *SCCmec* type IV (*ccrAB2* or *ccrAB4*) among the CA-MRSA isolates (25, 26, 27, 28). Conversely, this study showed that 50% of CA-MRSA strains belong to *SCCmec* types I or III, what is in agreement to another Brazilian analysis, which showed that all MRSA isolated from children obtained within the first six hours of entering the hospital, belong to *SCCmec* type III (29).

The characteristics of MRSA from this Brazilian region may represent a new epidemiologic clue to the dynamics of antimicrobial resistance in South America. Further analyses and a wider comparison to MRSA from nearby countries would greatly help in the understanding and surveillance in the *S. aureus* prevalence as a health problem.

REFERENCES

1. Lowy FD. 1998. *Staphylococcus aureus* infections. N Engl J Méd. 339: 520-532.
2. Jevons M. 1961. 'Celbernin'-resistant staphylococci. BMJ. 308–311.
3. Diekema D. J., M. A. Pfaller, J. Turnidge et al. 2000. Genetic relatedness of multidrug-resistant, methicillin (oxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* bloodstream isolates from SENTRY Antimicrobial Resistance Surveillance Centers worldwide, 1998. Microb Drug Resist. 6:213–221.
4. Ito T., Y. Katayama, and K. Hiramatsu. 1999. Cloning and nucleotide sequence determination of the entire *mec* DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. Antimicrob. Agents Chemother. 43:1449–1458.
5. Katayama Y, Ito T, and Hiramatsu K. 2000. A new class of genetic element, *Staphylococcus Cassette Chromosome mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 44:1549–1555.
6. Utsui Y., and T. Yokota . 1985. Role of an altered penicillin-binding protein in methicillin- and cephem-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 28:397–403.
7. Okuma K., k. Iwakawa, J. D. Turnidge et al. 2002. Dissemination of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in the community. J Clin Microbiol. 40:4289–4294.
8. Oliveira D. C., O. H. de Lencastre. 2002. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 46: 2155–2161.
9. Ito T., Y. Katayama, K. Asada, N. Mori, K. Tsutsumimoto, C. Tiensasitorn, and K. Hiramatsu. 2001. Structural comparison of three types of *Staphylococcal Cassette Chromosome mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 45:1323–1336.
10. Ryffel C., W. Tesch, I. Birch-Machin et al. 1990. Sequence comparison of *mecA* genes isolated from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. Gene. 94: 137–8.

11. Ubukata K., R. Nonoguchi, M. D. Song et al. 1990. Homology of *mecA* gene in methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus simulans* to that of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 34:170–2.
12. Ma X. X., T. Ito, C. Tiensasitorn et al. 2002. Novel type of *Staphylococcal Cassette Chromosome mec* identified in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob Agents Chemother.* 46:1147–52.
13. Mongkolrattanothai K, Boyle S, T. V. Murphy et al. 2004. Novel non-*mec* containing *Staphylococcal Chromosomal Cassette* composite island containing *pbp4* and *tagF* genes in a commensal staphylococcal species: a possible reservoir for antibiotic resistance islands in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 48:1823–36.
14. CLSI. 2006. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Sixteenth informational supplement. M100-S16. Wayne, PA: CLSI, 2006.
15. Murakami K., and A. Tomasz. 1989. A involvement of multiple genetic determinants in high-level methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 874-879,
16. Rademaker J. L. W., and F. J. Bruijn. 1997. Characterization and classification of microbes by REP-PCR genomic fingerprinting and computer-assisted pattern analysis. In *DNA markers: protocols, applications, and overviews* ed. Caetano-Anollés, G, Gresshoff, New York: J. 151-171.
17. Hartman B. J, and A. Tomasz. 1986. Expression of methicillin resistance in heterogeneous strains of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 29(1):85–92.
18. Martins A., and M. L. Cunha. 2007. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci: epidemiological and molecular aspects. *Microbiol Immunol.* 51(9):787-95.
19. Chang W. N, C. H. Lu, C. S. Chang, and C. R. Huang. 2003. Community-acquired spontaneous bacterial meningitis in patients with alcoholic liver disease. *J. Formos Med Assoc.* 102(9):653-5.
20. Oliveira D. C., A. Tomasz, and O. H. de Lencastre. 2001. The evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: identification of two ancestral genetic backgrounds and the associated *mec* elements. *Microb Drug Resist.* 7:349–61.
21. Lutz L., A. Machado, N. Kuplich, and A. L. Barth. 2003. Clinical failure of vancomycin treatment of *Staphylococcus aureus* infection in a tertiary care hospital in southern Brazil. *Braz J Infect Dis.* 7(3):224-8.
22. Boyce J. M., 2003. Update on resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Clin Upd Infect Dis.* 6(2):1-4.

23. Vivoni A. M., B. A. Diep, A. C. de Gouveia Magalhães, K. R. Santos, L. W. Rilev, G. F. Sensabaugh, and B. M. Moreira. 2006. Clonal composition of *Staphylococcus aureus* isolates at a Brazilian university hospital: identification of international circulating lineages. *J Clin Microbiol.* 44(5):1686-91.
24. Wisplinghoff H., B. Ewertz, S. Wisplinghoff, D. Stefanik, G. Plum, F. Perdreau-Remington, and H. Seifert. 2005. Molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the metropolitan area of Cologne, Germany, from 1984 to 1998. *J Clin Microbiol.* 43(11):5445-51.
25. Perez L.R.R.; D'Azevedo P.A; 2008. Clonal Types and Antimicrobial Resistance Profiles of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates From Hospitals in South Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* 50(3):135-137.
26. David M. Z., D. Glikman, S. E. Crawford, J. Peng, K. J. King, M. A. Hsostetler, Boyle-Vavra, and R. S. Daum. 2008. What is community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*? *J Infect Dis.* 1;197(9):1235-43.
27. Nimmo G.R., and G. W. Coombs. 2008. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Australia. *Int J Antimicrob Agents.* 31(5):401-10.
28. Otter J.A., and G. L. French. 2008. The emergence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at a London teaching hospital, 2000-2006. *Clin Microbiol Infect.* 14(7):670-6.
29. Cardoso L., M. Castanheira, R. Oliveira, S. Silva, A. Pignatari, R. Mendes, F. Pimenta, and A. Andrade. 2000. Carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children in Brazil. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* 4(57):467 - 470.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Staphylococcus aureus Resistentes à Metilina (MRSA) têm causado infecções hospitalares desde 1961⁶⁰. No Brasil, o *S. aureus* é o microrganismo mais freqüentemente isolado de infecções nosocomiais, e a prevalência do isolamento de MRSA varia de 40 a 80% na maioria dos hospitais brasileiros^{113, 114, 115}. A análise de isolados de MRSA, geralmente, exige não só a caracterização fenotípica, mas também genotípica do cassete *SCCmec*⁸⁵. Dentro do *SCCmec* estão presentes o complexo gênico *mec*, que confere resistência à metilina e o complexo gênico *ccr*, provável responsável pela mobilidade do cassete e para o qual estão descritos seis alótipos⁸⁹. Neste contexto, o presente estudo constitui-se no primeiro envolvendo o complexo gênico *ccr* entre isolados de *S. aureus* na região Central do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil.

Entre os isolados testados, foi observada fenotipicamente a resistência à oxacilina em todas as amostras, sendo esta confirmada genotipicamente pela detecção do gene *mecA*. Por outro lado, nenhuma linhagem VRSA foi detectada, porém 25% dos isolados apresentaram resistência intermediária à vancomicina. O percentual de isolados que apresentaram resistência intermediária à vancomicina é bastante superior ao descrito em outros trabalhos realizados no Brasil. Bernardes et al.¹¹⁶, ao analisarem 104 isolados de estafilococos coagulase-positivos provenientes de três diferentes Hospitais do município de São José dos Campos, encontraram que 63,46% dos isolados foram resistentes à oxacilina, porém todos foram sensíveis à vancomicina. O fenótipo VISA também não foi detectado por Perez & D'Azevedo¹¹⁷ e Spiandorello et al.²⁶ ao analisarem isolados de MRSA provenientes de pacientes internados em três hospitais da cidade de Porto Alegre e em um hospital de Caxias do Sul, respectivamente. A resistência à vancomicina é preocupante, pois é a droga de escolha para o tratamento de infecções causadas por MRSA, sendo que falhas no tratamento devido à resistência a esta droga já têm sido descritas^{88, 118}.

Os subtipos de *SCCmec* e a sua correlação com multiresistência antimicrobiana, além do padrão de distribuição dos isolados como causa potencial de infecção, tornam a sua detecção e diferenciação uma ferramenta de análise epidemiológica importante para MRSA. Portanto, especificamente as variações no complexo gênico *ccr*, que está possivelmente relacionado com a variação genômica

presente entre os subtipos, possam ser funcionalmente determinantes para características específicas encontradas em isolados MRSA.

A presença do alótipo *ccrAB3* em MRSA é indicativo de *SCCmec* tipo III e do *ccrAB1* indica *SCCmec* tipo I ⁴¹, o que sugere que 57,5% dos isolados analisados neste estudo tipados como *ccrAB3* pertencem ao *SCCmec* tipo III, enquanto 22,5% foram associados ao *SCCmec* tipo I (positivo para *ccrAB1*). O clone epidêmico brasileiro (BEC) de MRSA, que apresenta *SCCmec* IIIA, é encontrado de Norte a Sul do Brasil, corroborando os achados deste estudo, onde a maior parte dos genes tipados foram do alótipo do *ccrAB3* ⁸⁵. Os resultados obtidos neste estudo também estão de acordo com aqueles encontrados por Perez & D'Azevedo ¹¹⁷, que tiparam nove isolados de MRSA provenientes de sangue de pacientes internados em três hospitais de Porto Alegre e encontraram oito pertencendo ao *SCCmec* tipo III. A possível presença do BEC descrita nestes trabalhos talvez possa indicar que ele também esteja altamente disseminado nos hospitais do Estado do Rio Grande do Sul. Embora a maioria dos isolados analisados neste estudo pertenceram ao *SCCmec* tipo III, o percentual obtido é bastante inferior quando comparado aos dados descritos para outras regiões do Brasil. Trindade et al. ¹⁰⁹ demonstraram que 85% dos MRSA isolados de sangue de pacientes atendidos em um hospital de São Paulo apresentaram o *SCCmec* tipo IIIa. Resultados semelhantes foram descritos por Vivoni et al. ¹¹⁹, que analisaram MRSA oriundos de ambiente hospitalar (HA-MRSA) isolados de pacientes de um hospital universitário público no Rio de Janeiro, Brasil, revelando que 94% dos isolados foram *SCCmec* tipo III.

Isolados do BEC têm sido também detectados em outros países, incluindo Argentina, Uruguai, Paraguai, Chile, Portugal, Itália e República Tcheca ¹². Chongtrakool et al. ¹²⁰ analisaram 615 isolados de MRSA de 11 países asiáticos e observaram que 370 (60,6%) pertenceram ao tipo *SCCmec* IIIA. No entanto, na Alemanha, um estudo com HA-MRSA revelou que a prevalência do *SCCmec* tipo III caiu de 96% dentro do período de 1984-1988 para 8% dentro de 1989-1993. Por outro lado, *SCCmec* tipo I teve prevalência aumentada de 4% no referido de 1984-1988 para 97% de 1989-1993, tendo em seguida diminuído para 62% de 1994-1998 ¹²¹. Os dados apresentados neste estudo permitem, por conseguinte, as especulações de que uma variação semelhante na prevalência do subtipo *SCCmec* possa estar ocorrendo no hospital analisado. Uma explicação alternativa seria que o BEC, ou pelo menos MRSA *SCCmec* tipo III, não é tão prevalente como em outros

hospitais brasileiros de diferentes regiões, considerando que a caracterização do alótipo *ccr* nunca foi realizado em hospitais da região do Brasil analisada neste estudo.

As infecções causadas por MRSA eram única e exclusivamente documentadas em hospitais. Entretanto, infecções causadas por MRSA adquiridos na comunidade (CA-MRSA) têm sido documentadas de modo crescente em indivíduos saudáveis^{90, 91}. No Uruguai, por exemplo, os primeiros casos foram identificados em 2002 e o Ministério de Saúde Pública reportou, entre janeiro e outubro de 2004, 3.836 novos casos de infecções por CA-MRSA⁹². A predominância dos tipos de *SCCmec* encontrados em isolados de HA-MRSA e CA-MRSA são diferentes, sendo os *SCCmec* tipos I, II e III predominantes em HA-MRSA e os tipos IV e V identificados em linhagens que aparentemente não têm origem nosocomial, sendo provavelmente adquiridos na comunidade^{29, 76}. No entanto, 50% dos isolados de provável origem comunitária analisados neste estudo pertenceram aos *SCCmec* tipos I e III, diferindo do que é relatado pela literatura.

O perfil de sensibilidade de amostras clínicas a antimicrobianos sofre influência importante na maneira como os antimicrobianos são utilizados em um determinado hospital ou região geográfica. Dessa maneira, é importante que diferentes países, diferentes regiões de um país e mesmo diferentes hospitais de uma região façam avaliações regulares do perfil de sensibilidade de amostras clínicas, pois esses dados podem ser muito úteis na orientação da terapêutica empírica e na avaliação de novos antimicrobianos a serem introduzidos no mercado¹²². Especificamente no caso de *S. aureus*, cuja seleção e dispersão de linhagens resistentes a grande parte dos antimicrobianos comumente utilizados se mostra rápida em termos mundiais, a caracterização molecular configura-se em ferramenta imprescindível para uma análise epidemiológica eficiente da evolução e prognóstico das estratégias de controle a serem adotadas.

Dentro deste contexto e tendo em vista a dificuldade de determinar a tipagem de todos os alótipos *ccr*, é de fundamental importância a investigação mais aprofundada, de modo a tornar conhecida a realidade de diferentes regiões do Brasil, mais especificamente na região Sul. As variações genômica e fenotípica, claramente evidenciadas e parcialmente decorrentes da alta diversidade dos elementos *SCCmec*, uma vez caracterizadas podem representar um elo importante na escolha de uma terapêutica adequada.

6 CONCLUSÕES

1. MRSA de origem nosocomial e comunitária estão presentes na região central do Rio Grande do Sul;
2. O fenótipo MRSA-VISA foi detectado em proporção maior do que a relatada na bibliografia em diferentes regiões do Brasil;
3. A predominância em menor grau de *ccrAB3* do que o relatado em outras regiões do País indica que o BEC, se presente nesta região, encontra-se em proporção menor;
4. Infecções por MRSA de origem comunitária não estão restritas a SCC*mec* tipos IV e V na região central do Rio Grande do Sul.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

-
- 1 Lowry FD. *Staphylococcus aureus* infections. N. Engl. J. Med. 1998;339:520-532.
 - 2 Kuehnert MJ, Kruszon-Moran D, Hill HA, McQuillan G, McAllister SK, Fosheim G, McDougal LK, Chaitram J, Jensen B, Fridkin SK, Killgore G, Tenover FC. Prevalence of *Staphylococcus aureus* nasal colonization in the United States, 2001-2002. J Infect Dis. 2006;(15)193(2):172-9.
 - 3 Norrby SR, Nord CE, Finch R. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Lack of development of new antimicrobial drugs: a potential serious threat to public health. Lancet Infect Dis. 2005;(5):115-119.
 - 4 Kluytmans-VandenBergh MFQ, Kluytmans JAJW. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: current perspectives. Clin Microbiol Infect 2006;(12):9-15.
 - 5 Katz DE, Martone WJ. Community-Phenotype-Methicillin-Resistance *Staphylococcus aureus* infection: a retrospective chart review of outcomes after treatment with daptomycin. Clin Therap. 2007;(29)11:2440-2447.
 - 6 Wey SB, Cardoso DM, Halker E. Distribution and analysis of 8.268 nosocomial infection at the Hospital São Paulo: 1985 to 1989. Revista do Hospital de São Paulo. 1990;(1):169-174.
 - 7 Oliveira DI, Santos-Sanches R, Mato M, Tamayo G, Ribeiro D, Costa, Oliveira L. Virtually all methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections in the largest teaching Portuguese hospital are caused by two internationally spread multiresistant strains: the "Iberian" and the "Brazilian" clones of MRSA. Clin. Microbiol. Infect. 1998;(4):373-384.
 - 8 Cunha MLRS, Lopes CAM. Estudo da produção de β -lactamases e sensibilidade às drogas em linhagens de estafilococos coagulase negativos isolados de recém-nascidos. J Bras Med Lab. 2002;38(4):281-290.
 - 9 Brooks GF, Butel JS, Morse SA. Microbiologia Médica. 21. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2000;(21):158.
 - 10 Kloss W. Taxonomy and systematics of staphylococci indigenous to humans. In: Crossley KB, Archer GL, eds. The Staphylococci in human disease. Nueva York: Churchill Livingstone. 1997;113-215.
 - 11 Bannerman TL, Murray BE, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC. *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and other catalase positive cocci that grow aerobically. In: Man of Clin Microbiol. 2003;384-403.
 - 12 Silva MVC, Silva MC, Wisplinghoff H. Clonal spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a large geographic area of the United States. J Hosp Infect. 2003;(10):53:103.

-
- 13 Koneman, EW. Diagnóstico microbiológico. Rio de Janeiro. Medsi. 2001;(5):919-920.
- 14 May. ER, Keith A, Hnilica LA, Frank RD, Jones D, Bemis A. Isolation of *Staphylococcus schleiferi* from healthy dogs and dogs with otitis, pyoderma, or both. J of the American Veterinary Med Associat. 2005;5(227):928-931.
- 15 Wegener HC, Watts S, Salmon A, Yancey Jr. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus hyicus* isolated from exudative epidermyitis in pigs. J Clin Microbiol.1994;3(32):793-795.
- 16 Petersen AD, Walker RD, Bownan MM, Schott HC, Rosser EJUJr. Frequence of isolation and antimicrobial susceptibilty patterns of *Staphylococcus intermedius* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates from canine skin and ear samples over a 6-year period (1992-1997). Am Anim Hosp Assoc. 2002;5(38):407-413.
- 17 Capurro AC, Nilsson L, Ostensson K. Identification of coagulase-positive staphylococci isolated from bovine milk. Acta Vet Scand. 1999;4(40):315-321.
- 18 Fueyo JM, Mendonza MC, Rodicio MR, Muñoz J, Alvarez MA, Martin MC. Cytotoxin and Pyrogenic Toxin Superantigen Gene Profiles of *Staphylococcus aureus* Associated with Subclinical Mastitis in Dairy Cows and Relationships with Macrorestriction Genomic Profiles. J of Clin Microbiol. 2005;3(43):1278-1284.
- 19 Archer Gl. *Staphylococcus aureus*: a well-armed pathogen.Clin Infect Dis. 1998;6(5):1179-81.
- 20 Paul-Satyaseela M, Van Belkum A, Shivannavar CT, Gaddad SM. Carriage of capsulated strains of *Staphylococcus aureus*: a population-based study performed in Gulbarga, South India. Epidemiol Infect. 2004;132(5):831-838.
- 21 Efuntoye MO, Adetosoye AL. Enterotoxigenicity and drug sensitivity of *Staphylococci* from children aged five years and below with sporadic diarrhoea. East Afr Med J. 2003;80(12):656-659.
- 22 Trabulsi LR. Altherthum F. Microbiologia. *Staphylococcus aureus*. São Paulo: Atheneu. 2005;(20):175-82.
- 23 Le Loir Y, Baron F, Gautier M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. Genet Mol Res. 2003;31(1):63-76.
- 24 Moreillon P, Entenza JM, Francioli P, McDevitt D, Foster TJ, François P, Vaudaux P. Role of *Staphylococcus aureus* coagulase and clumping factor in pathogenesis of experimental endocarditis. Infect Immun. 1995;63(12):4738-43.
- 25 Skinner D, Keefer CS. Significance of bacteremia caused by *Staphylococcus aureus*; study of 122 cases and review of literature concerned with experimental infection in animals. Arch Intern Méd. 1941;(68):851-75.

-
- 26 Spiandorello W P, Morsh F, Sebben S, Spiandorello FSA. A resistência do *Staphylococcus aureus* à oxacilina em hospital de Caxias do Sul. Revista AMRIGS, Porto Alegre. 2000;(44):120-125.
- 27 Tavares W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do *Staphylococcus*, do *Enterococcus* e do *Pneumococcus* aos antimicrobianos. Soc Bras Med Trop. 2000;(33)-281-301.
- 28 Sefton AM. Mechanisms of antimicrobial resistance: their clinical relevance in the new millennium. Drugs. 2002;62(4):557-66.
- 29 Ito T, Okuma K, Ma XX, Yuzawa H, Hiramatsu K. Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. Drug Resist. 2003;(6):41–52.
- 30 Mayhall CG. Prevention and control of vancomycin resistance in gram-positive coccal microorganisms: fire prevention and fire fighting. Infect Control Hosp Epidemiol. 1996;17(6):353-5.
- 31 Lowy Franklin D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Inves. 2003;(111):1265-1273.
- 32 Petri Jr WA, Mandell GL, Goodman & Gilman's. The Pharmacological Basis of Therapeutics. Limbird (eds). 1996;(9):1155-1174.
- 33 Black JG. Microbiologia: fundamentos e perspectivas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002;(4):370-419.
- 34 Stefani S, Varaldo PE. Epidemiology of methicillin-resistant staphylococci in Europe. Clin Microbiol Infect. 2003;(9):1179-1186.
- 35 Jevons MP. "Celbenin"-resistant staphylococci. Br Méd J. 1961;(1):124-125.
- 36 Eguia JM, Chambers HF. *Methicillin-resistant staphylococci* and their treatment in the intensive care unit. Semin Respir Crit Care Med. 2003;24(1):37-48.
- 37 Livermore DM. Antibiotic resistance in staphylococci. Int J Antimicrob Agents. 2000;16(1):3-10.
- 38 Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H, Spratt BG. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;28;99(11):7687-7692.
- 39 Amato Neto V, Levi GC, Lopes HV, Mendonça JS, Baldy JLS. Antibióticos na prática média. São Paulo. Roca. 2000; (5).
- 40 Jensen AG, Espersen F, Skinhoj P, Niels FM. Bacteremic *Staphylococcus aureus* spondylitis. Arch Intern Med. 1998;(158):509-517.

-
- 41 Ito T, Katayama Y, Asada K, Mori N, Tsutsumimoto K, Tiensasitorn C, Hiramatsu K. Structural comparison of three types of *Staphylococcal Cassette Chromosome mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother*, 2001;(45):1323–1336.
- 42 Hiramatsu K, Katayama Y, Yuzawa H, Ito T. Molecular genetics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol*, 2002;292(2):67-74.
- 43 NNISS - Sistema Nacional de Vigilância de Infecções Hospitalares, 1999.
- 44 Wannet WJ, Spalburg E, Heck ME, Pluister GN, Tiemersma E, Willems RJ, Huijsdens XW, Neeling AJ, Etienne J. Emergence of virulent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains carrying Panton-Valentine leucocidin genes in The Netherlands. *J. Clin Microbiol*, 2005;43(7):3341-5.
- 45 Nicola F, Bantar C, Canigia L.F, Relloso S, Bainchini H, Smayevsky J. Comparison of several methods to determine methicillin-resistance in *Staphylococcus aureus* with focus on borderline strains. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2000;36(2):91-3.
- 46 McDougal LK, Thornsberry C. The role of beta-lactamase in staphylococcal resistance to penicillinase-resistant penicillins and cephalosporins. *J. Clin. Microbiol*, 1986;(23):832-839.
- 47 Massidda O., Montanari MP, Varaldo PE. Evidence for a methicillin-hydrolysing beta-lactamase in *Staphylococcus aureus* strains with borderline susceptibility to this drug. *FEMS Microbiol Lett*, 1992;1;71(3):223-227.
- 48 Varaldo PE, Montanari MP, Biavasco F, Manso E, Ripa S, Santacroce F. Survey of clinical isolates of *Staphylococcus aureus* for borderline susceptibility to antistaphylococcal penicillins. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 1993;12(9):677-82.
- 49 Massidda O, Montanari MP, Mingoia M, Varaldo PE. Cloning and expression of the penicillinase from a borderline methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strain in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett*. 1994;15;119(3):263-9. Erratum in: *FEMS Microbiol Lett*, 1994;1;121(1):131.
- 50 Massidda O, Montanari MP, Mingoia M, Varaldo PE. Borderline methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains have more in common than reduced susceptibility to penicillinase-resistant penicillins. *Antimicrob Agents Chemother*, 1996;40(12):2769-74.
- 51 Gal Z, Kovacs P, Hernadi F, Barabas G, Kiss L, Igloi A, Szabo I. Investigation of oxacillin-hydrolyzing beta-lactamase in borderline methicillin-resistant clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Chemotherapy*, 2001;47(4):233-8.
- 52 Keserü JS, Gal Z, Barabas G, Benko I, Szabo I. Investigation of beta-Lactamases in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* for further explanation of borderline methicillin resistance. *Chemotherapy*, 2005;51(6):300-304.

-
- 53 Chambers HF. Methicillin-resistant staphylococci. *Clin. Microbiol*, 1988;(1):173-186.
- 54 Philips G, Golledge CL. Vancomycin and Teicoplanin something old, something new. *Med. J. Aus*, 1992;1(156):53-57.
- 55 Noskin GA, Siddiqui F, Stosor V, Hacek D, Peterson LR. In Vitro Activities of Linezolid against Important Gram-Positive Bacterial Pathogens Including Vancomycin-Resistant *Enterococci*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1999;8(43):2059-2062.
- 56 Von Eiff C, Proctor RA, Peters G. Small colony variants of *Staphylococci*: a link to persistent infections. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 2000;113(9):321-5, Review.
- 57 Lucet JC, Herrmann M, Rohner P, Auckenthaler R, Waldvogel FA, Lew DP. Treatment of experimental foreign body infection caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1990;34(12):2312-7.
- 58 CLSI/Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Sixteenth informational supplement. M100-S16. Wayne, PA: CLSI, 2006.
- 59 Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H, Kawasadi S, Hosoda Y, Hori S, Fukuchi Y, Kobayashi I. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *The Lancet*, 1997;6;350(9092):1670-1673.
- 60 CDC - Mangram AJ, Horan TC, Pearson ML, Silver LC, Jarvis WR. Guideline for Prevention of Surgical Site Infection, 1999. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) Hospital Infection Control Practices Advisory Committee. *Am J Infect Control*, 1999;27(2):97-132.
- 61 Smith TL, Pearson ML, Wilcox KR. Glycopeptide-Intermediate *Staphylococcus aureus* Working Group. Emergence of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *N Engl J Med*, 1999;(340):493-501.
- 62 Sieradzki K, Pinho MG, Tomasz S. A. Inactivated pbp4 in highly glycopeptide-resistant laboratory mutants of *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem*, 1999;(274):18942-18946.
- 63 Cui L, Ma XX, Stao K, Okuma K, Tenover FC, Mamizuka EM et al. Cell Wall Thickening Is a Common Feature of Vancomycin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *J of Clin Microbiol*, 2003;5-14.
- 64 Chang WN, Lu CH, Chang CS, Huang CR. Community-acquired spontaneous bacterial meningitis in patients with alcoholic liver disease. *J. Formos Med Assoc*, 2003;102(9): 653-655.
- 65 CDC – Centers for Disease Control and Prevention. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* - New York, *Morb Mortal Wkly*, 2004;(53):322.

-
- 66 Tenover FC, Weigel LM, Appelbaum PC. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate from a patient in Pennsylvania. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004;(48):275-280.
- 67 Rice BL, Ohio C. Antimicrobial resistance gram-positive bacteria. *Am J Infect Control*, 2006;(34):11-9.
- 68 Walsh CT, Etkorn Z, Chang Y, Stolz LA. Vancomycin Resistance: Decoding the Molecular Logic Science, 2003;261(339):308-309.
- 69 Utsui Y, Yakota T. Role of an altered penicillin-binding protein in methicillin and cephen-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother*, 1985;(28):397-403.
- 70 Ito T, Ktayama Y, Hiramatsu K. Cloning and nucleotide sequence determination of the entire *mec* DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. *Antimicrob Agent Chemother*, 1999;(43):1449-1458.
- 71 Kuroda M, Ohta T, Uchiyama I, Baba T, Yuzawa H, Kobayashi I, et al. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*, 2001;21;357(9264):1225-1240.
- 72 Okuma K, Iwakawa K, Turnidge JD, Grubb WB, Bell JM, O'brien FG, et al. Dissemination of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in the community. *J Clin Microbiol*, 2002;40(11):4289-4294.
- 73 Hanssen A, Sollid JUE. *SCCmec* in staphylococci: genes on the move. *FESS Immunol Med Microbiol*, 2005;46(2006) 8-20.
- 74 Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. Genetic organization of the chromosome region surrounding *mecA* in clinical staphylococcal strains: role of IS431-mediated *mecl* deletion in expression of resistance in *mecA*-carrying, low-level methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001;45(7):1955-1963.
- 75 Zhang HZ, Hackbarth CJ, Chansky KM, Chambers HF. A proteolytic transmembrane signaling pathway and resistance to beta lactams in staphylococci. *Science*, 2001;(65):1962.
- 76 Ito T, Ma XX, Takeuchi F, Okuma K, Yuzawa H, Hiramatsu K. Novel type V *Staphylococcal Cassette Chromosome mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccrC*. *Antimicrob. Agents Chemother*, 2004;(48):2637-2651.
- 77 Sharma VK, Hackbarth CJ, Dickinson TM, Archer GL. Interaction of Native and Mutant *Mecl* Repressors with Sequences That Regulate *mecA*, the Gene Encoding Penicillin Binding Protein 2a in Methicillin-Resistant Staphylococci. *J of Bacteriology*, 1998;(180):2160-2166.
- 78 Hackbarth CJ, Chambers HF. *blaI* and *blaR1* regulate beta-lactamase and PBP 2a production in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1993;37(5):1144-1149.

79 Golemi-Kotra D, Cha J Y, Meroueh SO, Vakulenko SB, Mobashery S. Resistance to β -Lactam Antibiotics and Its Mediation by the Sensor Domain of the transmembrane BlaR Signaling Pathway in *Staphylococcus aureus*. J Biol Chem, 2003;20;16(278):18419-18425.

80 Thumanu K, Cha I, Fisher JF, Perrins R, Mobashery S, Wharton C. Discrete steps in sensing of β -lactam antibiotics by the BlaR1 protein of the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacterium. Proc Natl Acad Sci USA, 2006;11;103(28):10630-10635.

81 Lewis MT, Yamaguchi K, Biedenbach DJ, Jones RN. In vitro evaluation of cefepime and other broad-spectrum beta-lactams in 22 medical centers in Japan: a phase II trial comparing two annual organism samples. Diagn Microbiol Infect Dis, 1999;35(4):307-315.

82 McKinney TK, Sharma VK, Craig WA, Archer G. LTranscription of the Gene Mediating Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus* (*mecA*) Is Corepressed but Not Coinduced by Cognate *mecA* and beta-Lactamase Regulators. J. Bacteriol, 2001;(183):6862-6868.

83 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, 2000;44:1549-1555.

84 Katayama Y, Takeuchi F, Ito T, Ma XX, Ui-Mizutani Y, Kobayashi I, Hiramatsu K. Identification in methicillin-susceptible *Staphylococcus hominis* of an active primordial mobile genetic element for the staphylococcal cassette chromosome *mec* of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol, 2003 May;185(9):2711-2722.

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

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

87 Boyle-Vavra S, Daum RS. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the role of Pantone-Valentine leukocidin. Lab Invest, 2007;87(1):3-9.

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

89 Boyle-Vavra S, Ereshefsky B, Wang, Robert C, Daum S. Successful Multiresistant Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Lineage from Taipei, Taiwan, That Carries Either the Novel Staphylococcal Chromosome Cassette *mec* (SCC*mec*) Type VT or SCC*mec* Type IV. Clin Microbiol, 2005 ;43(9):4719-4730.

-
- 90 Rybak MJ, LaPlante KL. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: A Review. *Pharmacotherapy*, 2005;25(1):74-85.
- 91 Gemmell CG, Edwards DI, Fraise AP, Gould FK, Ridgway GL, Warren RE. On behalf of the Joint Working Party of the British, Guidelines for the prophylaxis and treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections in the UK. *J Antimicrob Chemother*, 2006;(57):589-608.
- 92 Ma XX, Galiana A, Pedreira W, Mowszowicz M, Christophersen I, Machiavello S, et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Uruguay. *Emerg Infect Dis*, 2005;11(6):973-976.
- 93 Baba TF, Takauchi M, Kuroda H, Yuzawa K, Aoki A, Oguchi Y, Nagai N, et al. Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. *Lancet*, 2002;(359):1819-1827.
- 94 Salgado CD, Farr BM, Calfee DP. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a meta-analysis of prevalence and risk factors. *Clin. Infect. Dis*, 2003;9(36):131.
- 95 Teixeira LA, Lourenço MC, Figueiredo AM. Emergence of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone related to the Brazilian epidemic clone III::B:A causing invasive disease among AIDS patients in a Brazilian hospital. *Microb. Drug Resist*, 1996;(2):393-399.
- 96 Aires SM, Miragaia M, Santos SI. Three-year assessment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America from 1996 to 1998. *J Clin Microbiol*, 2001;205(39):2197.
- 97 Soares MJS, Teixeira LA, Nunes MRCM, Silva MCC, Ferreira-Carvalho BT, Figueiredo AMS. Analyses of different molecular methods for typing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates belonging to the Brazilian epidemic clone. *J Med Microbiol*, 2001;(50):7,32-42.
- 98 Rozenbaum R, Silva-Carvalho MC, Souza PR, Melo MC, Gobbi CN, Coelho LR, et al. Molecular Characterization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Disseminated in a Home Care System. *Infect Control Hosp Epidemiol. Infect Control Hosp Epidemiol*, 2006;(27):1041-1050.
- 99 Corso A, Sanches SI, Sousa AM, Rossi A, Lencastre OH. Spread of a methicillin-resistant and multiresistant epidemic clone of *Staphylococcus aureus* in Argentina. *Microb Drug Resist*, 1998;4(4):277-288.
- 100 Sa-Leao R, Sanches I, Dias D. Detection of an archaic clone of *Staphylococcus aureus* with low-level resistance to methicillin in a pediatric hospital in Portugal and in international samples: relics of a formerly widely disseminated strain. *J Clin Microbiol*, 1999;(37):1913-1920.
- 101 Sanches IS, Saraiva ZC, Tendeiro TC, Serra JM, Dias DC, de Lencastre H. Extensive intra-hospital spread of a methicillin-resistant staphylococcal clone. *Int J Infect Dis*, 1998;3(1):26-31.

102 Mato R, Santos I, Sanches M, Venditti D, Platt A. Brown, and H. de Lencastre. Spread of the multiresistant Iberian clone of methicillin resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) to Italy and Scotland. *Microb. Drug Resist*, 1998;(4):107-112.

103 Melter O, Sousa MA, Urbášková P, Jakubu V, Žemličková V, Lencastre O. Update on the Major Clonal Types of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in the Czech Republic. *J Clin Microbiol*, 2003;41(11): 4998-5005.

104 Dominguez MA, de Lencastre OH, Linares J, Tomasz A. Spread and maintenance of a dominant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clone during an outbreak of MRSA disease in a Spanish hospital. *J Clin Microbiol*, 1994;32(9):2081-2087.

105 Leski T, Oliveira D, Trzcinski K, Sanches IS, Aires de Souza M, Hryniewicz W, et al. Clonal distribution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Poland. *J Clin Microbiol*, 1998;36(12):3532-3539.

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

107 Gomes AR, Sanches IS, Souza AM, Castañeda E, de Lencastre H. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Colombian hospitals: dominance of a single unique multidrug-resistant clone. *Microb Drug Resist*, 2001;7(1):23-32.

108 Nunes de Melo MC, Silva-Carvalho MC, Ferreira RL, Rocchetto LC, Souza RR, Sobbi CN, et al. Detection and molecular characterization of gentamicin-susceptible, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clone in Rio de Janeiro that resembles the New York-Japanese clone. *J Hosp Infec*, 2004;(58):276-285.

109 Trindade PDA, Pacheco RL, Costa SF, Rossi F, Barone AA, Mamizuka EM, Levin A.S.; Prevalence of SCCmec Type IV in Nosocomial Bloodstream Isolates of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol*, 2005;(43):3435-3437.

110 Pfaller MA, Acar J, Jones RN, Verhoef J, Turnidge J, Sader HS. Integration of molecular characterization of microorganisms in a global antimicrobial resistance surveillance program. *Clin Infect Dis*, 2001;15(32):156.

111 Stratidis F, Bia S, Edberg. Use of real-time polymerase chain reaction for identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from positive blood culture bottles. *Diag Microbiol and Infect Dis*, 2007;2(58):199-202.

112 Robinson DA, Enright MC. Evolution of *Staphylococcus aureus* by large chromosomal replacements. *J. Bact*, 2004;(186);4:1060-1064.

113 Pannuti CS, Grinbaum RS. An overview of nosocomial infection control in Brazil. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 1995;16(3):170.

-
- 114 Wey SB. Infection control in a country with annual inflation of 3,600%. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 1995;16(3):175-178.
- 115 Rezende NA, Amaral CF, Freire Maia L. Immunotherapy for scorpion envenoming in Brazil. *Toxicon*, 1998;36(11):1507-1513.
- 116 Bernardes RC, Jorge AOC, Leão MVP. Sensibilidade à oxacilina, vancomicina e teicoplanina de *Staphylococcus coagulase* - positivos isolados de pacientes hospitalizados em São José dos Campos. *Revista de Biociências*, 2004;10(1/2):73-78.
- 117 Perez LRR, D'Azevedo, PA. Clonal types and antimicrobial resistance profiles of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from hospitals in south Brazil. *Rev Inst Med Trop S. Paulo*, 2008;3(50):135-137.
- 118 Lutz L, Machado A, Kuplich N, Barth AL. Clinical failure of vancomycin treatment of *Staphylococcus aureus* infection in a tertiary care hospital in southern Brazil. *Braz J Infect Dis*, 2003;7(3):224-228.
- 119 Vivoni AM, Diep BA, de Gouveia Magalhães AC, Santos KR, Rilev LW, Sensabaugh GF, Moreira BM. Clonal composition of *Staphylococcus aureus* isolates at a Brazilian university hospital: identification of international circulating lineages. *J Clin Microbiol*, 2006;44(5):1686-1691.
- 120 Chongtrakool P, Ito T, Ma XX, Kondo Y, Trakulsomboon S, Tiensasitorn C, et al. *Staphylococcal cassette chromosome mec* (SCC*mec*) typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated in 11 Asian countries: a proposal for a new nomenclature for SCC*mec* elements. *Antimicrob. Agents Chemother*, 2006;(50):1001-1012.
- 121 Wisplinghoff H, Ewertz B, Wisplinghoff S, Stefanik D, Plum G, Perdreau-Remington F, Seifert H. Molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the metropolitan area of Cologne, Germany, from 1984 to 1998. *J Clin Microbiol*, 2005;43(11):5445-5451.
- 122 Sader HS, Pignatari AC, Hollis RJ, Leme I, Jones RN. Oxacillin and quinolone resistant *Staphylococcus aureus* in São Paulo, Brazil: a multicenter molecular epidemiology study. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 1993;(14):260-264.