

Francisco Caninde de Sousa Júnior

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE *Staphylococcus aureus*
RESISTENTES À METICILINA ISOLADOS NA CIDADE DO NATAL/RN.**

Natal
2009

Francisco Caninde de Sousa Júnior

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE *Staphylococcus aureus*
RESISTENTES À METICILINA ISOLADOS NA CIDADE DO NATAL/RN.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Eveline Pipolo Milan

Natal

2009

Catálogo na fonte

S725c

Sousa Junior, Francisco Canindé de.

Caracterização fenotípica e genotípica de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilicina isolados na cidade do Natal-RN / Francisco Canindé de Sousa Júnior __ Natal - RN, 2009.

55f.: il.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eveline Pipolo Millan.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

1. *Staphylococcus aureus* - dissertação. 2. MRSA - dissertação. 3. Clone epidêmico brasileiro- dissertação. 4. Clone pediátrico – dissertação. 5. Métodos fenotípicos – dissertação. I. Millan, Eveline Pipolo. II. Título

RN-UF/BS-CCS

CDU: 579.852(813.3)(043.2)

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Coordenadora do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde:

Profa. Dra. Técia Maria de Oliveira Maranhão

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTES À METICILINA ISOLADOS NA CIDADE DO NATAL/RN.

BANCA EXAMINADORA

Presidente da banca:

Profa. Dra. Eveline Pipolo Milan

Membros titulares:

Profa. Dra. Eveline Pipolo Milan - UFRN

Profa. Dra. Lenise Arneiro Teixeira - UFF

Profa. Dra. Marise Reis de Freitas - UFRN

Dedicatória

“De tudo ficaram três coisas: a certeza de que estamos sempre começando, a certeza de que é preciso continuar e a certeza de que podemos ser interrompidos antes de terminar. Fazer da interrupção um novo caminho; da queda, um passo de dança; do medo, uma escada; do sonho, uma ponte; e da procura, um encontro.”

Fernando Sabino

Dedico esta dissertação aos meus pais, Francisco Canindé e Marilda (*In memoriam*).

Agradecimentos

Aos meus pais, que sempre me apoiaram em todas as etapas da minha vida, por tantas vezes abdicando dos seus sonhos para realizar os meus. Em especial a minha mãe, que não se encontra mais fisicamente entre nós, mas deixou plantado o seu exemplo de força, coragem e determinação. Obrigado por tudo!

À Profa. Eveline Pípulo Milan, pela confiança depositada, apoio e carinho com que me auxiliou na construção dessa importante etapa, minha admiração pelo exemplo de profissionalismo.

À Profa. Maria Celeste Nunes de Melo, pelos ensinamentos, conselhos, amizade e participação efetiva no desenvolvimento deste trabalho, minha sincera gratidão.

À Profa. Agnes Marie Sá Figueiredo, por abrir as portas do seu laboratório para realização da caracterização molecular das amostras, etapa fundamental à conclusão do projeto, meus sinceros agradecimentos.

À Maria Cícera da Silva Carvalho pelo valioso apoio e contribuição na execução da caracterização molecular das cepas.

Aos Microbiologistas do Hospital Universitário Onofre Lopes, Hemolab e Maternidade Escola Januário Cicco pelos isolados bacterianos que foram utilizados neste estudo.

À Flávia Lucia Piffano Costa Pellegrino pela confecção do dendrograma.

Aos amigos do Laboratório de Bacteriologia Médica (UFRN): Gildelane, Tenille, Juliana, Ermeton, Myrian, Bibiana, Eutália, Janice, Cláudio, Cecília, Luanda e Lorena pelos momentos de companheirismo, colaboração e amizade.

Aos amigos que fiz no Laboratório de Biologia Molecular de Bactérias (UFRJ): Amada, Fabiene, Leonardo, Otávio, Flávia, Raquel “Rosinha”, Raquel Neves, Márcia e Solange, pela descontração e incentivo.

À Saulo Roni Moraes por ter me acolhido em sua casa durante minha estada no Rio de Janeiro para realização de parte do projeto.

Aos funcionários da Pós-graduação pela cordialidade e pelas informações prestadas.

À Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PPgCSA/UFRN), pela oportunidade desta realização profissional.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), e à Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Norte (FAPERN), pelos recursos financeiros utilizados neste estudo.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para essa conquista.

Sumário

Dedicatória.....	v
Agradecimentos.....	vi
Lista de figuras.....	x
Lista de abreviaturas.....	xi
Resumo.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2. 1 <i>Staphylococcus aureus</i>	3
2. 2 <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à meticilina (MRSA).....	4
2. 3 Epidemiologia do MRSA.....	5
2.4 Métodos para detecção de resistência à meticilina em <i>S. aureus</i>	7
2.5 Clones pandêmicos de MRSA.....	8
3. ANEXAÇÃO DE ARTIGOS PUBLICADOS.....	12
3.1 Artigo 1.....	13
3.2 Artigo 2.....	18
4. COMENTÁRIOS, CRÍTICAS E SUGESTÕES.....	32
5. APÊNDICE.....	36
6. REFERÊNCIAS.....	40
Abstract.....	54

Lista de figuras

- Figura 1 Eletroforese em campo elétrico alternado (PFGE) do DNA genômico fragmentado com *Sma*I obtido de 13 amostras de MRSA oriundas de Natal e comparação com o padrão obtido pelo CEB 36
- Figura 2 Eletroforese em campo elétrico alternado (PFGE) do DNA genômico fragmentado com *Sma*I obtido de 14 amostras de MRSA oriundas de Natal..... 37
- Figura 3 Eletroforese em campo elétrico alternado (PFGE) do DNA genômico fragmentado com *Sma*I obtido de 13 amostras de MRSA oriundas de Natal e comparação com o padrão obtido pelo CEB..... 38
- Figura 4 Eletroforese em campo elétrico alternado (PFGE) do DNA genômico fragmentado com *Sma*I obtido de 5 amostras de MRSA oriundas de Natal, e comparação dos padrões de PFGE exibidos por estas amostras, com alguns clones internacionais representantes de MRSA SCC*mec* IV..... 39

Lista de abreviaturas

CA-MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à meticilina associados a infecções comunitárias
CEB	Clone epidêmico brasileiro
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMI	Concentração mínima inibitória
EUA	Estados Unidos da América
HA-MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à meticilina associados a infecções hospitalares
HUOL	Hospital Universitário Onofre Lopes
MEJC	Maternidade Escola Januário Cicco
Met25	Triagem em ágar contendo 25 µg/mL de meticilina
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à meticilina
NaCl	Cloreto de sódio
MLST	Seqüência-tipo de multilocus enzimáticos
MSCRAMM	Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules
nmMRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à meticilina não-multirresistentes
PB	Pares de bases
PBP	Proteína ligadora à penicilina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PFGE	Eletroforese em campo elétrico alternado
SCC _{mec}	Cassete cromossômico estafilocócico <i>mec</i>

TEST	Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial
TSA	Tryptic soy agar
TSB	Tryptic soy broth
TSST-1	Toxina-1 da síndrome do choque tóxico
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
UFRN	Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Resumo

Staphylococcus aureus resistente à meticilina (MRSA) é um dos principais agentes de infecções associadas a serviços de saúde em todo o mundo. No Brasil, há a predominância de um clone de MRSA multirresistente denominando clone epidêmico brasileiro (CEB). Entretanto, novos clones não-multirresistentes com alta virulência têm sido descritos em infecções comunitárias e hospitalares. O objetivo desse estudo foi realizar a caracterização fenotípica e genotípica de cepas de MRSA isoladas na cidade do Natal/RN. Inicialmente avaliamos 60 amostras de *S. aureus* quanto a resistência à meticilina através de diferentes técnicas fenotípicas, utilizando a detecção do gene *mecA* por PCR como padrão. O antibiograma de todas as cepas foi realizado utilizando 12 antimicrobianos conforme descrito pelo CLSI. As cepas de MRSA foram caracterizadas geneticamente através da tipagem do cassete cromossômico estafilocócico *mec* (SCC*mec*) e da eletroforese em campo elétrico alternado (PFGE). Dos 60 *S. aureus* estudados, 45 foram resistentes à meticilina. Observamos que para algumas cepas de MRSA os testes de triagem em ágar com 6µg/mL de oxacilina e difusão em meio sólido com oxacilina-1µg apresentaram dificuldades na sua interpretação. No entanto, todas as 45 amostras de MRSA, foram facilmente detectadas pelos testes com o disco de cefoxitina-30µg e pesquisa da PBP2a. A análise molecular das cepas de MRSA mostrou 8 padrões distintos de PFGE (A-H), com predominância do padrão A (73%), relacionado ao CEB. Estas carreavam o SCC*mec* tipo IIIA, e apresentaram uma considerável variedade de subtipos (A₁-A₁₆). Cinco cepas de MRSA portando SCC*mec* IV também foram

identificadas, três delas relacionadas geneticamente ao clone USA800 (Padrão B). Destas cinco, três (2 padrão F e 1 padrão B) foram altamente susceptíveis as drogas testadas, entretanto, dois outros isolados, padrão B, apresentaram multirresistência. As amostras restantes pertenciam a padrões de PFGE distintos dos clones internacionais predominantes em nosso continente. Para realização deste projeto de pesquisa, a metodologia exigiu a interação com pesquisadores de áreas como: infectologia, microbiologia e biologia molecular. Portanto, esta dissertação apresentou um caráter de multidisciplinaridade e transdisciplinaridade no seu desenvolvimento.

Palavras-Chave: *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina, MRSA, infecção hospitalar, clone epidêmico brasileiro, clone pediátrico, PFGE, SCC*mec*, métodos fenotípicos.

1 INTRODUÇÃO

A resistência aos agentes antimicrobianos é um problema de saúde pública global e representa um dos principais componentes dos custos diretos em saúde. *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) se destaca dentro dessa problemática, uma vez que é resistente a maioria dos antimicrobianos disponíveis no comércio, tornando difícil o tratamento e o controle das infecções causadas por esse microrganismo^{1,2,3}.

Um fator agravante para esse problema é a dificuldade de detecção dessas amostras pelos métodos convencionais, uma vez que o microrganismo pode apresentar células com vários níveis de resistência dentro de uma mesma população bacteriana, configurando um fenômeno descrito como resistência heterogênea à meticilina^{4,5,6}.

A epidemiologia das infecções causadas pelos MRSA vêm sofrendo mudanças no decorrer dos anos com o aparecimento de cepas de MRSA não-multirresistentes no ambiente hospitalar^{7,8,9} e a emergência de amostras de MRSA entre pacientes da comunidade (CA-MRSA) que não apresentam riscos clássicos para infecções nosocomiais^{9,10,11}. Portanto, as técnicas de tipagem molecular são importantes para a elucidação epidemiológica das infecções por MRSA, as quais têm adquirido caráter endêmico ao longo das últimas décadas. O aumento crescente da prevalência desses microrganismos e a mudança na sua epidemiologia tornam importante a investigação e controle da disseminação desse patógeno em nossa cidade. Apesar dos estudos descrevendo a disseminação de um clone predominante em diversos hospitais de várias regiões do Brasil^{13,14}, ainda não existem dados em relação aos tipos

clonais prevalentes em hospitais do Rio Grande do Norte. Dentro deste contexto a tipagem molecular desses isolados pode ser uma ferramenta para melhor compreensão epidemiológica dos MRSA em nossa região, contribuindo com informações relativas à identificação dos padrões das infecções, investigações de surtos e ainda, auxiliar na conduta terapêutica empírica e na elaboração de medidas de controle que possam limitar a disseminação desse microrganismo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus é uma bactéria pertencente à família *Staphylococcaceae*, apresentando-se como cocos Gram positivos, cujo arranjo celular assemelha-se a cachos de uva. São microrganismos catalase positiva, imóveis, anaeróbios facultativos e não formadores de esporos^{15,16}.

Dentre os fatores de virulência, *S. aureus* apresenta alguns componentes de superfície na parede celular, como a proteína A, que atua localmente na resistência à fagocitose, e diversas proteínas agrupadas sob a sigla MSCRAMM (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules), responsáveis por promover a aderência bacteriana às proteínas solúveis presentes no plasma, como fibrinogênio, fibronectina, colágeno e outras. Entre as substâncias extracelulares destacam-se as citolisinas (α , β , δ , γ toxinas e leucocidinas), toxinas esfoliativas (ETA, ETB, ETC e ETD), toxina-1 da síndrome do choque tóxico (TSST-1) e várias enterotoxinas como a SEA, SEB, SEC₁₋₃, SED, SEE, SEG, SEH e SEQ¹⁵⁻¹⁸.

S. aureus tem sido reconhecido como um dos principais patógenos humanos e um dos mais comuns microrganismos nosocomiais, sendo responsável pela maioria das infecções pós-cirúrgicas. São considerados patógenos oportunistas, que fazem parte da microbiota humana, causando doença quando há algum comprometimento do sistema imune². Embora *S. aureus* seja encontrado em diversas partes do corpo, as narinas são o principal nicho ecológico em humanos². Na população saudável aproximadamente 20%

dos indivíduos albergam *S. aureus* persistentemente, 60% intermitentemente e 20% nunca albergaram essa bactéria¹⁹.

S. aureus podem causar uma grande variedade de infecções, mostrando três tipos gerais: (i) lesões superficiais tais como foliculite e furúnculo; (ii) sistêmicas tais como endocardite, osteomielite, pneumonia, abscesso pulmonar, meningite e bacteremia; e (iii) toxinoses tais como intoxicação alimentar, síndrome da pele escaldada e síndrome do choque tóxico^{16,20}.

2.2 *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA)

As penicilinas obtidas da fermentação de *Penicillium chrysogenum* inicialmente foram muito ativas contra cocos gram positivos²¹. Quando a penicilina G foi introduzida, no início da década de 1940, mais de 85% dos *S. aureus* eram susceptíveis a essa droga, entretanto, rapidamente surgiram as primeiras cepas de estafilococos resistentes à penicilina²². Essa resistência é consequência da produção de β -lactamase (ou penicilinase) que inativa os antimicrobianos β -lactâmicos por hidrólise de seu anel β -lactâmico²³. Atualmente, mais de 90% dos *Staphylococcus* spp. isolados produzem β -lactamase²⁴.

A meticilina foi a primeira penicilina semi-sintética resistente a β -lactamase, tendo como alvo as cepas de *S. aureus* produtoras de β -lactamase, entretanto, a resistência a esse antimicrobiano foi relatada poucos anos após a sua introdução na prática clínica²⁵. Essa resistência ocorreu devido à aquisição do gene *mecA* pelos *S. aureus*, o qual codifica para uma nova proteína ligadora de penicilina (PBP) denominada de PBP2a ou PBP2'. Essa nova PBP se liga fracamente às penicilinas e a outros β -lactâmicos atuando como uma

transpeptidase substituta na formação das pontes transversas, durante a síntese da parede celular bacteriana, quando as PBPs normais se encontram bloqueadas pela ligação covalente com o β -lactâmico²⁶. Dessa forma, a biossíntese da parede celular é restabelecida, mesmo na presença do antimicrobiano.

O gene *mecA* é um segmento de DNA exógeno de 2,1 Kb que encontra-se inserido em um elemento genético móvel, integrado ao cromossomo dos MRSA conhecido como cassete cromossômico estafilocócico *mec* (*SCCmec*)^{27,28}. Além do gene *mecA*, o *SCCmec* contém transposons e cópias integradas de plasmídeos que careiam vários genes de resistência contra antibióticos não β -lactâmicos^{28,29}. Até o momento sete tipos de *SCCmec* (I - VII) foram descritos, com tamanho variando de 20,9 a 66,9 kb²¹. Os *SCCmec* I (34,3 kb), IV (20,9-24,3 kb), V (28,0 kb), VI (20,9 kb) e VII (35,9 kb) codificam resistência somente aos β -lactâmicos enquanto os *SCCmec* II (53,0 kb) e III (66,9 kb) causam resistência a múltiplas classes de antimicrobianos, uma vez que possuem outros genes de resistência integrados, dentre eles os plasmídios pUB110 e pT181 e o transposon Tn554 (genes que codificam resistência à aminoglicosídeos, tetraciclina e, eritromicina e espectinomicina, respectivamente)^{21,28-30}.

2.3 Epidemiologia do MRSA

MRSA foi primeiro descrito na Inglaterra em 1961 três anos após a introdução da meticilina na prática clínica²⁵. Durante a década de 60 foi gradualmente se disseminando em proporções epidêmicas em alguns países da Europa e na década de 70 se disseminou por todo o planeta^{31,32}. Nas

décadas de 80 e 90, a prevalência dos MRSA em infecções associadas a serviços de saúde aumentou em vários países^{13,33}. Desde então os MRSA têm representado um grave problema de saúde pública global, devido à multirresistência aos antimicrobianos e, inclusive, à resistência aos antissépticos e desinfetantes, freqüentemente associada a essas cepas³⁴.

Levantamentos epidemiológicos sugerem que os *S. aureus* representam, atualmente, o principal agente etiológico das infecções assistidas nos setores de emergência, nos Estados Unidos^{35,36}. Na Europa, as taxas de prevalência de MRSA são bem variáveis dependendo do país estudado³¹. Em 2005, 29,1% dos *Staphylococcus aureus* isolados de 23 hospitais localizados em 10 países europeus, Turquia e Israel foram resistentes à meticilina, com prevalência variando de 2,1% na Suécia a 42,5% no Reino Unido e 54,7% na Irlanda³⁷. O programa SENTRY observou que entre 1997 e 1999 a prevalência dos MRSA foi de 23% na Austrália, 67% no Japão, 35% na América Latina, 32% nos EUA e 26% na Europa³⁸. Já o estudo TEST (Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial) realizado entre os anos de 2004 e 2007 detectou que 48,3% dos *Staphylococcus aureus* isolados de 33 centros da América Latina foram resistentes à meticilina³⁹.

No Brasil, a prevalência de MRSA em infecções associadas a serviços de saúde atinge valores elevados, que normalmente variam de 30 a 60%⁴⁰⁻⁴³. No entanto, um estudo recente mostrou que a prevalência de MRSA em uma maternidade escola da cidade de Natal foi de 18,1%⁴⁴.

Nos últimos anos a literatura vem descrevendo uma mudança gradual na epidemiologia dos MRSA, apontando a emergência de novas linhagens de MRSA entre pacientes da comunidade (CA-MRSA), capaz de causar infecções,

algumas vezes fatais, em indivíduos que não apresentam fatores de risco para infecções por MRSA, podendo assim acometer crianças e adultos jovens saudáveis²⁰. No Brasil, alguns trabalhos já mostram a presença de infecções leves ou moderadas causadas por CA-MRSA^{10,45} e, mais recentemente também foi relatado o primeiro caso de infecção severa por CA-MRSA⁴⁶.

2.4 Métodos para detecção da resistência à meticilina em *S. aureus*

Diversos métodos têm sido utilizados para a detecção da resistência à meticilina nos *S. aureus*, entretanto, devido à existência de um fenômeno conhecido como resistência heterogênea à meticilina, essa detecção pode ser dificultada^{5,6}.

O fenômeno da resistência heterogênea é definido como a presença, em uma dada cultura bacteriana, de subpopulações de células para as quais as concentrações mínimas inibitórias (CMI) para a meticilina são variáveis⁴. Tomasz et al⁴⁷ determinaram quatro diferentes classes de resistência à meticilina. Em cepas de MRSA pertencentes às classes 1 (CMI 1-3 µg/mL) e 2 (CMI 6-12 µg/mL), a maioria das células apresentam baixos níveis de resistência à meticilina, porém uma pequena proporção de células dessa cultura é altamente resistente. Em cepas de MRSA pertencentes às classes 3 (CMI 50-200 µg/mL) e 4 (CMI ≥ 800 µg/mL), a maioria das células são altamente resistentes à meticilina.

Segundo o CLSI⁴⁸ os métodos recomendados para detecção rotineira de resistência à meticilina são os testes de difusão em meio sólido utilizando os discos de oxacilina 1µg e cefoxitina 30µg. Para *S. aureus*, o teste com disco de cefoxitina é comparável ao teste de disco de oxacilina em termos de predizer a

resistência mediada pelo gene *mecA*; entretanto, a leitura do teste com o disco de cefoxitina é mais fácil e, portanto, esse deve ser o método de preferência.

Ainda segundo o CLSI⁴⁸, se forem obtidos resultados intermediários para *S. aureus*, recomenda-se realizar um teste alternativo, que pode ser a pesquisa do gene *mecA* por PCR, a detecção da PBP2a por aglutinação em látex, a determinação da CMI para oxacilina, ou o teste de triagem em agar Mueller-Hinton suplementado com 4% de NaCl e 6 µg/mL de oxacilina. O resultado do teste alternativo deve ser relatado, ao invés do resultado intermediário. Outro teste alternativo citado na literatura é a triagem em agar com 25 µg/mL de meticilina^{49,50}. Nessa técnica, a combinação de um inóculo pesado com a concentração de 25 µg/mL de meticilina favorece a diferenciação entre as cepas com resistência homogênea e heterogênea e exclui *S. aureus* sensíveis ou com resistência borderline⁴.

2.5 Clones Pandêmicos de MRSA

Desde que foi descrito pela primeira vez, ondas de disseminação clonal de cepas de MRSA têm se difundido rapidamente através do mundo³², responsáveis por proporções variáveis de infecções nosocomiais em diversos países²³. Desta forma, poucos clones de HA-MRSA são responsáveis pela grande maioria das infecções nosocomiais que ocorrem no mundo e pelos prejuízos sociais e econômicos decorrentes de tais infecções^{21,51,52}.

Utilizando-se a combinação de várias técnicas de tipagem molecular foram identificados seis clones de MRSA amplamente disseminados por todo o mundo. Esses clones denominados de Ibérico, Brasileiro, Húngaro, Nova Iorque/Japão, Pediátrico e EMRSA-16 são responsáveis por 68% dos MRSA e

representam as linhagens bem sucedidas em termos de habilidade de causar infecção, persistência e capacidade de disseminação de uma área geográfica para outra e até mesmo através de continentes². Esses clones foram nomeados de acordo com a área geográfica onde foram primeiramente descritos (p. ex. clone epidêmico brasileiro, clone ibérico, clone Nova Iorque/Japão), pelas características epidemiológicas dos pacientes em que foram descritos (p. ex. clone pediátrico), pelo número baseado em seu padrão de PFGE (p. ex. USA 100, USA 800) ou pelo tipo fágico (p. ex. EMRSA-15, EMRSA-16)^{32,53}.

O clone Ibérico ou USA500 foi primeiro relatado na Espanha em 1989⁵⁴, mas parece estar presente na Bélgica e França desde 1984⁵⁵. Posteriormente também foi descrito em Portugal⁵⁶, Itália⁵⁷, Reino Unido⁵⁷, Alemanha⁵⁸, Polônia⁵⁹, República Tcheca⁶⁰ e Estados Unidos⁶¹.

O clone epidêmico brasileiro (CEB) foi relatado primeiramente no Brasil em 1992¹³ e posteriormente em outros países como Portugal⁶², Argentina^{63,64}, Uruguai⁶⁴, Chile⁶⁴, Grécia⁶⁵, República Tcheca⁶⁰, sendo também relatado em outros países tais como Finlândia⁶⁷, Alemanha⁶⁶, Polônia⁶⁶, Reino Unido⁶⁶ e Irã⁶⁷. Um dado interessante é que o CEB ao se instalar em um hospital em Portugal foi capaz de suplantar o clone anteriormente predominante, denominado clone Ibérico, o qual era, até então, o *cluster* de MRSA dominante nos hospitais daquele país^{2,62}.

O clone húngaro está extensivamente disseminado em tal país⁶⁸, e também foi relatado em hospitais da China e Taiwan⁶⁹. Este clone é na realidade uma variante do CEB, que se diferencia do primeiro por possuir uma variação no SCC*mec*: apresenta o plasmídeo pT181 substituindo o plasmídeo

pl258 e, devido a isso, foi classificado como SCCmec tipo III, enquanto o CEB como SCCmec tipo IIIA⁷⁰.

O clone pediátrico ou USA800 foi isolado pela primeira vez em 1992 nas enfermarias de um hospital pediátrico de Portugal⁵², sendo também reportado em diversos países como Polônia⁵⁹, Estados Unidos⁶¹, França⁷¹, Espanha⁷², Argentina⁷³, Colômbia⁷⁴ e Brasil^{5,75-77}.

O clone Nova Iorque/Japão ou USA100 foi identificado primeiramente em hospitais metropolitanos de Nova Iorque, Nova Jersey, Pensilvânia e Connecticut⁷⁸ e em um hospital de Tóquio⁷⁹. Além de ser detectado no Canadá⁸⁰, Finlândia⁶⁶, Reino Unido⁶⁶, Portugal⁸¹, Espanha⁸², Brasil⁷⁶ e Hungria⁸³. Este clone é geneticamente relacionado ao clone pediátrico, porém apresenta um SCCmec tipo II.

O clone EMRSA-16 ou USA200 é um dos tipos dominantes de MRSA encontrados em Hospitais do Reino Unido⁸⁴ e largamente disseminado na Grécia⁸⁵, México⁶⁴, Espanha⁸² e Canadá⁸⁰. Esse clone também foi encontrado em outros países europeus tais como Suécia⁸⁶, Dinamarca⁸⁷, Suíça⁸⁷ e Bélgica⁸⁷.

Recentemente tem-se observado globalmente a emergência de clones de CA-MRSA no ambiente hospitalar⁸⁸. Esses clones, que diferem geneticamente dos clones pandêmicos, têm causado um número crescente de infecções associadas a serviços de saúde⁸⁹. O *Western Australian 1 clone*, a primeira linhagem de CA-MRSA, foi detectada no final da década de 1980 no oeste da Austrália causando infecções em aborígenes⁹⁰. Posteriormente, outras linhagens de CA-MRSA foram detectadas na Austrália: *Oceania Southwest Pacific clone* e *Queensland clone*, e nos Estados Unidos: USA300 e

USA400⁹¹⁻⁹³. Esses clones também apresentam disseminação mundial, sendo descritos em países como Estados Unidos^{89,93}, França⁹⁴, Japão⁹⁵, Itália⁹⁶, Reino Unido⁹⁷, Uruguai⁹⁸ e Brasil^{10,45,46,99}.

Em decorrência das mudanças que vêm ocorrendo na epidemiologia dos MRSA, tivemos como principal objetivo a caracterização fenotípica e genotípica de cepas *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina isoladas na cidade do Natal-RN, para uma melhor compreensão da dinâmica desse microrganismo em nossa região.

3 ANEXAÇÃO DE ARTIGOS PUBLICADOS

Artigo 1: Genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates obtained in the Northeast region of Brazil (Periódico: Brazilian Journal of Medical and Biological Research-Qualis B1).

Artigo 2: Evaluation of different methods for detecting methicilin resistance in *Staphylococcus aureus* isolates in a university hospital located in the Northeast of Brazil (Periódico: Brazilian Journal of Microbiology -Qualis B2)

Genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates obtained in the Northeast region of Brazil

F.C. de Sousa-Junior¹, M.C. Silva-Carvalho⁴,
M.J.B.C. Fernandes¹, M.F.P. Vieira², F.L.P.C. Pellegrino⁴,
A.M.S. Figueiredo⁴, M.C.N. de Melo¹ and E.P. Milan³

¹Departamento de Microbiologia e Parasitologia, ²Hospital Universitário Onofre Lopes, ³Departamento de Infectologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brasil
⁴Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Abstract

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is a major agent of hospital infections worldwide. In Brazil, a multiresistant MRSA lineage (ST239-SCCmecIIIA), the so-called Brazilian epidemic clone (BEC), has predominated in all regions. However, an increase in nosocomial infections caused by non-multiresistant MRSA clones has recently been observed. In the present study, 45 clinical isolates of MRSA obtained from a university hospital located in Natal city, Brazil, were identified by standard laboratory methods and molecularly characterized using staphylococcal chromosome cassette *mec* (SCCmec) typing and pulsed-field gel electrophoresis. Antimicrobial susceptibility testing was carried out using CLSI methods. The MRSA isolates studied displayed a total of 8 different pulsed-field gel electrophoresis patterns (types A to H) with predominance (73%) of pattern A (BEC-related). However, MRSA harboring SCCmec type IV were also identified, 3 (7%) of which were genetically related to the pediatric clone - USA800 (ST5-SCCmecIV). In addition, we found a considerable genetic diversity within BEC isolates. MRSA displaying SCCmecIV are frequently susceptible to the majority of non- β -lactam antibiotics. However, emergence of multiresistant variants of USA800 was detected.

Key words: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; MRSA; Antimicrobial resistance; Brazilian epidemic clone; Pediatric clone; SCCmecIV

Staphylococcus aureus is recognized as one of the most important human pathogens. These versatile bacteria can be involved in nosocomial or community-associated infections (1,2). The increasing incidence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) has become a serious clinical and therapeutic problem. Hospital-acquired MRSA (HA-MRSA) are generally resistant to many antimicrobial agents such as quinolones, aminoglycosides, tetracyclines, and macrolides, hindering treatment and prolonging hospital stay (3). Methicillin resistance is determined in staphylococci by the staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCCmec) carrying the *mecA* gene, which encodes the altered penicillin-binding protein 2A or 2', which in turn confers cross-resistance to all β -lactam antibiotics (1).

The increased prevalence of nosocomial infections

caused by MRSA during the last two decades throughout the world has been associated with the widespread occurrence of specific international MRSA lineages (3). Based on the genotyping techniques of pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), SCCmec typing and multilocus sequence typing, various pandemic HA-MRSA clones have been identified, including the Iberian clone (USA500; ST247-SCCmecIA), the Brazilian epidemic clone - BEC (ST239-SCCmecIIIA), the New York/Japan clone (USA100; ST5-SCCmecII), the pediatric clone (USA800; ST5-SCCmecIV or SCCmecVI), and the EMRSA-16 clone (USA200; ST36-SCCmecII) (1,3,4). Studies conducted in Brazil have shown the predominance of BEC, a universally occurring multiresistant clone first described in Brazil in 1992, which has accounted for 70-80% of the total MRSA isolated in Brazilian hospitals

Correspondence: M.C.N. de Melo, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 59072-970 Natal, RN, Brasil. Fax: +55-84-3211-9210. E-mail: celmelo@gmail.com

Research supported by Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Norte (FAPERN, #MS/CNPq/FAPERN-03/2004). Received November 13, 2008. Accepted July 22, 2009.

(5,6). Recently, the number of reported infections caused by non-multiresistant MRSA (nmMRSA) in hospitals has increased (7,8). In contrast to most HA-MRSA, these strains are commonly susceptible to the majority of other non- β -lactam antibiotics and carry *SCCmec* type IV (9). The incidence of nosocomial infections caused by nmMRSA has also increased in Brazil (9,10). Thus, due to recent changes in MRSA epidemiology in healthcare facilities throughout the world, the objective of the present study was to genotype MRSA isolates collected at a university hospital in Natal city, RN, located in the Northeast of Brazil.

The study was carried out using 45 randomly chosen MRSA isolates, 42 obtained from the Onofre Lopes University Hospital, a tertiary reference hospital with about 190 beds distributed over 10 wards of various specialties and one intensive care unit. The remaining 3 isolates were obtained from the maternity unit of the teaching hospital and a private laboratory, both located in the city of Natal. The study was approved by the Research Ethics Committee of the Federal University of Rio Grande do Norte, according to protocol No. 109/2006. The identification of these isolates was confirmed using Gram stain, catalase and free coagulase tests. The isolates were stored at -70°C in trypticase soy broth (Becton Dickinson, USA) containing 10% (w/v) glycerol. The disk-diffusion test was performed according to the recommendations of the Clinical and Laboratory Standards Institute (11). Methicillin agar screening (25Met) was carried out using trypticase soy agar containing 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ methicillin (Sigma, USA) and a heavy bacterial inoculum (10^9 - 10^{10} cfu) as described previously (12). The methicillin-susceptible strain of *S. aureus* ATCC 29213 and the MRSA isolate BMB9393 were used to control the susceptibility tests. PFGE of total DNA was performed as described elsewhere (5). The BMB9393, AM771 and NY17859 representatives of the BEC, pediatric and New York/Japan clones, respectively, were used to compare the PFGE band patterns. The primary criterion used to define PFGE types was that described by Tenover et al. (13). However, due to the wide variety of BEC subtypes detected among the isolates studied, PFGE patterns were also compared using the GelCompar II software, version 4.01 (Applied Maths, Belgium). Thus, to analyze the correlations of the banding patterns a similarity index was determined for each pair of strains using the Dice coefficient with 0.5% band tolerance. Finally, *SCCmec* typing was performed by the multiplex polymerase chain reaction according to a previously described methodology (14).

The total number of MRSA isolated at Onofre Lopes University Hospital in 2004, 2005, and 2006 was 39, 39, and 38, respectively. MRSA accounted for 49% of the *S. aureus* recovered by the clinical laboratory. Of these isolates, 42 (36%) were selected at random from a single patient each to perform the molecular characterization, along with the three isolates obtained at the maternity unit and at a private laboratory in Natal. These isolates were obtained

from different sites, such as secretions (51%), catheters (19%), blood (15%), urine (10%), and others (5%). The mean age of the patients studied was 56 years, ranging from 7 months to 84 years.

The analysis of the 45 isolates by the Tenover criteria revealed 8 different PFGE patterns (types A to H). Eight type A isolates (18%) displayed a pattern identical to that of BMB9393 (pattern A_1), a prototype BEC strain. However, 25 additional isolates were visually classified as BEC subtypes (A_2 - A_{16}). Due to the diversity of subtypes A, the genetic relationship among these isolates was also confirmed by plotting the PFGE patterns in a dendrogram. The hierarchical clustering of the patterns confirmed that the BEC subtypes were closer to the BEC prototype strain than the other isolates analyzed (Figure 1). All BEC-related isolates harbored the *SCCmecIII*A element. The strains belonging to BEC and its subtypes were resistant to most of the antimicrobials tested, except vancomycin and one or two other drugs, and showed homogeneous resistance to methicillin (since they all grew confluent on 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ methicillin plates). The BEC strain is endemic in Brazilian hospitals, and its predominance among HA-MRSA has been reported since 1992, when it was first described in the country (5,6,12). This clone has also been isolated in other South American countries, in Europe and in Asia (1,3), demonstrating a superior ability for worldwide dissemination. It was previously reported that BEC has advantageous properties such as enhanced biofilm production, as well as high adhesive and invasive properties, a fact that may explain the bacterial adaptation to the hospital environment and its international propagation (15).

In the present study, we observed a wide variability of PFGE patterns for type A (BEC isolates), with a total of 16 subtypes. It is interesting to note that pattern A_1 was observed in only 24.2% of the BEC isolates. BEC isolates have spread throughout Brazil for more than a decade and previous studies have shown that pattern A_1 accounted for 70-80% of the BEC subtypes (5,12,15). Thus, it seems likely that small genomic changes may have occurred during these years resulting in BEC variants also well-adapted to cause severe hospital infections. It is possible that these genetic changes represent important mechanisms of clonal divergence (expansion) and may have some significance in a specific epidemiological scenario. Previous investigations by our group using microarray technology to study the global genome of BEC isolates showed that these isolates can carry different mobile genetic elements, mainly bacteriophages (Figueiredo AMS, Dunman PM, unpublished results). Genetic variation among isolates within a clone has also been demonstrated by others (16).

The three isolates grouped into cluster B according to Tenover criteria had more than six PFGE band differences from BEC isolate BMB9393 and displayed *SCCmec* type IV. The pattern B (B_1 - B_3) isolates were very similar to those of the AM771 strain, a representative of USA800, also known

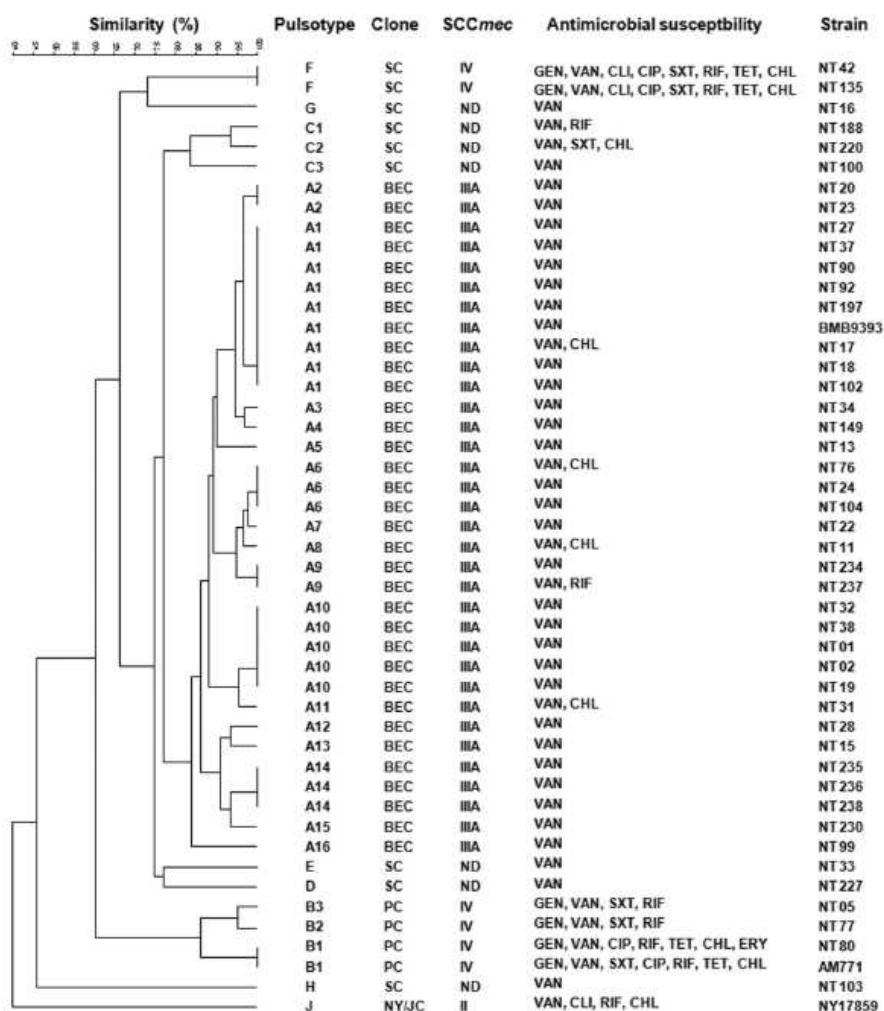


Figure 1. Dendrogram generated by computerized analysis (Gel Compar II, version 4.01) of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* band profiles obtained with pulsed-field gel electrophoresis. Clones: SC = sporadic clone; BEC = Brazilian epidemic clone; PC = pediatric clone; NY/JC = New York/Japan clone. Antimicrobial agents: GEN = gentamicin; VAN = vancomycin; CLI = clindamycin; CIP = ciprofloxacin; SXT = trimethoprim-sulfamethoxazole; RIF = rifampin; TET = tetracycline; CHL = chloramphenicol; ERY = erythromycin.

as the pediatric clone. Finally, nine other isolates differed from BEC, pediatric and New York/Japan clones by more than six bands and were classified as sporadic clones (types C-H). The two isolates displaying type F also carried SCCmecIV. Three isolates harboring SCCmecIV (2 type F and 1 type B) were highly susceptible (resistant to the β -lactams only). However, two other B-type isolates (USA800-related) displayed lower susceptibility to antimicrobial drugs. In addition, all SCCmecIV isolates showed

heterogeneous resistance to methicillin since they formed isolated colonies in 25Met.

Despite the intensive use of antimicrobial agents in hospitals, an increasing incidence of nmMRSA has been reported in different countries (7,9,17). Previous studies have also shown that community-acquired MRSA, which are generally more susceptible to antibiotics than HA-MRSA isolates, have also emerged as healthcare-associated pathogens (2,17). The detection of USA800 (pediatric

clone) in Natal corroborates other studies indicating that this clone type is an important emergent nosocomial agent in Brazil (9,10,12). USA800 isolates have been recently detected in hospitals located in Rio de Janeiro and Recife (10). This clone was also reported to colonize health workers of a home care service in Brazil (18). Although most SCCmecIV isolates are highly susceptible to non- β -lactams, in the present study two of the three USA800 isolates were resistant not only to β -lactam antibiotics, but also to erythromycin, clindamycin, tetracycline, and ciprofloxacin, a fact that may indicate a high ability of these SCCmecIV isolates to acquire multiple resistant genes.

The first report of USA800 isolates occurred in a pediatric hospital in Portugal (19). However, in the present study, all patients infected with USA800 were adults or elderly persons. Similar results were obtained by de Miranda et al. (10) who described the isolation of USA800 from immunocompromised adult and elderly individuals. The emergence of nmMRSA isolates in nosocomial environments does not support the theory that points to multiresistance as

the only factor involved in the success of specific MRSA clones. It is likely that USA800 isolates own particular virulence traits that contribute to the adaptation of these bacteria as international nosocomial pathogens (1,3,10). Laurent et al. (20) have suggested that strains having a non-multiresistant phenotype may display advantageous properties that would enable them to supplant multiresistant MRSA isolates in hospital environments. Other studies have indicated that high growth rate, the ability to form biofilm on inert polystyrene surfaces and the presence of the *ecg* locus, which encodes the enterotoxins SEG, SEI, SEM, and SEO, may have contributed, at least in part, to the performance of these organisms as global nosocomial pathogens (10,20).

Our results demonstrate the predominance of BEC among the nosocomial isolates in Natal, and reveal a considerable genetic diversity within this clone. Also, we report the emergence of multiresistant variants of USA800 in this city. Our data support the importance of genotyping to monitor the dynamics of MRSA epidemiology in hospitals.

References

- Deurenberg RH, Vink C, Kalenic S, Friedrich AW, Bruggeman CA, Stobberingh EE. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13: 222-235.
- Ribeiro A, Coronado AZ, Silva-Carvalho MC, Ferreira-Carvalho BT, Dias C, Rozenbaum R, et al. Detection and characterization of international community-acquired infections by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Rio de Janeiro and Porto Alegre cities causing both community- and hospital-associated diseases. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; 59: 339-345.
- Aires de Sousa M, de Lencastre H. Bridges from hospitals to the laboratory: genetic portraits of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2004; 40: 101-111.
- McDougal LK, Steward CD, Killgore GE, Chaitram JM, McAllister SK, Tenover FC. Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 5113-5120.
- Teixeira LA, Resende CA, Ormonde LR, Rosenbaum R, Figueiredo AM, de Lencastre H, et al. Geographic spread of epidemic multiresistant *Staphylococcus aureus* clone in Brazil. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2400-2404.
- dos Santos Soares MJ, da Silva-Carvalho MC, Ferreira-Carvalho BT, Figueiredo AM. Spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* belonging to the Brazilian epidemic clone in a general hospital and emergence of heterogenous resistance to glycopeptide antibiotics among these isolates. *J Hosp Infect* 2000; 44: 301-308.
- Cuevas O, Cercenado E, Bouza E, Castellares C, Trincado P, Cabrera R, et al. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Spain: a multicentre prevalence study (2002). *Clin Microbiol Infect* 2007; 13: 250-256.
- Munckhof WJ, Nimmo GR, Carney J, Schooneveldt JM, Huygens F, Inman-Bamber J, et al. Methicillin-susceptible, non-multiresistant methicillin-resistant and multiresistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: a clinical, epidemiological and microbiological comparative study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2008; 27: 355-364.
- de A Trindade P, Pacheco RL, Costa SF, Rossi F, Barone AA, Mamizuka EM, et al. Prevalence of SCCmec type IV in nosocomial bloodstream isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 3435-3437.
- de Miranda OP, Silva-Carvalho MC, Ribeiro A, Portela F, Cordeiro RP, Caetano N, et al. Emergence in Brazil of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates carrying SCCmecIV that are related genetically to the USA800 clone. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13: 1165-1172.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. In: Anonymous, 15th Informational Supplement Document, Vol. 25; 2005. p 45-47.
- Melo MC, Silva-Carvalho MC, Ferreira RL, Coelho LR, Souza RR, Gobbi CN, et al. Detection and molecular characterization of a gentamicin-susceptible, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clone in Rio de Janeiro that resembles the New York/Japanese clone. *J Hosp Infect* 2004; 58: 276-285.
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2233-2239.
- Oliveira DC, de Lencastre H. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 2155-2161.

15. Amaral MM, Coelho LR, Flores RP, Souza RR, Silva-Carvalho MC, Teixeira LA, et al. The predominant variant of the Brazilian epidemic clonal complex of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* has an enhanced ability to produce biofilm and to adhere to and invade airway epithelial cells. *J Infect Dis* 2005; 192: 801-810.
16. Bartels MD, Boye K, Rhod LA, Skov R, Westh H. Rapid increase of genetically diverse methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Copenhagen, Denmark. *Emerg Infect Dis* 2007; 13: 1533-1540.
17. Patel M, Waites KB, Hoesley CJ, Stamm AM, Canupp KC, Moser SA. Emergence of USA300 MRSA in a tertiary medical centre: implications for epidemiological studies. *J Hosp Infect* 2008; 68: 208-213.
18. Rozenbaum R, Silva-Carvalho MC, Souza RR, 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* 2006; 27: 1041-1050.
19. Sa-Leao R, Santos Sanches I, Dias D, Peres I, Barros RM, de Lencastre H. 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.
20. Laurent F, Lelievre H, Cornu M, Vandenesch F, Carret G, Etienne J, et al. Fitness and competitive growth advantage of new gentamicin-susceptible MRSA clones spreading in French hospitals. *J Antimicrob Chemother* 2001; 47: 277-283.

Evaluation of different methods for detecting methicilin resistance in *Staphylococcus aureus* isolates in a university hospital located in the Northeast of Brazil

Francisco Canindé de Sousa Júnior¹, Gildelane da Silva Néri¹, Ana Karine Silva¹, Bibiana Priscila Rodrigues Câmara de Araújo¹, Myrian Júlia de Paiva Dourado Guerra¹, Maria José de Britto Costa Fernandes¹, Eveline Pipolo Milan², Maria Celeste Nunes de Melo^{1*}

¹Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brasil.

²Departamento de Infectologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brasil.

Running title: Evaluation of methods for detecting MRSA

*Corresponding Author. Mailing address: UFRN, Centro de Biociências, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Av. Senador Salgado Filho, S/N, 59072-970, Natal, RN, Brasil. Fax: +55-84-3211-9210.

ABSTRACT

Many methods have been described for the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), but the heterogeneous expression of methicillin resistance affects the reliability of these methods. The aim of the present study was to evaluate some methods for detecting methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolates in a university hospital located in the Northeast of Brazil. Among the isolates, 15 were methicillin-susceptible and 45 were methicillin-resistant, including low-level heterogeneous resistance strains. Both the 30 µg-cefoxitin disk and PBP2a test had 100% sensibility/specificity and appear to be good options for the detection of MRSA in the clinical laboratory.

Key-words: MRSA, methicillin resistance, heterogeneous resistance, cefoxitin, PBP2a.

INTRODUCTION

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) has become the leading nosocomial pathogen worldwide and seems to have spread into the community (10). Methicillin resistance in staphylococci is caused by the expression of PBP2a encoded by the *mecA* gene that is located on a genetic element called the staphylococcal cassette chromosome *mec-SCC_{mec}* (9).

There are several methods available to laboratories for detecting methicillin resistance. These include oxacillin disk test, automated susceptibility testing systems, and oxacillin agar screen plate. In addition, the cefoxitin disk test was recently recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute for prediction of *mecA*-mediated resistance (5). Finally, there are also *mecA*-specific tests such as *mecA* polymerase chain reaction and PBP2a latex agglutination test (20). However, detection of methicillin resistance in routine clinical laboratories has been problematic ever since the emergence of MRSA during the 1960s (19). The difficulties are associated mainly with heterogeneous expression of methicillin resistance in most MRSA strains currently prevalent (11,23).

Errors in the detection of methicillin resistance can have serious adverse clinical consequences. False-susceptibility results may result in treatment failure and the spread of MRSA if appropriate infection control measures are not applied. Conversely, false-resistance results may increase healthcare costs following unnecessary isolation precautions and may lead to overuse of glycopeptides (3,22). Thus, as some controversy still exists over the inaccuracy of the recommended methods for identification of MRSA, we evaluated some of

these methods for detecting methicilin resistance in *Staphylococcus aureus* isolates in a university hospital located in the Northeast of Brazil.

MATERIAL AND METHODS

Bacterial strains

A total of 60 strains of *S. aureus* isolated from clinical samples in a university hospital in Natal city, RN, located in the Northeast of Brazil were used in the study. The isolates were identified as *S. aureus* using routine tests (Gram's stain, catalase and free coagulase test) and stored at -70 °C in TSB containing 10% (w/v) glycerol. The study was approved by the Research Ethics Committee of the Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), according to protocol no. 109/2006. The methicillin-susceptible strain of *S. aureus* ATCC 25923 and the MRSA isolate BMB9393 were used to control.

Detection of the *mecA* gene

We considered the presence of the *mecA* gene as the reference or “gold standard” method for establishing the sensitivity and specificity of each of the techniques studied. The DNA extraction was performed as described by Pacheco *et al.* (13) and the *mecA* gene was detected with the polymerase chain reaction (PCR) technique based on the procedure described by Oliveira and de Lencastre (12), with the following primers: *mecA*-F AAA ACT AGG TGT TGG TGA AGA TAT ACC and *mecA*-R GAA AGG ATC TGT ACT GGG TTA ATC AG, which amplify an internal region of 585bp of this gene. Amplicons were visualized following electrophoresis on agarose gels stained with ethidium bromide.

Susceptibility tests

The 1 µg-oxacillin and 30 µg-cefoxitin disk tests (DME, Araçatuba, SP, Brazil) and 6 µg/mL oxacillin screen test (OST) were performed by observing the recommendation of the Clinical and Laboratory Standards Institute (5). The 25 µg/mL methicillin test (25-Met) was carried using trypticase soy agar plates and heavy bacterial inoculums (10^9 - 10^{10} c.f.u.), as described previously (14).

Detection of penicillin-binding protein 2a (PBP2a test)

The Slidex[®] MRSA Detection (Biomérieux, Paris, France), which is based on the agglutination of latex particles sensitized with monoclonal antibodies against PBP2a, was carried out and interpreted according to the manufacturer's instructions.

Population analysis profiling (PAP)

The expression of methicillin resistance was analyzed by PAP for strains that yielded isolated colonies on 25-Met. Overnight cultures grown in TSB at 35°C, containing 10^9 - 10^{10} c.f.u./mL, were plated at four dilutions (10^0 , 10^{-1} , 10^{-3} and 10^{-5}) on to agar plates containing serial (two-fold) dilutions of methicillin at concentrations of 0 and 0.75 to 800 mg/mL. Colonies were counted after 48 h incubation at 35°C. A graphic representation was constructed by plotting colony forming units per millilitre against the concentration of methicillin (21).

RESULTS

Among the 60 *S. aureus* isolates, 45 were MRSA (*mecA* positive) and 15 were MSSA (*mecA* negative; Fig. 1). Of the 45 MRSA isolates, 73% (33/45) belonged to the Brazilian Epidemic Clone (ST239- SCC*mec*III A), 7% (3/45) to

the pediatric clone (ST5- SCC*mecIV*), and 20% (9/45) to the sporadic clones (accepted for publication).

Of all the *mecA*-positive isolates, one (NT42) displayed inhibition zone diameters of 13mm by a 1µg-oxacillin disk test (resistance breakpoint ≤10mm) and two (NT05 and NT80) showed small individual colonies or light growth within the inhibition zone >10mm and could have been erroneously classified as methicillin-susceptible isolates (sensitivity 93.3%, specificity 100%). The NT42 strain yielded a very hazy growth on the surface of OST (sensitivity 97.8%, specificity 100%). In addition, these strains (NT42, NT05 e NT80) yielded isolated colonies on 25-Met and were classified as low-level heterogeneous resistance to methicillin by PAP (Fig. 2). The 30 µg-cefoxitin disk test and PBP2a test showed 100% de sensibility e specificity. The sensibility and specificity of the phenotypic tests as compared with *mecA* detection are presented in Table 1.

DISCUSSION

Rapid and accurate identification of MRSA is required to help clinicians select appropriate antibiotic treatment and to avoid the spread of these strains (16,18). However, there is no optimal phenotypic method for detecting methicillin resistance in *S. aureus* (2,3). Furthermore, genotypic tests involving *mecA* gene detection by PCR, which are considered to be the reference (1,20), are not practical for routine use in clinical laboratories.

In the paper presented here, we evaluated some methods for detecting methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolates and observed that the 1 µg-oxacillin disk test and oxacillin screen test may occasionally result in

misidentification, especially by a microbiology technician with no previous practice with MRSA detection (17). Similar results were found by other authors (2,6,11,23). Then, special attention should be given to these strains because these, as well as community-acquired MRSA (CA-MRSA) strains, have been described in Brazil and throughout the world (15,17,23).

In this study the 30 µg-cefoxitin disk test was found to be as sensitive as the *mecA* gene detection by PCR. The greater reliability of the test with the cefoxitin disk confirmed earlier studies which showed that the cefoxitin disk test, without modification to conditions to improve expression of resistance, is more reliable than the oxacillin disk test for the detection of methicillin resistance in *S. aureus* (7,16,18). According to Caulwelier *et al.* (4), because the cefoxitin would be a better inducer of the expression of the *mecA* gene, this could explain why heterogeneous MRSA populations that variably express the *mecA* gene are better detected by disk diffusion with cefoxitin than with oxacillin, which is a weak inducer of PBP2a production.

The PBP2a test was 100% sensitive and did not misclassify any MRSA with low-level resistance as MSSA. Our findings are consistent with many other studies (4,6,8). In addition to being easy to interpret and showing 100% correlation with *mecA* detection, the PBP2a test has the advantage that suspected colonies could be tested from the primary cultures before the accomplishment of the bacterial identification (17). However, this test is rather expensive for routine application.

Although the number of isolates tested in our study was low, our results support the evidence that the cefoxitin disk test and the PBP2a test are good options for MRSA detection in the clinical laboratories, as both showed 100%

correlation with *mecA* detection, including low-level resistance to methicillin strains.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Norte- FAPERN (protocol MS/CNPq/FAPERN-03/2004) and Pró-Reitoria de Pesquisa- PROPESQ/UFRN.

REFERENCES

1. Anand, K.B.; Agrawal, P.; Kumar, S.; Kapila, K. (2009) Comparison of cefoxitin disc diffusion test, oxacillin screen agar, and PCR for *mecA* gene for detection of MRSA. *Indian J. Med. Microbiol.* 27 (1), 27-29.
2. Baddour, M.M.; AbuElkheir, M.M.; Fatani, A.J. (2007) Comparison of *mecA* polymerase chain reaction with phenotypic methods for the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Curr. Microbiol.* 55 (6), 473-479.
3. Boutiba-Ben Boubaker, I.; Ben Abbes, R.; Ben Abdallah, H.; Mamlouk, K.; Mahjoubi, F.; Kammoun, A.; Hammami, A.; Ben Redjeb, S. (2004) Evaluation of a cefoxitin disk diffusion test for the routine detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Infect.* 10 (8), 762-765.
4. Cauwelier, B.; Gordts, B.; Descheemaeker, P.; Van Landuyt, H. (2004) Evaluation of a disk diffusion method with cefoxitin (30 microg) for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 23 (5), 389-392.

5. CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). (2007) Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, 9th edn. Approved Standard M2-A9. Wayne, PA: document M100-S17.
6. Felten, A.; Grandry, B.; Lagrange, P.H.; Casin, I. (2002) Evaluation of three techniques for detection of low-level methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a disk diffusion method with cefoxitin and moxalactam, the vitek 2 system, and the MRSA-screen latex agglutination test. *J. Clin. Microbiol.* 40 (8), 2766-2771.
7. Fernandes, C.J.; Fernandes, L.A.; Collignon, P. (2005) Cefoxitin resistance as a surrogate marker for the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 55 (4), 506–510.
8. Hamdad, F.; Donda, F.; Lefebvre, J.F.; Laurans, G.; Biendo, M.; Thomas, D.; Canarelli, B.; Rousseau, F.; Eb, F. (2006) Detection of methicillin/oxacillin resistance and typing in aminoglycoside-susceptible methicillin-resistant and kanamycin-tobramycin-resistant methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. *Microb. Drug Resist.* 12 (3), 177-185.
9. Hanssen, A.M.; Ericson Sollid, J.U. (2006) SCC*mec* in staphylococci: genes on the move. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 46(1), 8-20.
10. Kluytmans, J.; Struelens, M. (2009) Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in the hospital. *BMJ.* 12 (1), 338-364.
11. Melo, M.C.N.; Silva-Carvalho, M.C.; Ferreira, R.L.; Coelho, L.R.; Souza, R.R.; Gobbi, C.N.; Rozenbaum, R.; Solari, C.A.; Ferreira-Carvalho, B.T.; Figueiredo, A.M.S. (2004) Detection and molecular characterization of a gentamicin-susceptible, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)

clone in Rio de Janeiro that resembles the NewYork/Japanese clone. *J. Hosp. Infec.* 58 (4), 276-285.

12. Oliveira, D.C.; de Lencastre, H. (2002) Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the mec element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46 (7), 2155-2161.

13. Pacheco, A.B.; Guth, B.E.; Soares, K.C.; Nishimura, L.; Almeida, D.F.; Ferreira, L.C. (1997) Random amplification of polymorphic DNA reveals serotype-specific clonal clusters among enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from humans. *J. Clin. Microbiol.* 35 (6), 1521-1525.

14. Rezende, C.A.; Figueiredo, A.M.S. (1997) Discrimination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from borderline-resistant and susceptible isolates by different methods. *J. Med. Microbiol.* 46 (2), 145-149.

15. Ribeiro, A.; Coronado, A.Z.; Silva-Carvalho, M.C.; Ferreira-Carvalho, B.T.; Dias, C.; Rozenbaum, R.; Del Peloso, P.F.; da Costa Ferreira Leite, C.; Teixeira, L.A.; Figueiredo, A.M. (2007). Detection and characterization of international community-acquired infections by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Rio de Janeiro and Porto Alegre cities causing both community- and hospital-associated diseases. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 59 (3), 339-345.

16. Sharp, S.E.; Warren, J.A.; Thomson, R.B. Jr. (2005) Cefoxitin disk diffusion screen for confirmation of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates and utility in the clinical laboratory. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 51 (1), 69-71.

17. Silva-Carvalho, M.C.; Teixeira, L.A.; Ferreira, F.A.; Ribeiro, A.; Ferreira-Carvalho, B.T.; Figueiredo, A.M. (2009) Comparison of different methods for

detecting methicillin resistance in MRSA isolates belonging to international lineages commonly isolated in the American continent. *Microbiol. Immunol.* 53 (2), 117-122.

18. Skov, R.; Smyth, R.; Clausen, M.; Larsen, A.R.; Frimodt-Muller, N.; Olsson-Liljequist, B.; Kahlmeter, G. (2003) Evaluation of a cefoxitin 30 µg disc on Iso-Sensitest agar for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 52 (2), 204–207.

19. Skov, R.; Smyth, R.; Larsen, A.R.; Bolmström, A.; Karlsson, A.; Mills, K.; Frimodt-Moller, N.; Kahlmeter, G. (2006) Phenotypic detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* by disk diffusion testing and Etest on Mueller-Hinton agar. *J. Clin. Microbiol.* 44 (12), 4395-4399.

20. Swenson, J.M.; Lonsway, D.; McAllister, S.; Thompson, A.; Jevitt, L.; Zhu, W.; Patel, J.B. (2007) Detection of *mecA*-mediated resistance using reference and commercial testing methods in a collection of *Staphylococcus aureus* expressing borderline oxacillin MICs. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 58 (1), 33-39.

21. Tomasz, A.; Nachman, S.; Laef, H. (1991) Stable classes of phenotypic expression in methicillin-resistant clinical isolates of staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35 (1), 124-129.

22. Velasco, D.; Tomas, M.M.; Cartelle, M.; Beceiro, A.; Perez, A.; Molina, F.; Moure, R.; Villanueva, R.; Bou, G. (2005) Evaluation of different methods for detecting methicillin (oxacillin) resistance in *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 55 (3), 379-382.

23. Witte, W.; Pasemann, B.; Cuny, C. (2007) Detection of low-level oxacillin resistance in *mecA*-positive *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Infect.* 13 (4), 408-412.

Table 1: Sensibility and specificity of the phenotypic tests as compared with *mecA* detection

Test method	Detected as MRSA	Sensibility (%)	Specificity (%)
1 µg-oxacillin disk test	42	93.3	100
30 µg-cefoxitin disk test	45	100	100
6µg/mL oxacillin screen test	44	97.8	100
PBP2a test	45	100	100

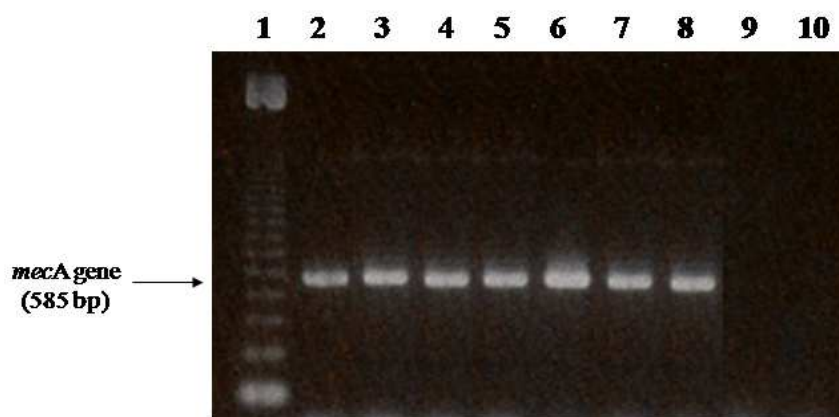


Figure 1. Gel image of representative PCR *mecA* gene products (585bp), Lane 1: molecular size marker (123bp); Lanes 2-10: isolates BMB9393 (a positive control), NT05, NT11, NT42, NT76, NT80, NT99, NT21 and ATCC 25923 (a negative control).

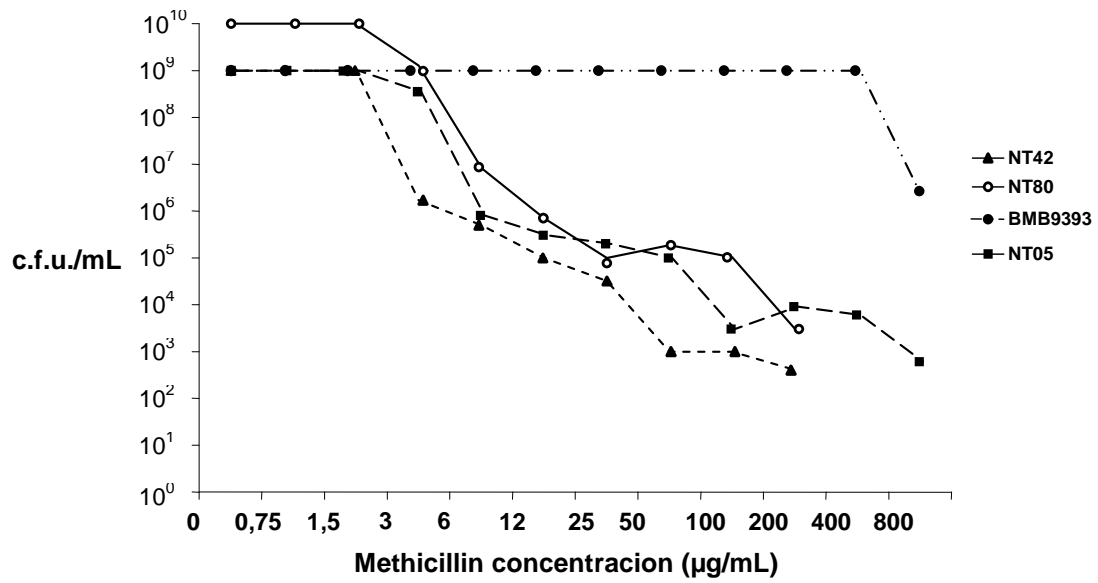


Figure 2. Population analysis profile of three low-level heterogeneous isolates (NT42, NT80 and NT05) and one homogeneous isolate (BMB9393).

4 COMENTÁRIOS, CRÍTICAS E SUGESTÕES

A capacidade de disseminação clonal das cepas de MRSA contribui para o aumento da morbidade e mortalidade e dos custos hospitalares em todo o mundo²¹. Em nosso país, a disseminação do CEB foi inicialmente observada, em cinco grandes hospitais localizados no Rio de Janeiro, Niterói, São Paulo, Porto Alegre e Manaus¹³. A predominância desse clone também foi verificada em outros estudos mostrando estar amplamente disseminado em hospitais brasileiros^{14,42,100,101}. Apesar da predominância do CEB entre os isolados hospitalares, estudos mais recentes mostram que a epidemiologia dos MRSA vêm sofrendo mudanças nos últimos anos com a emergência de cepas apresentando SCC*meclV* no ambiente hospitalar^{7,76,77}.

Diante desse contexto, tornou-se oportuno caracterizar as cepas de MRSA isoladas em hospitais da cidade de Natal-RN, sendo elaborado um projeto de mestrado na área de Microbiologia sob orientação da Profa. Dra. Eveline Pipolo Milan, vinculado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), com o objetivo de tentar entender a dinâmica dos MRSA em hospitais de nossa cidade.

Esse trabalho foi resultado de uma parceria com o Departamento de Microbiologia e Parasitologia da UFRN e o Departamento de Microbiologia Médica da UFRJ. A caracterização fenotípica dos isolados foi realizada no Laboratório de Bacteriologia Médica do Centro de Biociências da UFRN em colaboração com a Profa. Dra. Maria Celeste Nunes de Melo. A caracterização molecular das cepas foi realizada no Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de

Góes da UFRJ em colaboração com a Profa. Dra. Agnes Marie Sá Figueiredo. Também houve contribuição dos Laboratórios de microbiologia do Hospital Universitário Onofre Lopes (HUOL), Maternidade Escola Januário Cicco (MEJC) e do Laboratório privado Hemolab, que cederam as cepas bacterianas utilizadas no trabalho.

As principais dificuldades encontradas no desenvolvimento do projeto foram a obtenção dos isolados bacterianos de origem hospitalar e a necessidade de deslocamento para outro centro (UFRJ) para a realização da caracterização molecular dos isolados. Apesar disso, os principais objetivos do projeto foram alcançados tendo como produção científica um artigo aceito para publicação no Periódico Brazilian Journal of Medical and Biological Research (Qualis B1) intitulado “Genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates obtained in the Northeast region of Brazil” e outro submetido ao Periódico Brazilian Journal of Microbiology (Qualis B2) intitulado “Evaluation of different methods for detecting methicilin resistance in *Staphylococcus aureus* isolates in a university hospital located in the Northeast of Brazil”.

Além da caracterização dos MRSA, a ida ao Rio de Janeiro possibilitou o intercâmbio com o grupo de pesquisa que é referência no estudo de MRSA liderado pela Dra. Agnes Figueiredo, em que tive a oportunidade de aprender algumas técnicas de tipagem molecular de bactérias tais como PFGE e PCR multiplex, possibilitando um enorme enriquecimento científico.

Os resultados oriundos do projeto de pesquisa mostraram a predominância do CEB entre os isolados nosocomiais de Natal/RN, entretanto revelaram também que outros clones pandêmicos como o USA800, podem estar emergindo em hospitais de nossa cidade. Chamamos atenção para o fato

de que 4 das 5 cepas de MRSA carreando SCC*mecIV* foram sensíveis a sulfametoxazol-trimetoprima, que pode ser uma alternativa terapêutica de menor custo para o tratamento dessas infecções. Porém, ressaltamos aqui o fato de que não existem estudos clínicos bem desenhados sobre tratamento dessas infecções com essa associação¹⁰². Uma das características fenotípicas mais notória do clone de MRSA USA800 é sua maior susceptibilidade aos antimicrobianos, diferentemente das cepas de hospitalares clássicas de MRSA⁷. No entanto, conforme observamos no estudo aqui apresentado, além da resistência aos antibióticos β -lactâmicos, alguns trabalhos mais recentes relataram que cepas de MRSA com SCC*mecIV* podem expressar resistência a alguns outros antibióticos, como a eritromicina^{45,77,93}, clindamicina^{45,77,93}, tetraciclina⁴⁵, levofloxacina⁹¹ e inclusive ao cloranfenicol⁷⁷ e gentamicina⁷⁷.

Frente à dificuldade de detecção da resistência à meticilina por alguns dos métodos convencionais recomendados pelo CLSI⁴⁸, resolvemos comparar várias técnicas para detecção de MRSA. Um dado que merece destaque foi que cinco amostras testadas, apesar de apresentarem resistência heterogênea à meticilina, foram facilmente detectadas através do teste de difusão em meio sólido utilizando o disco cefoxitina, de acordo com as recomendações do CLSI⁴⁸; indicando, portanto, que este teste é preferível ao do disco de oxacilina para detecção da resistência mediada pelo gene *mecA*. Três dessas amostras, quanto testadas pelo teste de disco-difusão com oxacilina e triagem em agar suplementado com 6 μ g/mL de oxacilina, apresentaram uma leitura difícil, devido à presença de um tênue crescimento e, algumas vezes quase imperceptível, dentro do halo de susceptibilidade e na superfície do agar, respectivamente. O teste para detecção da PBP2a por aglutinação em látex

mostrou ser prático, sensível e de fácil interpretação, no entanto, essa técnica ainda não é amplamente utilizada nos laboratórios clínicos devido ao seu custo elevado.

Temos como perspectivas dar continuidade ao estudo epidemiológico das infecções por MRSA utilizando técnicas moleculares como ferramenta, uma vez que os dados da literatura mostram que estas infecções passam por um momento de transição importante, com a emergência desses microrganismos entre indivíduos da comunidade sem fatores de risco para infecções por MRSA. Portanto, a vigilância a respeito da epidemiologia desses microrganismos é ainda mais importante nesse momento.

5 APÊNDICE

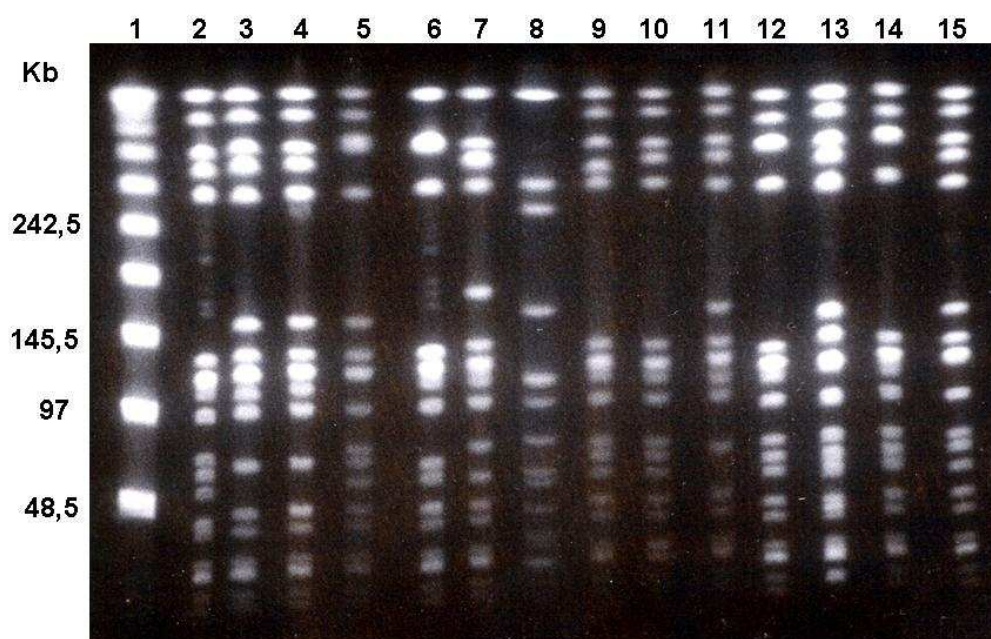


Figura 1: Eletroforese em campo elétrico alternado (PFGE) do DNA genômico fragmentado com *Sma*I obtido de 13 amostras de MRSA oriundas de Natal e comparação com o padrão obtido pelo CEB. Canaleta 1: λ -*ladder* (Padrão de peso molecular); Canaleta 2: BMB9393 (padrão do CEB); Canaleta 3: NT01 (pulso-tipo A₁₀); Canaleta 4: NT02 (pulso-tipo A₁₀); Canaleta 5: NT11 (pulso-tipo A₈); Canaleta 6: NT13 (pulso-tipo A₅) Canaleta 7: NT15 (pulso-tipo A₁₃) Canaleta 8: NT16 (pulso-tipo G); Canaleta 9: NT17 (pulso-tipo A₁); Canaleta 10: NT18 (pulso-tipo A₁); Canaleta 11: NT19 (pulso-tipo A₁₀); Canaleta 12: NT20 (pulso-tipo A₂) Canaleta 13: NT22 (pulso-tipo A₇); Canaleta 14: NT23 (pulso-tipo A₂) e Canaleta15: NT24 (pulso-tipo A₆).

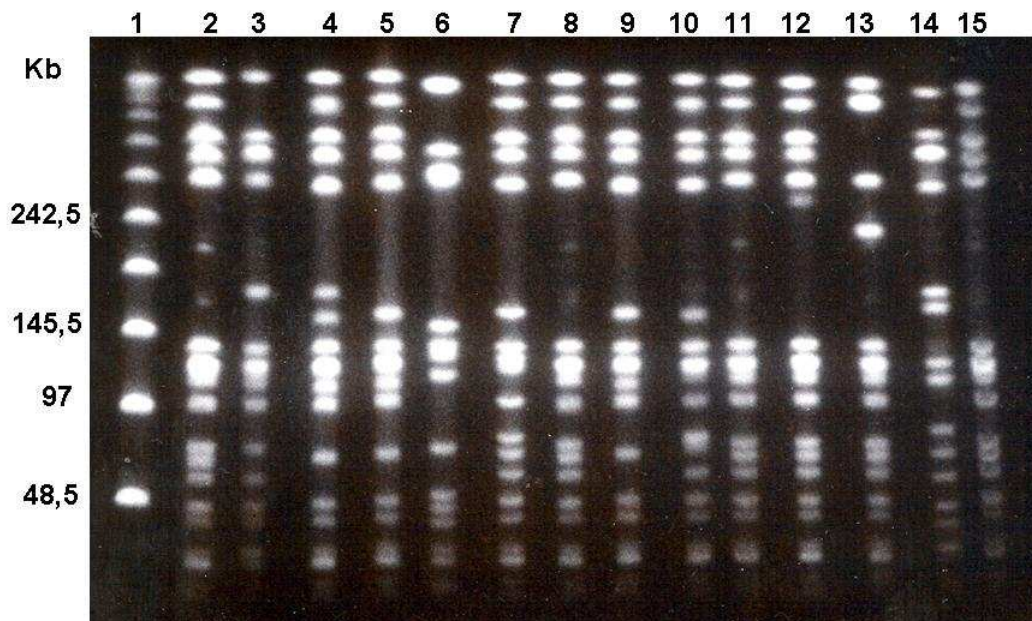


Figura 2: Eletroforese em campo elétrico alternado (PFGE) do DNA genômico fragmentado com *Sma*I obtido de 14 amostras de MRSA oriundas de Natal. Canaleta 1: λ -ladder (Padrão de peso molecular); Canaleta 2: NT27 (pulso-tipo A₁); Canaleta 3: NT28 (pulso-tipo A₁₂); Canaleta 4: NT31 (pulso-tipo A₁₁); Canaleta 5: NT32 (pulso-tipo A₁₀); Canaleta 6: NT33 (pulso-tipo E) Canaleta 7: NT34 (pulso-tipo A₃) Canaleta 8: NT37 (pulso-tipo A₁); Canaleta 9: NT38 (pulso-tipo A₁₀); Canaleta 10: NT76 (pulso-tipo A₆); Canaleta 11: NT90 (pulso-tipo A₁); Canaleta 12: NT92 (pulso-tipo A₁) Canaleta 13: NT99 (pulso-tipo A₁₆); Canaleta 14: NT100 (pulso-tipo C₃) e Canaleta 15: NT197 (pulso-tipo A₁).

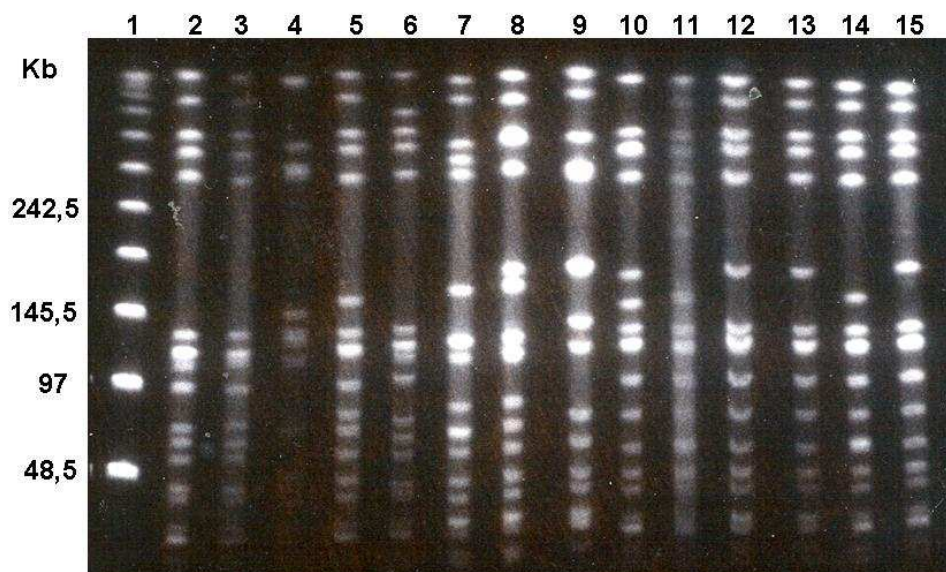


Figura 3: Eletroforese em campo elétrico alternado (PFGE) do DNA genômico fragmentado com *Sma*I obtido de 13 amostras de MRSA oriundas de Natal e comparação com o padrão obtido pelo CEB. Canaleta 1: λ -*ladder* (Padrão de peso molecular); Canaleta 2: BMB9393 (padrão do CEB, pulso-tipo A₁); Canaleta 3: NT102 (pulso-tipo A₁); Canaleta 4: NT103 (pulso-tipo H); Canaleta 5: NT104 (pulso-tipo A₆); Canaleta 6: NT149 (pulso-tipo A₄) Canaleta 7: NT188 (pulso-tipo C₁) Canaleta 8: NT220 (pulso-tipo C₂); Canaleta 9: NT227 (pulso-tipo D); Canaleta 10: NT230 (pulso-tipo A₁₅); Canaleta 11: NT234 (pulso-tipo A₉); Canaleta 12: NT235 (pulso-tipo A₁₄) Canaleta 13: NT236 (pulso-tipo A₁₄); Canaleta 14: NT237 (pulso-tipo A₉) e Canaleta 15: NT238 (pulso-tipo A₁₄).

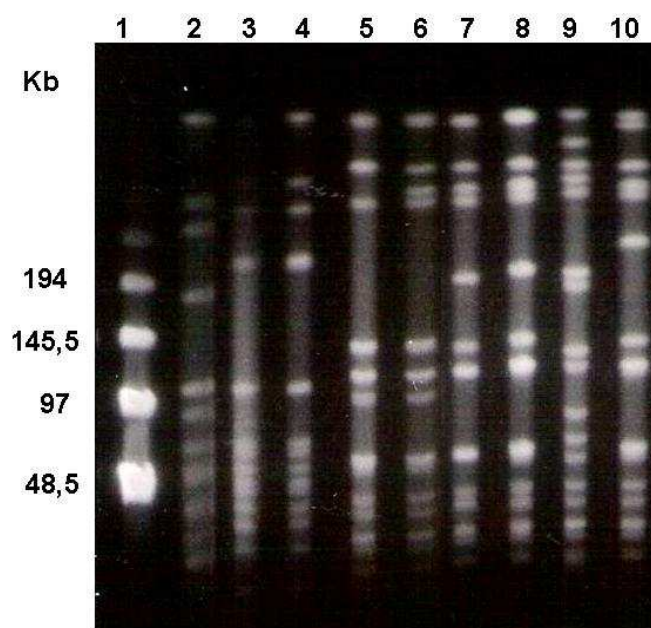


Figura 4: Eletroforese em campo elétrico alternado (PFGE) do DNA genômico fragmentado com *Sma*I obtido de 5 amostras de MRSA oriundas de Natal, e comparação dos padrões de PFGE exibidos por estas amostras, com alguns clones internacionais representantes de MRSA SCC*me*cIV. Canaleta 1: λ -*ladder* (Padrão de peso molecular); Canaleta 2: WB49 (Padrão do clone de CA-MRSA *Oceania Southwest Pacific*); Canaleta 3: NT42 (pulso-tipo F); Canaleta 4: NT135 (pulso-tipo F); Canaleta 5: NT05 (pulso-tipo B₃); Canaleta 6: NT77 (pulso-tipo B₂); Canaleta 7: NT80 (pulso-tipo B₁); Canaleta 8: AM771 (padrão do clone USA 800); Canaleta 10: US440 (padrão do clone USA 400).

6 REFERÊNCIAS

1. Ang JY, Ezike E, Asmar BI. Antimicrobial resistance. *Ind J Pediat* 2004; 71(3):229-39.
2. Aires de Sousa M, de Lencastre H. Bridges from hospital to the laboratory: genetic portraits of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2004; 40(2):101-11.
3. Szczepanik A, Koziół-Montewka M, Al-Doori Z, Morrison D, Kaczor D. Spread of a single multiresistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone carrying a variant of staphylococcal cassette chromosome *mec* type III isolated in a university hospital. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007; 26(1):29-35.
4. Rezende CA, Figueiredo AMS. Discrimination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from borderline-resistant and susceptible isolates by different methods. *J Med Microbiol* 1997; 46(2):145-9.
5. Melo MCN, Carvalho MCS, Ferreira RL, Coelho LR, Souza R, Gobbi CN et al. Detection and molecular characterization of a gentamicin-susceptible, methicillin *Staphylococcus aureus* (MRSA) clone in Rio de Janeiro that resembles the New York/Japanese clone. *J Hosp Infec* 2004; 58(4):276-85.
6. Witte W, Pasemann B, Cuny C. Detection of low-level oxacillin resistance in *mecA*-positive *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13(4):408-12.
7. Trindade PA, Pacheco RL, Costa SF, Rossi F, Baron AA, Mamizuka EM, et al. Prevalence of SCC*mec* type IV in nosocomial bloodstream isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2005; 43(7):3435-7.

8. Huang YH, Tseng SP, Hu JM, Tsai JC, Hsueh PR, Teng LJ. Clonal spread of SCC_{mec} type IV methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* between community and hospital. Clin Microbiol Infect 2007; 13(13):717–24.
9. Reygaert W. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): prevalence and epidemiology issues. Clin Lab Sci 2009; 22(2):111-4.
10. Ribeiro A, Dias C, Silva-Carvalho MC, Berquó L, Ferreira FA, Santos RN, et al. First report of infection with community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in South America. J Clin Microbiol 2005; 43(4):1985-8.
11. Chen C, Huang Y, Chiu C, Su L, Lin T. Clinical features and genotyping analysis of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in Taiwanese children. Pediat Infect Dis J 2005; 24(1):40-5.
12. Hidron AI, Low CE, Honig EG, Blumberg HM. Emergence of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain USA300 as a cause of necrotising community-onset pneumonia. Lancet Infect Dis 2009;9(6):384-92.
13. Teixeira LA, Resende CA, Ormonde LR, Rosenbaum R, Figueredo AMS, de Lancastre H, et al. Geographic spread of epidemic multiresistant *Staphylococcus aureus* clone in Brazil. J Clin Microbiol 1995; 33(9):2400-4.
14. Soares MJS, Carvalho MCS, Carvalho BTF, Figueredo AMS. Spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* belonging to the Brazilian epidemic clone in a general hospital and emergence of heterogenous resistance to glycopeptide antibiotics among these isolates. J Hosp Infect 2000; 44(4):301-8.
15. Bannerman TL, Peacock SJ. *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and other catalase-positive cocci. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. Manual of Clinical Microbiology; 9th edition; Washington: ASM Press; 2007. p. 390-411.

16. Santos AL, Santos DO, Freitas CC, Ferreira BLA, Afonso IF, Rodrigues CR, et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. J Bras Patol Med Lab 2007; 43(6):413-23.
17. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Rev 2000; 13(1):16-34,
18. Diep BA, Otto M. The role of virulence determinants in community-associated MRSA pathogenesis. Trends Microbiol 2008; 16(8):361-9.
19. Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. Clin Microbiol Rev 1997; 10(3):505-20.
20. Deurenberg RH, Stobberingh EE. The molecular evolution of hospital- and community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Curr Mol Med 2009; 9(2):100-15.
21. Deurenberg RH, Stobberingh EE. The evolution of *Staphylococcus aureus*. Infect Genet Evol 2008; 8(6):747-63.
22. Jevons MP, Coe AW, Parker MT. Methicillin resistance in staphylococci. Lancet 1963; 1(7287):904-7.
23. Schito GC. The importance of the development of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Infect 2006; 12(1):3-8.
24. Oliveira DC, Tomaz A, de Lencastre H. Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Lancet Infect Diseases 2002; 2(3):180-9.
25. Jevons MP. "Celbenin"-resistant staphylococci. Br Med J 1961; 1(3):124-5.

26. Berger-Bachi B, Rohrer S. Factors influencing methicillin resistance in Staphylococci. Arch Microbiol 2002;178(3):165-71.
27. 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(6):1549-55.
28. Ito T, Okuma K, Ma XX, Yuzawa H, Hiramatsu K. Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. Drug Resist Updat 2003; 6(1):41-52.
29. Ito T, Katayama Y, Asada K, Mori N, Tsutsumimoto K, Tiensasitorn C, et al. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45(5):1323-36.
30. Takano T, Higuchi W, Otsuka T, Baranovich T, Enany S, Saito K, et al. Novel characteristics of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* belonging to multilocus sequence type 59 in Taiwan. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52(3):837-45.
31. Stefani S, Varaldo PE. Epidemiology of methicillin-resistant staphylococci in Europe. Clin Microbiol Infect 2003; 9(12):1179-86.
32. Chambers HF, Deleo FR. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. Nat Rev Microbiol 2009; 7(9):629-41.
33. Chambers HF. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. Clin Microbiol Rev 1997; 10(4):781-91.
34. Chapman JS. Disinfectant resistance mechanisms, cross-resistance, and co-resistance. Int Biodet Biodeg 2003 41:271-6.

35. Frazee BW, Lynn J, Charlebois ED, Lambert L, Lowery D, Perdreau-Remington F. High prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in emergency department skin and soft tissue infections. *Ann Emerg Med* 2005; 45(3):311-20.
36. Moran GJ, Krishnadasan A, Gorwitz RJ, Fosheim GE, McDougal LK, Carey RB, et al. Methicillin-resistant *S. aureus* infections among patients in the emergency department. *N Engl J Med* 2006; 355(7):666-74
37. Sader HS, Watters AA, Fritsche TR, Jones RN. Daptomycin antimicrobial activity tested against methicillin-resistant staphylococci and vancomycin-resistant enterococci isolated in European medical centers (2005). *BMC Infect Dis* 2007; 7:29
38. Diekema DJ, Pfaller MA, Schmitz FJ, Smayevsky J, Bell J, Jones RN, et al. Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997–1999. *Clin Infect Dis* 2001; 32(Suppl. 2):114–32.
39. Rossi F, García P, Ronzon B, Curcio D, Dowzicky MJ. Rates of antimicrobial resistance in Latin America (2004-2007) and in vitro activity of the glycylicline tigecycline and of other antibiotics. *Braz J Infect Dis* 2008; 12(5):405-15
40. Ribas RM, Freitas C, Gontijo Filho PP. Nosocomial bloodstream infections: organisms, risk factors and resistant phenotypes in the Brazilian University Hospital. *Braz J Infect Dis* 2007; 11(3):351-4
41. Guilarde AO, Turchi MD, Martelli CM, Primo MG. *Staphylococcus aureus* bacteraemia: incidence, risk factors and predictors for death in a Brazilian teaching hospital. *J Hosp Infect* 2006; 63(3):330-6.

42. Vivone AM, Diep BA, Magalhães ACG, Santos KRN, Riley LW, Sensabaugh GF, et al. Clonal composition of *Staphylococcus aureus* isolates at a Brazilian university hospital: identification of international circulating lineages. *J Clin Microbiol* 2006, 44(5):1686-91.

43. Guzmán-Blanco M, Mejía C, Isturiz R, Alvarez C, Bavestrello L, Gotuzzo E, et al. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Latin America. *Int J Antimicrob Agents* 2009; 34(4):304-8.

44. Sousa Júnior FC, Nunes EWF, Nascimento ED, Oliveira SM, Melo MCN, Fernandes MJBC. Prevalência de *Staphylococcus* spp resistentes à metilina isolados em uma maternidade escola da cidade de Natal, Estado do Rio Grande do Norte. *Rev Soc Bras Med Trop* 2009; 42(2):179-82.

45. Ribeiro A, Coronado AZ, Silva-Carvalho MC, Ferreira-Carvalho BT, Dias C, Rozenbaum R, et al. Detection and characterization of international community-acquired infections by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Rio de Janeiro and Porto Alegre cities causing both community- and hospital-associated diseases. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; 59(3):339-45.

46. Rozenbaum R, Sampaio MG, Batista GS, Garibaldi AM, Terra GM, Souza MJ, et al. The first report in Brazil of severe infection caused by community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). *Braz J Med Biol Res* 2009; 42(8):756-60.

47. Tomasz A, Nachman S, Leaf H. Stable classes of phenotypic expression in methicillin-resistant clinical isolates of staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35(1):124-9.

48. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, 9th edn. Approved Standard M2-A9. Wayne, PA: document, 2007, M100-S17.

49. de Lencastre H, Sá Figueiredo AM, Urban C, Rahal J, Tomasz A. Multiple mechanisms of methicillin resistance and improved methods for detection in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35(4):632-9.

50. Falcão MH, Texeira LA, Ferreira-Carvalho BT, Borges-Neto AA, Figueiredo AM. Occurrence of methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus* within a single colony contributing to MRSA mis-identification. *J Med Microbiol* 1999; 48(6):515-21.

51. Van Belkum A, Van Leeuwen W, Verkooyen R, Sacilik SC, Cokmus C, Verbrugh H. Dissemination of a single clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among Turkish hospitals. *J Clin Microbiol* 1997; 35(4):978-81.

52. Sa-Leao R, Santos Sanches I, Dias D, Peres I, Barros RM, de Lencastre H. 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(6):1913-20.

53. Vivoni AM, Moreira BM. Application of molecular techniques in the study of *Staphylococcus aureus* clonal evolution - a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; 100(7):693-8.

54. Dominguez MA, de Lencastre H, 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):2081-7.

55. Deplano A, Witte W, van Leeuwen WJ, Brun Y, Struelens M.J. Clonal dissemination of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Belgium and neighboring countries. *Clin Microbiol Infect* 2000; 6(5):239-45.

56. Sanches IS, Ramirez M, Troni H, Abecassis M, Padua M, Tomasz A, et al. Evidence for the geographic spread of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone between Portugal and Spain. *J Clin Microbiol* 1995; 33(5):1243-6.
57. Mato R, Santos Sanches I, Venditti M, Platt DJ, Brown A, Chung M, et al. Spread of the multiresistant Iberian clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) to Italy and Scotland. *Microb Drug Resist* 1998; 4(2):107-12
58. Witte W, Cuny C, Braulke C, Heuck D. Clonal dissemination of two MRSA strains in Germany. *Epidemiol Infect* 1994; 113(1):67-73.
59. Leski T, Oliveira D, Trzcinski K, Sanches IS, Aires de Sousa M, Hryniewicz W, et al. Clonal distribution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Poland. *J Clin Microbiol* 1998; 36(12):3532-9.
60. Melter O, Santos Sanches I, Schindler J, Aires de Sousa M, Mato R, Kovárova V, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clonal types in the Czech Republic. *J Clin Microbiol* 1999; 37(9):2798-803.
61. Roberts RB, de Lencastre A, Eisner W, Severina EP, Shopsin B, Kreiswirth BN, et al. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in 12 New York hospitals. MRSA Collaborative Study Group. *J Infect Dis* 1998; 178(1):164-71.
62. Aires de Sousa M, Sanches IS, Ferro ML, Vaz MJ, Saraiva Z, Tendeiro T, et al. Intercontinental spread of a multidrug-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone. *J Clin Microbiol* 1998; 36(9):2590-6.
63. Coimbra MVS, Teixeira LA, Ramos RL, Predari SC, Castello L, Famiglietti A, et al. Spread of the Brazilian epidemic clone of a multiresistant MRSA in two cities in Argentina. *J Med Microbiol* 2000; 49(2):187-92.

64. Aires de Sousa M, Miramaia M, Sances IS, Avila S, Adamson I, Casagrande ST, et al. Three-year assessment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America from 1996 to 1998. *J Clin Microbiol* 2001; 39(6):2197-205.
65. Aires de Sousa M, Bartzavali C, Spiliopoulou I, Santos Sanches I, Crisostomo MI, de Lencastre H. Two international methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones endemic in a university hospital in Patras, Greece. *J Clin Microbiol* 2003; 41(5):2027-32.
66. Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H, Spratt BG. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(11):7687-92.
67. Fatholahzadeh B, Emaneini M, Aligholi M, Gilbert G, Taherikalani M, Jonaidi N, et al. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones from a teaching hospital in Tehran. *Jpn J Infect Dis* 2009; 62(4):309-11.
68. de Lencastre H, Severina EP, Milch H, Thege MK, Tomasz A. Wide geographic distribution of a unique methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone in Hungarian hospitals. *Clin Microbiol Infect* 1997; 3(3):289-96.
69. Aires de Sousa M, Cristotomo MI, Sanches IS, Fuzhong JS, Tomasz A, de Lencastre H. Frequent recovery of a single clonal type of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* from patients in two hospitals in Taiwan and China. *J Clin Microbiol* 2003; 41(1):159-63.
70. Oliveira DC, Wu SW, de Lencastre H. Genetic organization of the downstream region of the *mecA* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates carrying different polymorphisms of this region. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44(7):1906-10.

71. Dauwalder O, Lina G, Durand G, Bes M, Meugnier H, Jarlier V, et al. Epidemiology of invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones collected in France in 2006 and 2007. *J Clin Microbiol* 2008; 46(10):3454-8.
72. Pérez-Roth E, Lorenzo-Díaz F, Batista N, Moreno A, Méndez-Alvarez S. Tracking methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones during a 5-year period (1998 to 2002) in a Spanish hospital. *J Clin Microbiol* 2004; 42(10):4649-56.
73. Corso A, Santos Sanches I, Aires de Sousa M, Rossi A, de Lencastre H. Spread of a methicillin-resistant and multiresistant epidemic clone of *Staphylococcus aureus* in Argentina. *Microb Drug Resist* 1998; 4(4):277-88.
74. Gomes AR, Sanches IS, Aires de Sousa M, 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.
75. Rozenbaum R, Silva-Carvalho MC, Souza RR, Melo MCN, Gobbi CN, Coelho LR, et al. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disseminated in a home care system. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2006; 27(10):1041-50.
76. de Miranda OP, Silva-Carvalho MC, Ribeiro A, Portela F, Cordeiro RP, Caetano N, et al. Emergence in Brazil of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates carrying SCC $_{mecV}$ that are related genetically to the USA800 clone. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13(12):1165-72.
77. Schuenck RP, Nouér SA, Winter CO, Cavalcante FS, Scotti TD, Ferreira ALP, et al. Polyclonal presence of non-multiresistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates carrying SCC $_{mec IV}$ in health care-associated infections in a hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009; 64(3):434-41.

78. Roberts RB, Chung M, de Lencastre H, Hargrave J, Tomasz A, Nicolau DP, et al. Distribution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones among health care facilities in Connecticut, New Jersey, and Pennsylvania. *Microb Drug Resist* 2000; 6(3):245-51.

79. Aires de Sousa M, de Lencastre H, Santos Sanches I, Kikuchi K, Totsuka K, Tomasz A. Similarity of antibiotic resistance patterns and molecular typing properties of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates widely spread in hospitals in New York City and in a hospital in Tokyo, Japan. *Microb Drug Resist* 2000; 6(3):253-8.

80. Simor AE, Ofner-Agostini M, Bryce E, McGeer A, Paton S, Mulvey MR; Laboratory characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Canadian hospitals: results of 5 years of National Surveillance, 1995-1999. *J Infect Dis* 2002; 186(5):652-60.

81. Aires-de-Sousa M, Correia B, de Lencastre H; Multilaboratory Project Collaborators. Changing patterns in frequency of recovery of five methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in portuguese hospitals: surveillance over a 16-year period. *J Clin Microbiol* 2008; 46(9):2912-7.

82. Potel C, Alvarez M, Alvarez P, Otero I, Fluiters E. Evolution, antimicrobial susceptibility and assignment to international clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated over a 9-year period in two Spanish hospitals *Clin Microbiol Infect* 2007; 13(7):728-30.

83. Conceição T, Aires-de-Sousa M, Füzi M, Tóth A, Pászti J, Ungvári E, et al. Replacement of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Hungary over time: a 10-year surveillance study. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13(10):971-9.

84. Moore PC, Lindsay JA. Molecular characterization of the dominant UK methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains, EMRSA-15 and EMRSA-16. *J Med Microbiol* 2002; 51(6):516-21.

85. Aires de Sousa M, Bartzavali C, Spiliopoulou I, Sanches IS, Crisóstomo MI, de Lencastre H. Two international methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones endemic in a university hospital in Patras, Greece. *J Clin Microbiol* 2003; 41(5):2027-32.
86. Seeberg S, Larsson L, Welinder-Olsson C, Sandberg T, Skyman E, Bresky B, et al. How an outbreak of MRSA in Gothenburg was eliminated: by strict hygienic routines and massive control-culture program. *Lakartidningen* 2002; 99(32-33):3198-204.
87. Murchan S, Kaufmann ME, Deplano A, de Ryck R, Struelens M, Zinn CE, et al. Harmonization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for epidemiological typing of strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a single approach developed by consensus in 10 European laboratories and its application for tracing the spread of related strains. *J Clin Microbiol* 2003; 41(4):1574-85.
88. Patel M. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, recognition and management. *Drugs* 2009; 69(6):693-716.
89. Vandenesch F, Naimi T, Enright MC, Lina G, Nimmo GR, Heffernan H, et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. *Emerg Infect Dis* 2003; 9(8):978-84.
90. Udo EE, Pearman JW, Grubb WB. Genetic analysis of community isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Western Australia. *J Hosp Infect* 1993; 25(2):97-108.
91. Nimmo GR, Schooneveldt J, O'Kane G, McCall B, Vickery A. Community acquisition of gentamicin-sensitive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in southeast Queensland, Australia. *J Clin Microbiol* 2000; 38(11):3926-31.

92. Munckhof WJ, Schooneveldt J, Coombs GW, Hoare J, Nimmo GR. Emergence of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection in Queensland, Australia. *Int J Infect Dis* 2003; 7(4):259-64.
93. Tenover FC, McDougal LK, Goering RV, Killgore G, Projan SJ, Patel JB, et al. Characterization of a strain of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* widely disseminated in the United States. *J Clin Microbiol* 2006; 44(1):108-18.
94. Dufour P, Gillet Y, Bes M, Lina G, Vandenesch F, Floret D, et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in France: emergence of a single clone that produces Pantone-Valentine leukocidin. *Clin Infect Dis* 2002; 35(7):819-24.
95. Shibuya Y, Hara M, Higuchi W, Takano T, Iwao Y, Yamamoto T. Emergence of the community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 clone in Japan. *J Infect Chemother* 2008; 14(6):439-41.
96. Valentini P, Parisi G, Monaco M, Crea F, Spanu T, Ranno O, et al. An uncommon presentation for a severe invasive infection due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone USA300 in Italy: a case report. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2008; 30(1): 7-11.
97. Otter JA, French GL. The emergence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at a London teaching hospital, 2000-2006. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14(7):670-6.
98. 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):973-6.
99. Silva-Carvalho MC, Bonelli RR, Souza RR, Moreira S, Dos Santos LC, de Souza Conceição M, et al. Emergence of multiresistant variants of the community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineage ST1-

SCC*medIV* in 2 hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009; 65(3):300-5.

100. 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(4):163-70.

101. Amaral MM, Coelho LR, Flores RP, Souza RR, Silva-Carvalho MC, Teixeira LA, et al. The predominant variant of the Brazilian epidemic clonal complex of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* has an enhanced ability to produce biofilm and to adhere to and invade airway epithelial cells. *J Infect Dis* 2005; 192(5):801-10.

102. Pappas G, Athanasoulia AP, Matthaiou DK, Falagas ME. Trimethoprim-sulfamethoxazole for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a forgotten alternative? *J Chemother* 2009; 21(2):115-26.

Abstract

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is one of the main infectious agents associated to health services worldwide. In Brazil, there is a predominance of a multiresistant MRSA clone called the Brazilian epidemic clone (BEC). However, new highly virulent non-multiresistant clones have been described in community-acquired and hospital infections. The aim of this study was to conduct a phenotypic and genotypic characterization of isolated MRSA strains in the city of Natal, Brazil. We initially evaluated 60 samples of *S. aureus* for methicillin resistance through different phenotypic techniques, and compared the results with *mecA* gene detection by PCR. The antibiogram of all the strains was carried out using 12 antimicrobials as described by CLSI. The molecular characterization was carried out by staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) typing and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). Of the 60 *S. aureus* studied, 45 were methicillin-resistant. We observed that for some MRSA strains, agar screening test with 6µg/mL of oxacillin and the disk diffusion test with 1µg of oxacillin were difficult to interpret. However, all 45 MRSA samples were easily detected using the cefoxitin-30µg disk test and the PBP2a detection test. Molecular analysis of the MRSA strains showed 8 distinct PFGE patterns (A-H), with predominance of pattern A (73%), related to BEC. These strains carried the SCC*mec* type IIIA and showed a considerable diversity of subtypes (A₁-A₁₆). Five MRSA strains carrying SCC*mec*IV were also identified, three of them genetically related to the USA800 clone (pattern B). Three of those five (2 pattern F and 1 pattern B) were highly susceptible to drugs tested; however, two other pattern B isolates were multiresistant. The remaining samples belonged to

the distinct PFGE patterns of international clones predominant on our continent. To conduct this research project, the methodology required interaction with researchers from the following areas: infectology, microbiology and molecular biology. Therefore, this dissertation features both multidisciplinary and transdisciplinary in its design.

Keywords: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA, hospital infection, Brazilian epidemic clone, pediatric clone, PFGE, SCC*mec*, phenotypic methods.